



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
“SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE”**

CICLO XXXIV

COORDINATORE Prof. Pinton Paolo

APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE ALLO STUDIO DI TOSSICITA' E DANNO D'ORGANO
INDOTTI DA NPS (NUOVE SOSTANZE PSICOATTIVE): 4,4'-DIMETHYLAMINOREX (4,4'-DMAR)
COME MODELLO

Settore Scientifico Disciplinare MED/43

Dottorando
Dott. Frisoni Paolo

(firma)

Tutore
Prof. Neri Margherita

(firma)

Co-Tutore
Prof. Marti Matteo

(firma)



**Università
degli Studi
di Ferrara**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
“SCIENZE BIOMEDICHE E BIOTECNOLOGICHE”**

CICLO XXXIV

COORDINATORE Prof. Pinton Paolo

APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE ALLO STUDIO DI TOSSICITA' E DANNO D'ORGANO
INDOTTI DA NPS (NUOVE SOSTANZE PSICOATTIVE): 4,4'-DIMETHYLAMINOREX (4,4'-DMAR)
COME MODELLO

Settore Scientifico Disciplinare MED/43

Dottorando

Dott. Frisoni Paolo

(firma)

Tutore

Prof. Neri Margherita

(firma)

Co-Tutore

Prof. Marti Matteo

(firma)

Anni 2018/2021

1	Introduzione: il fenomeno NPS	4
2	4,4'-Dimethylaminorex (4,4'-DMAR)	6
2.1	Storia e inquadramento legislativo	6
2.2	Vie di assunzione ed attività farmacologica	8
3	Protocollo sperimentale	10
3.1	Razionale dello studio	10
3.2	Materiali e metodi	11
4	Risultati	16
4.1	Studi comportamentali	16
4.2	Analisi dell'escrezione urinaria	18
4.3	Studi istologici ed immunoistochimici	19
5	Discussione	24
6	Conclusioni	31
7	Bibliografia	32

1. Introduzione: il fenomeno NPS (nuove sostanze psicoattive).

Il termine NPS definisce le nuove sostanze stupefacenti o psicotrope, in forma pura o in preparato, che non sono elencate nella Convenzione Unica sugli Stupefacenti del 1961 o nella Convenzione sulle Sostanze Psicotrope del 1971, ma che costituiscono un pericolo per la salute pubblica.

Negli ultimi anni il fenomeno delle nuove sostanze psicoattive (NPS) è in aumento.

Molte delle NPS che compaiono nel mercato delle droghe ricreative sono derivati sintetici di sostanze controllate esistenti, analoghi di prodotti farmaceutici, o composti naturali. Queste NPS sono anche chiamate "smart drugs", "legal highs" e "designer drugs". Il metodo più comune per sintetizzare tali sostanze consiste nell'applicare alcune piccole modifiche chimiche a molecole già controllate, per portarle al di fuori della legislazione vigente.

Nel 2015 in Europa è stata rilevata almeno una nuova NPS ogni settimana e segnalata allo European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) attraverso il suo sistema di allarme rapido¹.

I dati dell'EU Drug Markets Report 2019 evidenziano che attualmente vengono segnalate circa 50 nuove sostanze ogni anno². Le sostanze registrate dal sistema di allarme rapido dell'UE dal 1997 al 2020 sono 830³.

L'entità del fenomeno non è marginale, per quanto quantitativamente inferiore agli stupefacenti tradizionali. Nel 2019, nel territorio UE (più Norvegia e Turchia) sono state sequestrate 2.7 tonnellate di NPS.

Da una serie di sondaggi eseguiti fra il 2015 ed il 2019 in 22 stati membri dell'UE si evince che la percentuale di popolazione adulta (fascia 15-64) che ha consumato NPS nell'ultimo anno si aggira attorno allo 0.6%. Tale percentuale risulta sensibilmente maggiore nei giovani adulti (15-34), con l'1.1% e nella fascia 15-16 anni, con il 2.4%³.

Le misure adottate nell'UE, verosimilmente associate ad una riduzione degli scambi commerciali negli ultimi due anni, hanno portato ad una progressiva riduzione dei sequestri³.

La Cina rimane il principale paese di origine per le NPS, da dove vengono esportate e vendute apertamente da aziende chimiche e farmaceutiche. In misura minore, l'India è una fonte importante di alcune NPS, in particolare quelle vendute come medicinali. Un piccolo

¹ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report 2020: Trends and Developments*; Publications Office of the European Union: Lisbon, Portugal, 2020.

² European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction e Europol, *EU drug markets report 2019*. 2019.

³ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report 2021: Trends and Developments*; Publications Office of the European Union: Lisbon, Portugal, 2021.

numero di laboratori illeciti è stato individuato anche in paesi europei come i Paesi Bassi e la Polonia, che solitamente producono catinoni sintetici².

Relativamente agli effetti comportamentali, le NPS possono essere suddivise in quattro macrogruppi: stimolanti amfetaminici (catinoni, fenetilamine e piperazine), cannabinoidi sintetici, composti sintetici con proprietà dissociative/allucinogene (es. triptamina) e composti simili agli oppioidi.

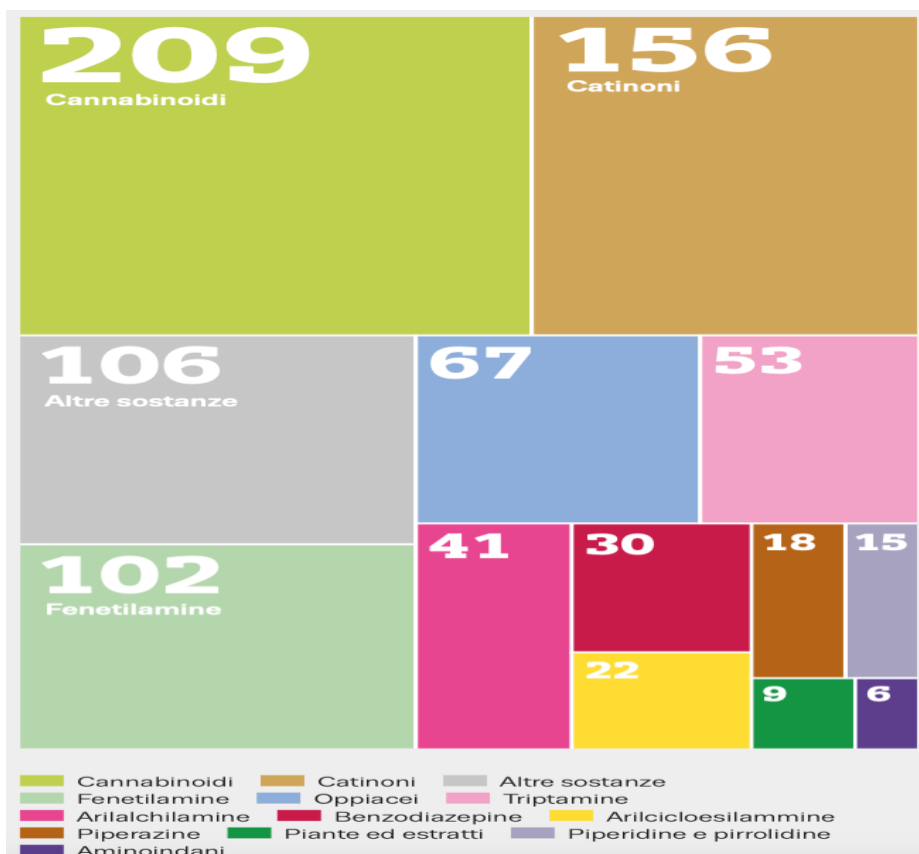


Figura 1. Classificazione delle NPS rilevate in Europa, da “Relazione europea sulla droga 2021: Tendenze e sviluppi”

Dal punto di vista forense le NPS rappresentano una grande sfida. I loro meccanismi di azione sono generalmente poco conosciuti, il loro profilo tossicologico è spesso ignoto e, di sovente, le indagini autoptiche ed istologiche forniscono dati aspecifici.

Un ulteriore problema è costituito dal fatto che tali sostanze “eludono” le indagini tossicologiche svolte a fini clinici e perfino gli screening tossicologici forensi, mirati alla ricerca dei più comuni stupefacenti.

Ciò, assieme alla co-assunzione di altre sostanze, causa, verosimilmente, una sottostima numerica del fenomeno, sia dal punto di vista delle intossicazioni che dei decessi.

2 4,4'-Dimethylaminorex (4,4'-DMAR)

2.1 Storia e inquadramento legislativo

La sostanza che andremo a caratterizzare, che prende il nome di 4,4'-DMAR, appartiene ad una classe di composti anoressigeni studiati nei primi anni '60 a base di 5-fenil-4,5-diidrossazol-2-ammina (2-amino-5-fenil ossazolina o Aminorex)⁴.

Il 4,4'-DMAR è un derivato dei preesistenti composti Aminorex e 4-methylaminorex (4-MAR). Mentre il 4-metilaminorex è uno psicostimolante apparso negli anni '80 come droga da strada⁵, l'Aminorex è stato scoperto come metabolita del levamisolo, uno degli adulteranti più frequenti della cocaina.

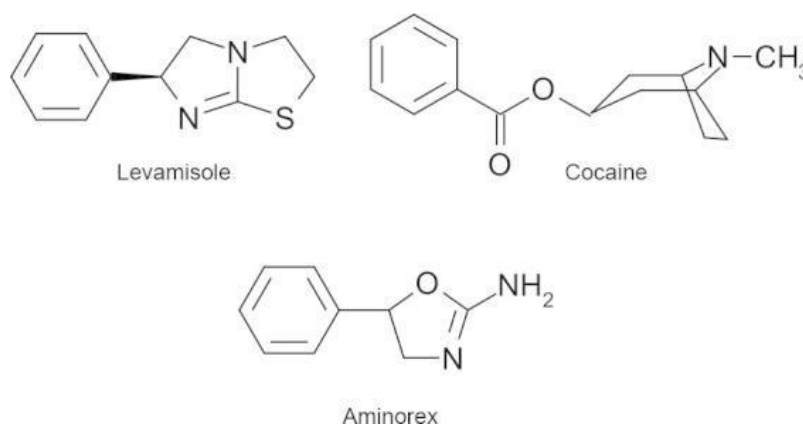


Figura 2. Struttura chimica di levamisolo, cocaina, Aminorex

Commercializzato con il nome di "Ergamisol", il levamisolo è un farmaco antelmintico ad uso veterinario, precedentemente utilizzato anche negli esseri umani. E' stato ritirato dal mercato statunitense nel 2000 a causa dei suoi gravi effetti collaterali. Il levamisolo viene metabolizzato ad Aminorex, psicoattivo, e potenzialmente tossico⁶, sostanza anoressizzante simile all'amfetamina. Questo farmaco è stato commercializzato come soppressore dell'appetito a metà degli anni '60 principalmente in Svizzera, Austria e Germania e poi ritirato nel 1972 a causa di diversi casi di ipertensione polmonare fatale⁷. Di conseguenza, Aminorex è stato elencato come sostanza controllata.

⁴ M. Coppola e R. Mondola, «4,4'-DMAR: Chemistry, Pharmacology and Toxicology of a New Synthetic Stimulant of Abuse», *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 117, n. 1, pagg. 26–30, lug. 2015, doi: 10.1111/bcpt.12399.

⁵ D. Brandt *et al.*, «Characterization of a novel and potentially lethal designer drug (±)-cis-para-methyl-4-methylaminorex (4,4'-DMAR, or 'Serotoni')», *Drug Test. Anal.*, vol. 6, n. 7–8, pagg. 684–695, 2014, doi: 10.1002/dta.1668.

⁶ A. Rickli, K. Kolaczynska, M. C. Hoener, e M. E. Liechti, «Pharmacological characterization of the aminorex analogs 4-MAR, 4,4'-DMAR, and 3,4-DMAR», *NeuroToxicology*, vol. 72, pagg. 95–100, mag. 2019, doi: 10.1016/j.neuro.2019.02.011.

⁷ T. Hofmaier *et al.*, «Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters», *Neurochem. Int.*, vol. 73, pagg. 32–41, lug. 2014, doi: 10.1016/j.neuint.2013.11.010.

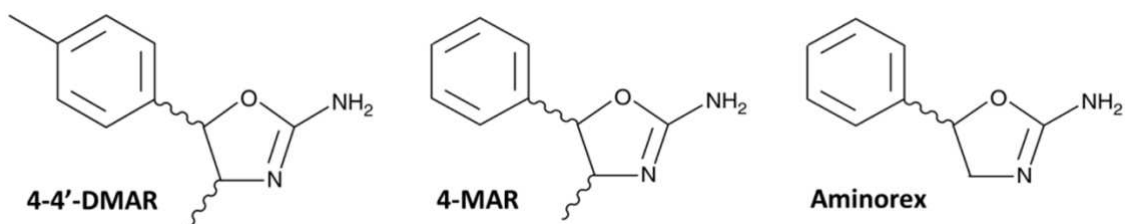


Figura 3. Struttura chimica del 4,4'-DMAR (4-Methyl-5-(4-methylphenyl)-4,5-dihydrooxazol-2-amine), 4-MAR (4-Methyl-5-phenyl- 4,5-dihydrooxazol-2-amine) a confronto con Aminorex (5-phenyl-4,5-dihydro-1,3-oxazol-2-amine)

Nel febbraio 2014, l'Osservatorio europeo delle droghe e delle tossicodipendenze ha pubblicato una notifica di allarme rapido sul 4,4'-DMAR, un derivato parametilico del 4-metilaminorex. Questa nuova sostanza psicoattiva, al tempo non controllata dalla legislazione sulle droghe nell'UE, veniva altresì denominata anche "4-metil-euforia", "4-metil-U4Euh", "4-M-4-MAR", "4,4-dimetilamminorex" o "Serotoni".

La molecola veniva identificata per la prima volta nei Paesi Bassi nel dicembre 2012 e, nella prima metà del 2013, veniva rinvenuta anche in Danimarca, Romania, Polonia, Ungheria, Finlandia, Svezia e Regno Unito^{8 9}.

Il 4,4'-DMAR è comunemente venduto su Internet sotto forma di polvere e compresse, sotto il nome di "Speckled Cherry" o "Speckled Cross" in diversi colori (bianco, rosa, verde e blu), forme e con una grande varietà di loghi.

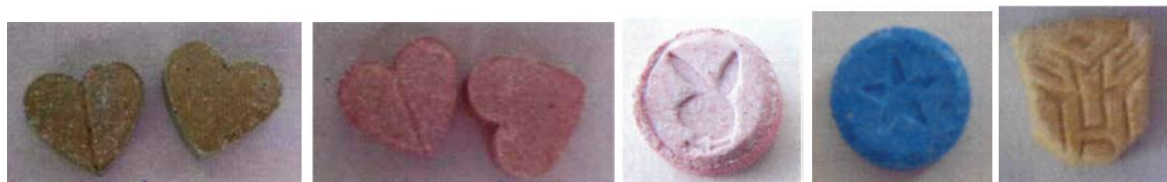


Figura 4. Compresse a base di 4,4'-DMAR sequestrate in Ungheria⁸

Nei paesi europei sono stati segnalati numerosi sequestri di compresse e polvere in cui è stata riscontrata la presenza di 4,4'-DMAR come sostanza unica o in combinazione con altri farmaci psicotropi, compresi i catinoni sintetici, cannabinoidi sintetici, benzofurani ed etilfenidato⁹.

Diversi paesi europei hanno segnalato decessi correlabili all'uso di questa molecola.

⁸ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) and Europol, «Early warning notification 2014/7. Link suspected between deaths and new psychoactive substance: 4-methylaminorex, para-methyl derivative». 2014.

⁹ B. Loi, M. Zloh, M. A. De Luca, N. Pintori, J. Corkery, e F. Schifano, «4,4'-Dimethylaminorex ("4,4'-DMAR"; "Serotoni") misuse: A Web-based study», *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, vol. 32, n. 3, pag. e2575, mag. 2017, doi: 10.1002/hup.2575.

Nel giugno 2013, l'Ungheria ha segnalato otto decessi in cui il 4,4'-DMAR è stato ritrovato in combinazione con altre sostanze (alfa-PVP, mefedrone e alprazolam). Tra il giugno ed il dicembre 2013 nel Regno Unito sono stati segnalati 18 decessi correlabili all'assunzione di 4,4'-DMAR in combinazione con altri farmaci⁸.

Nel report emesso dall' EMCDDA nel 2015¹⁰ risultavano analiticamente confermati un totale di 31 decessi associati a 4,4'-DMAR. In 23 casi, il 4,4'-DMAR è stato causa o concausa del decesso, anche in presenza di altre sostanze. In otto casi il 4,4'-DMAR potrebbe aver contribuito al meccanismo letifero in presenza di altre sostanze più significative dal punto di vista tossicologico.

Con una delibera del Consiglio Europeo del 2015¹¹, il 4,4'-DMAR diventava una sostanza controllata all'interno dell'Unione Europea. Secondo la legislazione italiana è uno stupefacente facente parte della Tabella 1 (ai sensi del DPR 309/90 e successive modifiche). Nel 2021 gli Stati Uniti hanno concluso il procedimento di valutazione del 4,4'-DMAR, classificandolo come stupefacente in Tabella 1¹².

2.2 Vie di assunzione ed attività farmacologica

L'assunzione nasale (sniffing) ed il consumo orale sono le principali vie di somministrazione, tuttavia, è stata segnalata anche l'assunzione per via endovenosa.

Bassi dosaggi (10–15 mg per inalazione o 10–25 mg per somministrazione orale) vengono utilizzati per produrre ipereccitazione, euforia, diminuzione dell'appetito e stimolazione motoria. Un dosaggio intermedio (ad es. 20-50 mg per via orale) può essere associato a irrequietezza, agitazione e insonnia; alti dosaggi (>100 mg) possono produrre grave anoressia, stato paranoide, a volte con allucinazioni, ipertermia, bruxismo, spasmi facciali, aumento dei livelli di aggressività, convulsioni e tachicardia, fino all'arresto cardiaco^{13 14}. Tali report farmaco-tossicologici correlati alla dose devono essere interpretati con cautela, poiché per gran parte derivanti da esperienze soggettive degli utenti o da quanto dichiarato dagli stessi all'accesso presso strutture sanitarie.

¹⁰ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *4,4'-DMAR report on the risk assessment of 4,4'-DMAR in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances*. Luxembourg: Publications Office, 2015.

¹¹ COUNCIL IMPLEMENTING DECISION (EU) 2015/1873 of 8 October 2015; Official Journal of the European Union, 127, 20.5.2005, p. 32.

¹² Schedules of Controlled Substances: Placement of 4,4'-DMAR in Schedule I. Federal Register Volume 86, Number 153 (Thursday, August 12, 2021).

¹³ Maier, J.; Mayer, F.P.; Brandt, S.D.; Sitte, H.H. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Aminorex Analogues. *ACS Chem. Neurosci.* 2018, 9, 2484–2502.

¹⁴ Glanville, J.; Dargan, P.; Wood, D.M. 4-Methyl-5-(4-methylphenyl)-4,5-dihydrooxazol-2-amine (4,4' -DMAR, 4,4' -dimethylaminorex): Availability, prevalence of use, desired effects and acute toxicity. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 2015, 30, 193–198.

Studi in vitro hanno dimostrato che il 4,4'-DMAR è un potente agente di rilascio delle monoammine non selettivo, di potenza simile alla 3,4-metilendioossimetilamfetamina (MDMA)¹⁵. Inoltre, ha una potente attività inibitoria sui trasportatori di dopamina (DAT), noradrenalina (NET) e serotonina¹⁶. La sua azione sui recettori 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} suggerirebbe inoltre una lieve attività allucinogena⁶.

I segni clinici più comuni associati ai decessi da 4,4'-DMAR consistono in agitazione psicomotoria, sudorazione, ipertermia, e convulsioni. All'autopsia si sono frequentemente rilevati edema cerebrale ed emorragie interne (intestinali, polmonari, muscolari)¹⁷. Le analisi tossicologiche eseguite nei casi ad esito fatale hanno rilevato livelli ematici post-mortem compresi fra 0.20 e 3.75 mg/l¹⁸.

A complicare il quadro vi è l'assenza di dati di sicurezza preclinici relativi al potenziale tossico/neurotossico del 4,4'-DMAR e l'incertezza sulla composizione delle sostanze sequestrate. Di fatti, non è nota l'esatta concentrazione degli stereoisomeri (\pm)*cis*-4,4'-DMAR e (\pm)*trans*-4,4'-DMAR nel prodotto “commerciale” o addirittura della loro presenza in una miscela racemica.

¹⁵ Maier, J.; Mayer, F.; Luethi, D.; Holy, M.; Jäntschi, K.; Reither, H.; Hirtler, L.; Hoener, M.C.; Liechti, M.E.; Pifl, C.; et al. The psychostimulant (\pm)-*cis*-4,4'-dimethylaminorex (4,4'-DMAR) interacts with human plasmalemmal and vesicular monoamine transporters. *Neuropharmacology* 2018, 138, 282–291.

¹⁶ McLaughlin, G.; Morris, N.; Kavanagh, P.V.; Power, J.D.; Twamley, B.; O'Brien, J.; Talbot, B.; Dowling, G.; Mahony, O.; Brandt, S.; et al. Synthesis, characterization, and monoamine transporter activity of the new psychoactive substance 3',4'-methylenedioxy-4-methylaminorex (MDMAR). *Drug Test. Anal.* 2014, 7, 555–564.

¹⁷ European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *EMCDDA–Europol Joint Report on a New Psychoactive Substance: 4,4'-DMAR (4-Methyl-5-(4-methylphenyl)-4,5-dihydrooxazol-2-amine)*; EMCDDA—Europol Joint Publications: Lisbon, Portugal, 2014.

¹⁸ Cosbey S. et al. Multiple Fatalities Involving a New Designer Drug: *Para*-Methyl-4-Methylaminorex. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 38, Issue 6, July/August 2014, Pages 383–384, <https://doi.org/10.1093/jat/bku031>

3 Protocollo sperimentale

La seguente sperimentazione è avvenuta sotto la supervisione del Prof. Matteo Marti nell'ambito del progetto "Effetti delle NPS: Sviluppo di una multicentrica di ricerca per il potenziamento informativo del Sistema di Allerta Precoce" sotto l'egida del Dipartimento Politiche Antidroga – Presidenza del Consiglio dei Ministri.

Gli studi comportamentali sono stati realizzati presso il Laboratorio centralizzato di ricerca preclinica (LARP) dell'Università degli Studi di Ferrara.

Le analisi sull'escrezione urinaria si sono svolte presso il Laboratorio Antidoping FMSI (Roma).

Le analisi istologiche ed immunoistochimiche sono state realizzate presso la Sezione di Medicina Legale dell'Università degli Studi di Ferrara.

I risultati sono stati recentemente pubblicati:

Tirri, M.; Frisoni, P.; Bilel, S.; Arfè, R.; Trapella, C.; Fantinati, A.; Corli, G.; Marchetti, B.; De-Giorgio, F.; Camuto, C.; et al. Worsening of the Toxic Effects of (\pm)*Cis*-4,4'-DMAR Following Its Co-Administration with (\pm)*Trans*-4,4'-DMAR: Neuro-Behavioural, Physiological, Immunohistochemical and Metabolic Studies in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22,8771. <https://doi.org/10.3390/ijms22168771>.

3.1 Razionale dello studio

Lo scopo del presente studio è di indagare gli effetti della somministrazione sistemica acuta sia degli stereoisomeri singoli (\pm)*cis* (0,1–60 mg/kg) e (\pm)*trans* (30 e 60 mg/kg), che della loro co-somministrazione ((\pm)*cis* a 1, 10 o 60 mg/kg + (\pm)*trans* a 30 mg/kg) nel modello murino, valutando una parametri fisici (es. sudorazione, salivazione, ipertermia) e neuro-comportamentali (ad es. agitazione psicomotoria, aggressività, convulsioni).

Al fine di indagare una possibile neurotossicità, e analogamente a quanto precedentemente studiato in relazione all'MDMA¹⁹, molecola dal profilo simile, sono stati indagati marcatori chiave dello stress ossidativo/nitrosativo (8-OHdG, iNOS, NT e NOX2) e dell'apoptosi (Smac/DIABLO e NF- κ B).

¹⁹ Schiavone, S.; Neri, M.; Maffione, A.B.; Frisoni, P.; Morgese, M.G.; Trabace, L.; Turillazzi, E. Increased iNOS and Nitrosative Stress in Dopaminergic Neurons of MDMA-Exposed Rats. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1242.

Alla luce degli studi in vivo, che hanno evidenziato l'insorgenza di ipertermia, si è deciso di indagare l'espressione di alcune Heat Shock Proteins (HSP27, HSP70, HSP90), marcatori legati alla risposta indotta dal calore^{20 21 22}.

Infine, nello studio dell'escrezione dei relativi metaboliti urinari, alla luce dei dati comportamentali, è stato indagato il potenziale meccanismo alla base del potenziamento degli effetti tossici dello stereoisomero (\pm)cis quando co-somministrato con lo stereoisomero (\pm)trans.

3.2 Materiali e metodi

Animali.

Ottantaquattro topi ICR (CD-1®) maschi del peso di 30-35 g (LARP, Università di Ferrara, Ferrara, Italia) sono stati alloggiati in gruppi (5 topi per gabbia) esposti ad un ciclo luce-buio di 12:12 ore, ad una temperatura di 20-22°C e umidità del 45-55%, con accesso ad libitum a cibo e acqua. I protocolli sperimentali eseguiti nel presente studio sono in accordo con le direttive comunitarie (2010/63/UE) ed approvati dal dal Ministero della Salute (autorizzazione n. 335/2016-PR) e dall'Organismo preposto al Benessere Animale dell'Università degli Studi di Ferrara. Secondo le linee guida ARRIVE, si è cercato di ridurre al minimo il dolore ed il disagio degli animali, nonché il numero di animali utilizzati.

Sostanza.

I composti 4,4-dimetilaminorex (4,4-DMAR) cis- e trans- sono stati sintetizzati presso il Dipartimento di Chimica e Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Ferrara prima che la sostanza fosse inserita nella Tabella I del DPR 309/90, dalla sintesi di 4-metilpropiofenone come precedentemente descritto da Brandt e collaboratori⁵. Le sostanze sono state inizialmente disciolte in etanolo assoluto (concentrazione finale 2%) e Tween 80 (2%) e portate al volume finale con soluzione salina (0,9% NaCl). La soluzione a base di etanolo, Tween 80 e soluzione salina è stata utilizzata anche come veicolo. Le droghe sono state somministrate mediante iniezione intraperitoneale (i.p.) ad un volume di 4 μ L/g. I range di dosi di (\pm)cis-4,4'-DMAR (0.1–60 mg/kg; i.p.), (\pm)trans-4,4'-DMAR e loro combinazioni, sono stati scelti in base alla scala della dose interspecie per riprodurre nel topo

²⁰ Tang, S.; Buriro, R.; Liu, Z.; Zhang, M.; Ali, I.; Adam, A.; Hartung, J.; Bao, E. Localization and Expression of Hsp27 and α B-Crystallin in Rat Primary Myocardial Cells during Heat Stress In Vitro. *PLoS ONE* 2013, 8, e69066

²¹ Doberentz, E.; Gennepfer, L.; Böker, D.; Lignitz, E.; Madea, B. Expression of heat shock proteins (hsp) 27 and 70 in various organ systems in cases of death due to fire. *Int. J. Leg. Med.* 2014, 128, 967–978.

²² Luo, M.; Meng, Z.; Moroishi, T.; Lin, K.C.; Shen, G.; Mo, F.; Shao, B.; Wei, X.; Zhang, P.; Wei, Y.; et al. Heat stress activates YAP/TAZ to induce the heat shock transcriptome. *Nat. Cell Biol.* 2020, 22, 1447–1459.

dosi che corrispondevano a dosi basse, intermedie e alte nell'uomo.

Studi comportamentali.

Gli effetti dei due stereoisomeri del 4,4'-DMAR e loro co-somministrazione sono stati indagati con un protocollo precedentemente ampiamente utilizzato negli studi di “safety pharmacology” per la caratterizzazione preclinica di nuove molecole nei roditori^{23 24}. Questo protocollo comprende una serie di test comportamentali osservativi effettuati in maniera consecutiva che monitorano le risposte degli animali fino a 5 ore dopo le iniezioni del composto, rilevando parametri fisici (sudorazione, salivazione, temperatura interna) e neuro-comportamentali (rilevamento di agitazione psicomotoria, aggressività spontanea e stimolata, convulsioni).

Gli esperimenti, condotti in cieco da osservatori addestrati che lavorano in coppia, sono stati videoregistrati ed eventualmente analizzati off-line da un terzo operatore addestrato.

Analisi dell'escrezione urinaria.

Le urine provengono da tre gruppi di topi. Al primo gruppo è stata somministrata una dose di 10 mg/kg di cis-4,4'-DMAR, al secondo una dose di 10 mg/kg di cis- e 10 mg/kg di trans-4,4'-DMAR. Il terzo gruppo è stato selezionato per la raccolta di campioni di urina in bianco. I campioni di urina sono stati raccolti nell'intervallo 0-6 ore dopo l'iniezione per via intraperitoneale, trattati e analizzati attraverso un protocollo già utilizzato dal nostro gruppo per l'analisi dell'escrezione di farmaci stimolanti nei topi^{25 26}. In breve, il nostro protocollo ha permesso la conversione di metaboliti coniugati (cioè solfo- e glucurono-coniugati) a metaboliti di fase I dopo due fasi di idrolisi. I campioni sono stati analizzati utilizzando uno strumento HPLC Agilent serie 1200 dotato di una colonna SUPELCO Discovery C18 (15 cm × 2,1 mm × 5 µm) accoppiata con uno spettrometro di massa API4000 QqQ (Sciex, 500

²³Vigolo, A.; Ossato, A.; Trapella, C.; Vincenzi, F.; Rimondo, C.; Seri, C.; Varani, K.; Serpelloni, G.; Marti, M. Novel alogenated derivatives of JWH-018: Behavioral and binding studies in mice. *Neuropharmacology* 2015, 95, 68–82.

²⁴Ossato, A.; Bilel, S.; Gregori, A.; Talarico, A.; Trapella, C.; Gaudio, R.M.; DeGiorgio, F.; Tagliaro, F.; Neri, M.; Fattore, L.; et al. Neurological, sensorimotor and cardiorespiratory alterations induced by methoxetamine, ketamine and phencyclidine in mice. *Neuropharmacology* 2018, 141, 167–180.

²⁵Chieffi, C.; Camuto, C.; De-Giorgio, F.; de la Torre, X.; Diamanti, F.; Mazzarino, M.; Trapella, C.; Marti, M.; Botrè, F. Metabolic profile of the synthetic drug 4,4'-dimethylaminorex in urine by LC-MS-based techniques: Selection of the most suitable markers of its intake. *Forensic Toxicol.* 2020, 39, 89–100.

²⁶Camuto, C.; Pellegrini, S.; De-Giorgio, F.; de la Torre, X.; Marti, M.; Mazzarino, M.; Botrè, F. Urinary excretion profile of methiopropamine in mice following intraperitoneal administration: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry investigation. *Drug Test. Anal.* 2020, 13, 91–100.

Old Connecticut Path, Framingham, MA, USA). I parametri cromatografici e dello spettrometro di massa sono stati descritti negli articoli sopra citati.

Procedura istologica.

Dopo la morte o il sacrificio degli animali (dopo un periodo di osservazione di 5 ore, per lussazione della colonna cervicale), sono stati effettuati prelievi *in toto* dei visceri, che sono stati fissati in formalina tamponata al 4%. I campioni sono stati quindi incorporati in paraffina (processore Leica ASP300, inclusore Histoline TEC2900). Il taglio è stato eseguito con un microtomo Leica HistoCore Autocut, con la preparazione di sezioni dello spessore di 5 µm di ogni campione. Per le indagini istologiche, le sezioni sono state colorate con ematossilina/eosina e quindi osservate in microscopia ottica (Nikon Eclipse E90i).

Procedura immunohistochimica.

Per il presente studio, la colorazione immunohistochimica è stata eseguita su campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina. Sono stati analizzati i gruppi (±)cis- 10, 30 e 60 mg/kg, (±)trans- 30 mg/kg, (±)cis- 10 mg/kg + (±)trans- 30 mg/kg, (±)cis- 60 mg/kg + (±)trans- 30 mg/kg e veicolo; ogni gruppo era costituito da sei soggetti.

Le sezioni sono state immerse in successione in vassoi contenenti xilene (due bagni della durata di 20 minuti ciascuno), quindi due bagni di alcol 100% di 5 minuti ciascuno, quindi in alcol 90% per 5 minuti, seguito da un bagno di 20 minuti in alcol 90% e 3 % perossido di idrogeno (blocco delle perossidasi endogene). Sono stati poi immersi in alcool al 70% per altri 5 minuti e infine passati brevemente in acqua distillata.

Dopo la deparaffinazione, gli antigeni sono stati smascherati mediante riscaldamento (forno a microonde, 352 W per 8') in tampone citrato 0,01 M o tampone EDTA 0,25 mM (vedi Figura 5).

Dopo il raffreddamento, i vetrini sono stati risciacquati con PBS e quindi incubati con siero bloccante (BSA+albumina) per 15 minuti. Gli anticorpi primari (Figura 5) sono stati quindi applicati e lasciati ad incubare per due ore a temperatura ambiente (22°C).

Marker		Dilution	Retrieval
HSP27	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:50	HIER (0.25 mM EDTA buffer)
HSP70	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:50	HIER (0.25 mM EDTA buffer)
HSP90	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:50	HIER (0.25 mM EDTA buffer)
SMAC	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:100	HIER (0.01 M citrate buffer)
NF-kB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:50	HIER (0.25 mM EDTA buffer)
iNOS	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:100	HIER (0.01 M citrate buffer)
NOX-2	Proteintech	1:100	HIER (0.01 M citrate buffer)
NT	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:600	HIER (0.01 M citrate buffer)
8OHDG	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	1:500	HIER (0.01 M citrate buffer)

Figura 5. Anticorpi utilizzati, loro diluizione e metodo di smascheramento antigenico.

Abbiamo utilizzato un sistema di rilevamento composto da un anticorpo secondario biotinilato e streptavidina coniugata con HRP (4plus HRP Universal Detection, BiocareMedical). 3,3'-Diamminobenzidina (DAB) e H₂O₂ (Betazoid DAB Chromogen Kit, Biocare Medical, Concord, CA, USA) sono stati utilizzati come cromogeno e substrato. Il successivo contrasto con ematossilina ha permesso la visualizzazione dei nuclei. Una volta completata questa procedura, i vetrini sono stati montati e osservati al microscopio ottico (Nikon Eclipse 90i). I parametri di acquisizione delle immagini sono stati inizialmente stabiliti e mantenuti invariati.

La quantificazione delle aree positive (marcatura marrone della tecnica immunocistochemica) è stata realizzata mediante il software ImageJ (imagej.nih.gov/ij/) ed espressa come estensione dell'area marcata in pixel.

Analisi statistica

La sudorazione e la salivazione sono state espresse come frequenza (% di animali in cui si sono sviluppati i sintomi); l'agitazione psicomotoria è stata espressa come frequenza (% di animali) e durata (tempo totale in minuti). I valori della temperatura interna sono stati espressi come differenza fra la temperatura prima dell'iniezione e dopo la somministrazione del farmaco ($\Delta^{\circ}\text{C}$). L'aggressività è stata espressa come frequenza (% di animali che diventano aggressivi) e punteggio (numero di morsi). Le convulsioni sono state espresse come frequenza (% di animali che ha sviluppato la crisi), episodi (ad es., numero di eventi convulsivi), latenza del primo episodio (sec.) e durata di ogni episodio (sec.). La letalità è stata espressa come frequenza (% di animali morti durante il periodo di osservazione (5 h) o durante le 24 h successive). L'analisi statistica degli effetti delle singole sostanze in diverse concentrazioni è stata eseguita utilizzando ANOVA a una via seguito da un test di

Bonferroni per multipli confronti. È stato utilizzato un test t di Student per determinare la significatività statistica ($p < 0,05$) tra due gruppi.

Per quanto riguarda l'analisi immunohistochimica, la positività è stata espressa come estensione dell'area analizzata macchiata. I risultati sono stati espressi come medie \pm errore standard (SEM). I dati sono stati analizzati mediante ANOVA a una via, seguita dal test post-hoc di Tukey. Per tutti i test, un valore $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software GraphPad Prism 8 per Windows (La Jolla, CA, USA).

4 Risultati

4.1 Studi comportamentali

(±)Cis-4,4'-DMAR (0,1–60 mg/kg i.p.; Figura 6) ha causato agitazione psicomotoria nei topi nel range di dosaggio di 3-60 mg/kg; sia la latenza della comparsa dell'effetto (ANOVA unidirezionale; $F(3,20) = 66,56$, $p < 0,0001$) sia la sua durata (ANOVA unidirezionale ha mostrato $F(3,20) = 66,56$, $p < 0,0001$) erano dose-dipendenti.

Tutti gli animali hanno mostrato un'abbondante sudorazione e salivazione alle dosi di 30 e 60 mg/kg, anche se alla dose più alta di 60 mg/kg solo il 50% degli animali ha mostrato una sudorazione profusa (tuttavia a questa dose metà dei soggetti era deceduto prima di manifestare l'effetto). (±)Cis-4,4'-DMAR ha causato un'ipertermia dose-dipendente a 30 mg/kg ($+1,52 \pm 0,11$ C) e a 60 mg/kg ($+2,22 \pm 0,12$ C), mentre dosi inferiori (0,1–10 mg/kg) risultavano in tal senso inefficaci (ANOVA a una via $F(6,35) = 52,18$, $p < 0,0001$). La molecola ha indotto livelli di aggressività stimolata in maniera dose-dipendente a 10 e 30 mg/kg ($t=12,30$, $df = 10$; $p < 0,0001$). Alla dose massima (60 mg/kg) non è stato possibile eseguire i test di aggressività spontanea e stimolata in quanto gli animali erano eccessivamente agitati. La somministrazione sistemica di (±)cis-4,4'-DMAR ha indotto convulsioni nel 50% e nel 100% dei topi rispettivamente ai dosaggi di 30 e 60 mg/kg; la durata delle crisi era più lunga nei topi trattati con la dose più alta ($t = 3,280$, $df = 10$; $p = 0,0083$). (±)Cis-4,4'-DMAR a 30 e 60 mg/kg ha causato la morte rispettivamente del 50% e del 100% dei topi, e alla dose più alta, il tempo di morte è stato significativamente più breve ($t = 2,526$, $df = 10$; $p = 0,0301$).

COMPOUND		cis-4,4'-DMAR						
Doses (mg/kg)		vehicle	0.1	1	3	10	30	60
Psychomotor agitation	Frequency % (n° of mice)	-	-	-	100 % (6)	100 % (6)	100 % (6)	100 % (6)
	Duration (min)	-	-	-	54.2 ± 10.30	121.0 ± 12.35 ^a	235.1 ± 15.25 ^{ab}	280.1 ± 12.35 ^{ab}
	Latency (min)	-	-	-	61.2 ± 6.30	28.2 ± 7.20 ^a	3.2 ± 0.25 ^{ab}	2.2 ± 0.15 ^{ab}
Sweating	Frequency % (n° of mice)	-	-	-	-	-	100 % (6)	100 % (6)
Salivation	Frequency % (n° of mice)	-	-	-	-	-	100 % (6)	50 % (3)
Hyperthermia	Variation (Δ°C)	-0.28 ± 0.12	-0.18 ± 0.14	-0.22 ± 0.17	-0.34 ± 0.22	-0.41 ± 0.13	1.52 ± 0.11 ^c	2.22 ± 0.12 ^c
	Latency (min)	-	-	-	-	-	25 ± 0.25	7.12 ± 0.23 ^d
Aggressiveness	Spontaneous	-	-	-	-	-	-	nd
	Stimulated	-	-	-	-	100 % (6)	100 % (6)	nd
	Score (n° of bites)	-	-	-	-	6 ± 0.23	10 ± 0.23 ^b	nd
Convulsion	Frequency % (n° of mice)	-	-	-	-	-	50 % (3)	100 % (6)
	Episodes (n°)	-	-	-	-	-	3.5 ± 0.5	2.0 ± 0.41 ^d
	Latency of first episode (sec)	-	-	-	-	-	10.5 ± 1.5	8.25 ± 1.1
	Duration of each episode (sec)	-	-	-	-	-	4.86 ± 1.26	16.14 ± 3.2 ^d
Lethality	Frequency % (n° of mice)	-	-	-	-	-	50 % (3)	100 % (6)
	Time of death (min)	-	-	-	-	-	59.3 ± 2.3	31.9 ± 5.6 ^d
	Surviving mice % (n° of mice)	-	-	-	-	-	50 % (3)	0% (0)

Figura 6. Effetto di (±)cis-4,4'-DMAR (0,1–60 mg/kg ip) sui cambiamenti neuro-comportamentali (agitazione psicomotoria, aggressività, convulsioni), alterazioni fisiologiche (sudorazione, salivazione, ipertermia) e letalità in i topi. È stato utilizzato un test t di Student per determinare la significatività statistica ($p < 0,05$) tra i due gruppi. ^a $p < 0,05$, rispetto a cis 3 mg/kg; ^b $p < 0,05$, rispetto a cis 10 mg/kg; ^c $p < 0,05$, rispetto al veicolo; ^d $p < 0,05$, rispetto a cis 30 mg/kg.

La somministrazione sistemica di (\pm)trans-4,4'-DMAR (30 e 60 mg/kg) non ha indotto alcun cambiamento fisiologico e neuro-comportamentale a nessuna delle dosi testate. Il (\pm)trans-4,4'-DMAR testato alle dosi più basse di 0,1 e 1 mg/kg è risultato inattivo su tutti i parametri studiati.

La Co-somministrazione di dosi crescenti di (\pm)cis-4,4'-DMAR (es. 1, 10 e 60 mg/kg) con (\pm)trans-4,4'-DMAR (es. 30 mg/kg) ha peggiorato le alterazioni dei parametri e neurocomportamentali causate da singole iniezioni dello stereoisomero (\pm)cis-4,4'-DMAR (ad es. 1, 10 e 60 mg/kg; Figura 7).

COMPOUND		<i>cis</i> -4,4'-DMAR			<i>trans</i>	<i>(cis + trans)</i> -4,4'-DMAR			
Doses (mg/kg)		vehicle	1	10	60	30	1 + 30	10 + 30	60 + 30
Psychomotor agitation	Frequency % (n°of mice)	-	-	100 % (6)	100 % (6)	-	50 % (3)	100 % (6)	100 % (6)
	Duration (min)	-	-	121.0 \pm 12.35	220.1 \pm 12.35	-	55.0 \pm 5.0	185.5 \pm 11.0 ^e	nd
	Latency (min)	-	-	28.2 \pm 7.20	2.2 \pm 0.15	-	45.2 \pm 5.20	6.2 \pm 2.20 ^e	0.45 \pm 0.10 ^f
Sweating	Frequency % (n°of mice)	-	-	-	100 % (6)	-	-	33 % (2)	100 % (6)
Salivation	Frequency % (n°of mice)	-	-	-	50 % (3)	-	-	33 % (2)	50 % (3)
Hyperthermia	Variation (Δ° C)	-0.28 \pm 0.12	-0.22 \pm 0.17	-0.41 \pm 0.13	2.22 \pm 0.12	-0.37 \pm 0.13	-0.70 \pm 0.15	1.6 \pm 0.11 ^e	2.25 \pm 0.09
	Latency (min)	-	-	-	7.12 \pm 0.23	-	-	28.0 \pm 0.21	5.0 \pm 0.23 ^f
Aggressiveness	Spontaneous Frequency % (n°of mice)	-	-	-	nd	-	-	-	nd
	Stimulated Frequency % (n°of mice)	-	-	100 % (6)	nd	-	-	100 % (6)	nd
	Score (n°of bites)	-	-	6 \pm 0.23	nd	-	-	10 \pm 0.05 ^e	nd
Convulsion	Frequency % (n°of mice)	-	-	-	100 % (6)	-	-	-	100 % (6)
	Episodes (n°)	-	-	-	2.0 \pm 0.41	-	-	-	1.0 \pm 0.0 ^f
	Latency of first episode (sec)	-	-	-	8.25 \pm 1.1	-	-	-	6.67 \pm 2.73
	Duration of each episode (sec)	-	-	-	16.14 \pm 6.2	-	-	-	40.0 \pm 5.0 ^f
Lethality	Frequency % (n°of mice)	-	-	-	100 % (6)	-	-	-	100 % (6)
	Time of death (min)	-	-	-	31.9 \pm 5.6	-	-	-	11.0 \pm 3.9 ^f
	Surviving mice % (n°of mice)	-	-	-	0% (0)	-	-	-	0% (0)

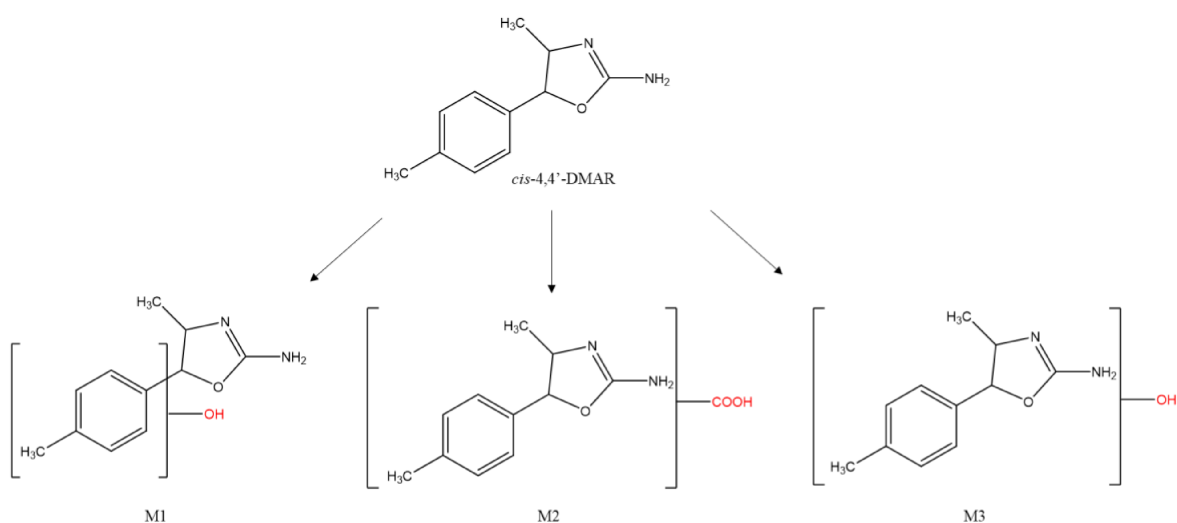
Figura 7. Effetto della co-somministrazione di (\pm)cis-4,4'-DMAR (1, 10 e 60 mg/kg ip) e (\pm)trans-4,4'-DMAR (30 mg/kg ip) sul comportamentale (agitazione psicomotoria, aggressività, convulsioni), e alterazioni fisiologiche (sudorazione, salivazione, ipertermia) nei topi. È stato utilizzato un test t di Student per determinare la significatività statistica ($p < 0,05$) tra i due gruppi. ^e $p < 0,05$, rispetto a cis 10 mg/kg; ^f $p < 0,05$, rispetto a cis 60 mg/kg.

Il primo parametro comportamentale influenzato dalla co-somministrazione è stato l'agitazione psicomotoria. (\pm)Cis-4,4'-DMAR a 1 mg/kg, inefficace da solo, quando co-somministrato con (\pm)trans-4,4'-DMAR a 30 mg/kg ha indotto agitazione psicomotoria nel 50% dei trattati topi con una durata dell'effetto di circa un'ora. A 10 mg/kg (\pm)cis-4,4'-DMAR ha provocato agitazione psicomotoria nel 100% dei topi trattati con un effetto che è iniziato dopo circa trenta minuti ed è durato per circa due ore; al contrario, quando co-iniettato con (\pm)trans-4,4'-DMAR l'effetto stimolante iniziava circa quattro minuti dopo la somministrazione del farmaco e persisteva per circa tre ore ($t = 3.900$, $df = 10$; $p = 0,030$). Inoltre, la co-somministrazione di (\pm)cis-4,4'-DMAR a 10 mg/kg con (\pm)trans-4,4'-DMAR a 30 mg/kg ha indotto sudorazione e salivazione nel 33% degli animali, ipertermia (Δ° C~1,6 $^{\circ}$ C; $t = 11,80$, $df = 10$; $p < 0,0001$) e maggiore aggressività stimolata, misurata come numero di morsi ($t = 16,99$, $df = 10$; $p < 0,0001$). La co-somministrazione della dose più alta di (\pm)cis-4,4'-DMAR (60 mg/kg) con (\pm)trans-4,4'-DMAR a 30 mg/kg ha promosso la salivazione nel 50% dei topi, causato ipertermia (Δ° C~2,25 $^{\circ}$ C), ed aumentato la durata degli episodi

convulsivi ($t = 2,996$, $df = 10$; $p = 0,0134$) riducendo il numero di episodi ($t = 2,439$, $df = 10$; $p = 0,0349$), e ha causato più rapidamente la morte dei topi ($t = 3.063$, $df = 10$; $p = 0,0120$).

4.2 Analisi dell'escrezione urinaria

I dati precedentemente pubblicati hanno mostrato che i principali marcatori di assunzione per (\pm) *cis*-4,4'-DMAR erano i metaboliti carbossilato (M2) e mono-idrossilato (M1, M3) dove M2 era il metabolita più escreto rilevato nelle urine dei topi campioni, mentre il (\pm)*trans*-4,4'-DMAR non ha mostrato un metabolismo di fase I/II.



Nel presente studio, i livelli di escrezione di M1, M2 e M3 sono stati confrontati nei due gruppi di topi ((\pm)*cis* vs (\pm)*cis*+(\pm)*trans*). Lo scopo era valutare i cambiamenti nel profilo di escrezione di questi metaboliti (M1-M3) tra i due gruppi. I livelli di escrezione dei singoli metaboliti sono stati confrontati come rapporto percentuale. Questo rapporto è stato calcolato considerando l'escrezione del composto progenitore, assumendo come 100% la percentuale di (\pm)*cis*-4,4'-DMAR. I dati sono stati riportati graficamente come box plot, con i valori minimo, massimo, mediano e medio (Figura 8).

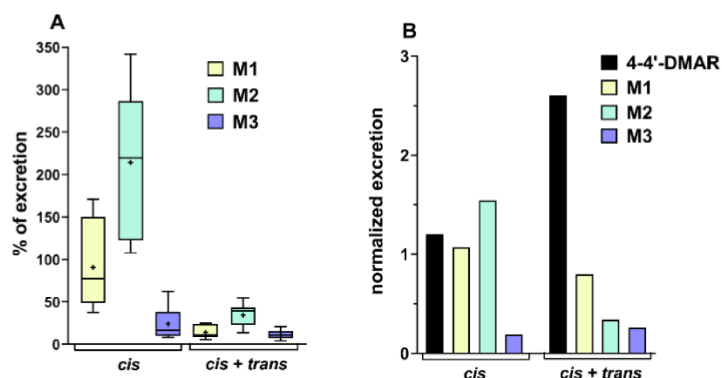


Figura 8. (A) Rapporto percentuale di escrezione di M1, M2 e M3, i principali metaboliti di *cis*-4,4'-DMAR dopo somministrazione di una dose di 10 mg/kg di 4,4'-DMAR (*cis*) e la stessa dose di entrambi gli isomeri

(cis + trans). I box plot riportano il valore massimo e minimo, la mediana e la media (+). (B) Dati di escrezione di 4,4'-cis-DMAR e dei suoi principali metaboliti normalizzati alla somma di escrezione di 4,4'-DMAR e dei suoi metaboliti. Dati normalizzati e riportati, rispettivamente, per la somministrazione di isomeri cis o cis + trans alla dose di 10 mg/kg.

I valori mostrati rappresentano la somma dell'escrezione di (\pm)cis-4,4'-DMAR e dei suoi metaboliti nell'intervallo di ore considerato. I risultati hanno mostrato che la sola somministrazione di (\pm)cis-4,4'-DMAR ha portato all'escrezione di M1 e in particolare di M2 in quantità maggiori rispetto al composto progenitore. Inoltre, è stata osservata una significativa variabilità dei dati per tutti i metaboliti, che potrebbe essere attribuita alla natura variabile dell'escrezione tra diversi topi e intervalli di tempo. I risultati erano significativamente differenti nel caso di co-somministrazione di entrambi gli isomeri. Per tutti i metaboliti si è osservata una notevole riduzione dei valori di escrezione rispetto al composto originario, principalmente per i metaboliti M1 e M2. Il marker principale M2 ha mostrato valori percentuali massimi pari alla metà dell'escrezione del composto progenitore mentre i valori medi di tutti e tre i metaboliti erano significativamente inferiori a tale valore. Questa osservazione potrebbe essere spiegata da un'inibizione del metabolismo dell'isomero (\pm)cis causata dalla co-somministrazione con l'isomero (\pm)trans. La variabilità relativamente bassa dei dati potrebbe essere spiegata dal ridotto metabolismo del composto progenitore, che ha comportato una minore escrezione dei metaboliti e di conseguenza minori livelli di variabilità interindividuale. Ciò è stato evidenziato anche dal confronto dei dati di escrezione mostrati nella Figura 8 con i dati normalizzati alla somma dell'escrezione di 4,4'-DMAR e dei suoi metaboliti.

4.3 Studi istologici ed immunoistochimici

La lettura dei preparati istologici ha permesso di apprezzare un lieve edema cerebrale nei soggetti trattati con l'isomero cis- rispetto ai controlli. Non si sono rilevate alterazioni apprezzabili a livello cardiaco o degli altri organi.

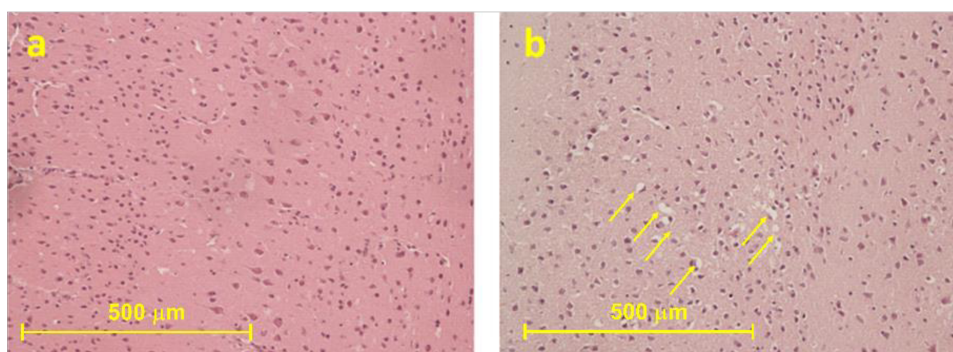


Figura 9. Encefalo, 400x, ematossilina-eosina; controllo (a) vs (\pm)cis-4,4'-DMAR 30 mg/kg.

L'osservazione preliminare dei preparati immunohistochimici ha mostrato un andamento simile dei vari marcatori in diverse aree encefaliche (corteccia, striato, ippocampo, cervelletto), per cui la quantificazione dell'espressione degli stessi è stata eseguita esclusivamente sulla corteccia frontale. I preparati di encefalo derivanti da topi cui era stato somministrato (\pm)trans-4-4'-DMAR risultavano del tutto sovrapponibili ai controlli.

La somministrazione sistemica di (\pm)cis-4-4'-DMAR (10–60 mg/kg) ha aumentato l'espressione di marcatori di stress ossidativo/nitrosativo (8-OHdG, iNOS e NT), apoptosi (Smac/DIABLO e NF- κ B) e heat shock proteins (HSP27 e HSP70) nella corteccia frontale dei topi. Inoltre, la co-somministrazione di (\pm)cis-4-4'-DMAR (10 e 60 mg/kg) con una dose inefficace di (\pm)trans-4-4'-DMAR (30 mg/kg) ha potenziato l'iperespressione di iNOS, Smac/DIABLO e HSP27 a dimostrazione dell'aumentata azione della co-somministrazione di (\pm)cis e (\pm)trans.

In dettaglio, la somministrazione sistemica di (\pm)cis-4-4'-DMAR a 30 e 60 mg/kg ha aumentato l'immunoreattività per 8-OHdG nella corteccia frontale dei topi (ANOVA unidirezionale; $F(3,30) = 3.507$, $p = 0.0272$; Figura 10A).

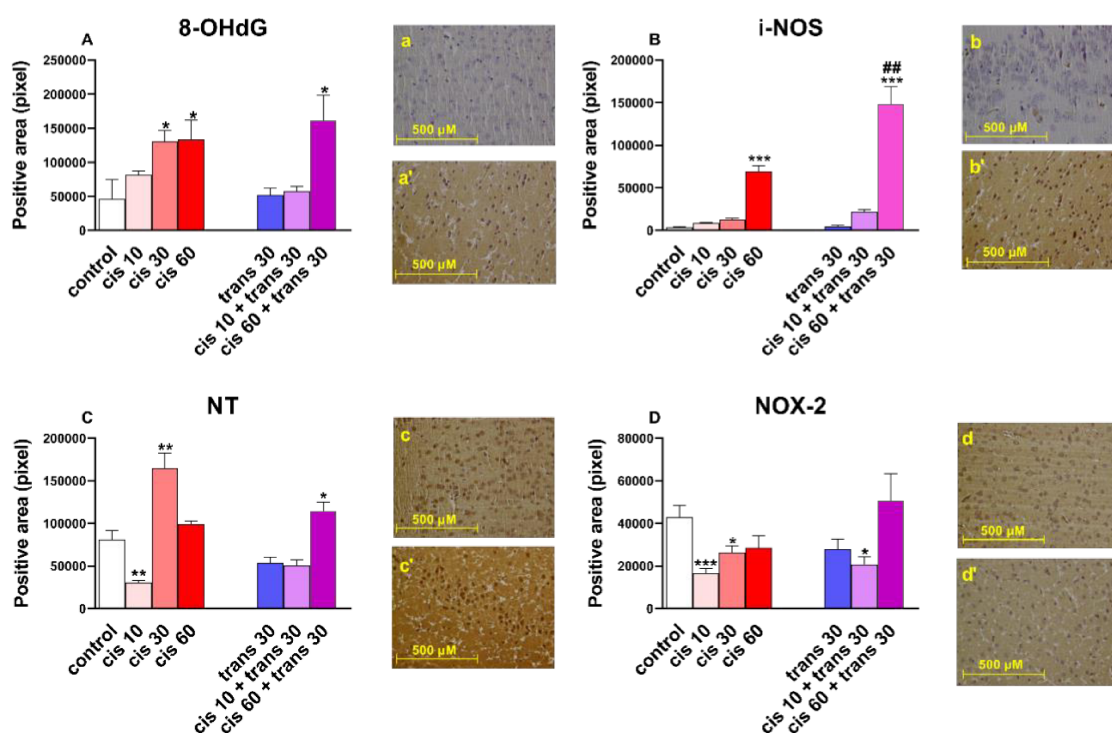


Figura 10. (A) Quantificazione e confronto delle aree positive per 8-OHdG nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((\pm) cis 10, (\pm) cis 30, (\pm) cis 60, (\pm) trans 30, (\pm) trans 30 + (\pm)cis 10, (\pm)trans 30 + (\pm)cis 60). Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) dell'immunocolorazione 8-OHdG (aree marroni) nella corteccia di topi che hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((\pm) cis 30, (a')) e controlli (a). (B) Quantificazione e confronto delle aree positive per iNOS nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((\pm) cis 10, (\pm) cis 30, (\pm) cis 60, (\pm) trans 30, (\pm) trans 30 + (\pm)cis 10, (\pm)trans 30 + (\pm)cis 60). Confronto tra (\pm)cis 60 e (\pm)trans 30 + (\pm)cis 60 [#]. Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) dell'immunocolorazione iNOS nella corteccia di topi che

hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((±) cis 60, (b') e controlli (b). (C) Quantificazione e confronto delle aree positive per NT (nitrotirosina) nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((±) cis 10, (±) cis 30, (±) cis 60, (±) trans 30, (±)trans 30 + (±)cis 10, (±)trans 30 + (±)cis 60). Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) di immunocolorazione NT nella corteccia di topi che hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((±) cis 30, (c') e controlli (c). (D) Quantificazione e confronto delle aree NOX2 positive nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((±) cis 10, (±) cis 30, (±) cis 60, (±) trans 30, (±) trans 30 + (±)cis 10, (±)trans 30 + (±)cis 60). Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) dell'immunocolorazione NOX2 nella corteccia di topi che hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((±) cis 30, (d') e controlli (d).

La co-somministrazione di (±)cis-4-4'-DMAR (a 10 e 60 mg/kg), con la dose inefficace di (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg non ha modificato significativamente l'espressione di 8-OHdG nella corteccia frontale rispetto a quella indotta dalla singola iniezione di (±) cis-4-4'-DMAR (ANOVA unidirezionale ha mostrato $F(5,44) = 4.109$, $p = 0.0038$; Figura 10A). La somministrazione sistemica di (±) cis-4-4'-DMAR a 60 mg/kg ha aumentato l'espressione di iNOS nella corteccia frontale dei topi (ANOVA unidirezionale ha mostrato $F(3,30) = 87,32$, $p < 0,0001$; Figura 10B). L'effetto di (±)cis-4-4'-DMAR a 60 mg/kg è stato potenziato quando co-iniettato con (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg (ANOVA ha mostrato $F(5,44) = 4,109$, $p = 0,0038$; Figura 3B). La co-iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 10 mg/kg con (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg non ha sovraespresso l'immunoreattività per iNOS. La somministrazione di (±)cis-4-4'-DMAR ha ridotto a 10 mg/kg e aumentato a 30 mg/kg l'espressione di 3-nitrotirosina (NT) nella corteccia frontale (ANOVA unidirezionale ha mostrato $F(3,30) = 25,64$, $p < 0,0001$; Figura 3C). Alla dose più alta di 60 mg/kg (±)cis-4-4'-DMAR non ha influenzato l'espressione di NT. L'effetto di (±)cis-4-4'-DMAR a 60 mg/kg è stato potenziato quando co-iniettato con la dose inefficace di (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg (un ANOVA ha mostrato $F(5,44) = 16,23$, $p < 0,0001$; Figura 10C). La co-iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 10 mg/kg con (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg non ha modificato l'immunoreattività di NT. La somministrazione di (±)cis-4-4'-DMAR ha ridotto a 10 e 30 mg/kg l'espressione di NOX-2 (ANOVA unidirezionale ha mostrato $F(3,30) = 6.179$, $p = 0,0038$; Figura 10D). Alla dose massima di 60 mg/kg (±)cis-4-4'-DMAR non ha influenzato l'espressione di NOX-2. La co-iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 10 e 60 mg/kg con (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg non ha modificato l'immunoreattività di NOX-2 rispetto a quello indotto dalla singola iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR (ANOVA unidirezionale; $F(5,44) = 3,935$, $p = 0,0051$; Figura 10D). La somministrazione sistemica di (±)cis-4-4'-DMAR a 30 e 60 mg/kg ha aumentato l'espressione di Smac/DIABLO (ANOVA unidirezionale; $F(3,30) = 49,50$, $p < 0,0001$; Figura 11A).

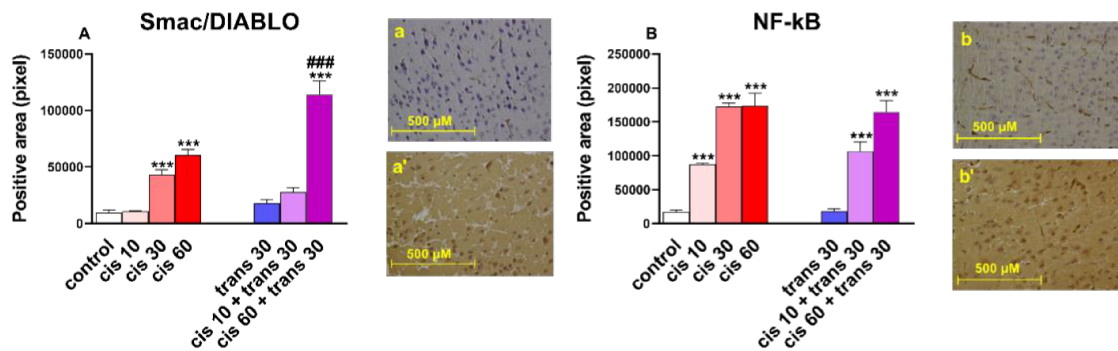


Figura 11. Quantificazione e confronto delle aree positive per Smac/DIABLO nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((±) cis 10, (±) cis 30, (±) cis 60, (±) trans 30, (±) trans 30 + (±)cis 10, (±)trans 30 + (±)cis 60). Confronto tra (±)cis 60 e (±)trans 30 + (±)cis 60 [#]. Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) dell'immunocolorezione Smac/DIABLO (aree marroni) nella corteccia di topi che hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((±)trans 30+(±)cis 60, (a') e controlli (a). (B) Quantificazione e confronto delle aree positive per NF-κB nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((±) cis 10, (±) cis 30, (±) cis 60, (±) trans 30, (±)trans 30 + (±)cis 10, (±)trans 30 + (±)cis 60). Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) dell'immunocolorezione NF-κB nella corteccia di topi che hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((±) cis 10, (b') e controlli (b).

L'effetto di (±)cis-4-4'-DMAR a 60 mg/kg è stato potenziato quando co-iniettato con la dose inefficace di (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg (ANOVA; $F(5,44) = 51,94$, $p < 0,0001$; Figura 11A). La co-iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 10 mg/kg con (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg non ha causato sovraespressione di Smac/DIABLO.

La somministrazione di (±)cis-4-4'-DMAR a 10, 30 e 60 mg/kg ha aumentato l'espressione di NF-κB nella corteccia frontale dei topi (ANOVA unidirezionale; $F(3,30) = 49,50$, $p < 0,0001$; Figura 11B). L'effetto di (±)cis-4-4'-DMAR a 10 e 60 mg/kg non è stato modificato quando co-iniettato con la dose inefficace di (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg (ANOVA unidirezionale; $F(5,44) = 51,94$, $p < 0,0001$; Figura 11B).

(±)Cis-4-4'-DMAR a 30 e 60 mg/kg ha aumentato l'espressione di HSP27 nella corteccia frontale (ANOVA unidirezionale ha mostrato $F(3,30) = 55,12$, $p < 0,0001$; Figura 12A), mentre (±)cis-4-4'-DMAR a 10 mg/kg, da solo, risultava inefficace. La co-iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 10 e 60 mg/kg con (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg causato l'iperespressione di HSP27 rispetto a quello indotto dalla singola iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR (ANOVA unidirezionale; $F(5,44) = 63,85$, $p < 0,0001$; Figura 12A).

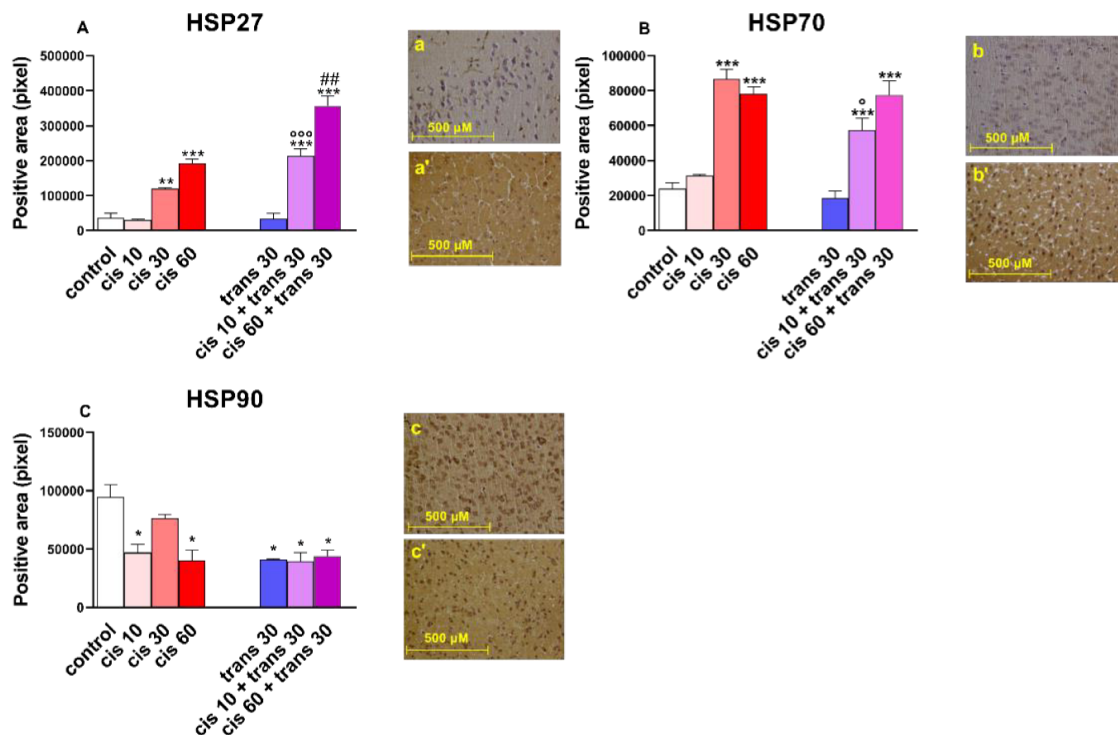


Figura 12. Quantificazione e confronto delle aree positive per HSP27 nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((±) cis 10, (±) cis 30, (±) cis 60, (±) trans 30, (±) trans 30 + (±)cis 10, (±)trans 30 + (±)cis 60). Confronto tra (±)cis 60 e (±)trans 30 + (±)cis 60 [#]. Confronto tra (±)cis 10 e (±)trans 30 + (±)cis 10 [°]. Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) di immunocolorazione HSP27 (aree marroni) nella corteccia di topi che hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((±) cis 60, (a') e controlli (a). (B) Quantificazione e confronto delle aree positive per HSP70 nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((±) cis 10, (±) cis 30, (±) cis 60, (±) trans 30, (±) trans 30 + (±)cis 10, (±)trans 30 + (±)cis 60). Confronto tra (±)cis 10 e (±)trans 30 + (±)cis 10 [°]. Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) dell'immunocolorazione HSP70 nella corteccia di topi che hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((±) cis 60, (b') e controlli (b). (C) Quantificazione e confronto delle aree positive per HSP90 nei controlli rispetto ai topi 4-4'-DMAR ((±) cis 10, (±) cis 30, (±) cis 60, (±) trans 30, (±) trans 30 + (±)cis 10, (±)trans 30 + (±)cis 60). Immagine rappresentativa (microscopia ottica, 40x) dell'immunocolorazione HSP90 nella corteccia di topi che hanno ricevuto 4-4'-DMAR ((±) cis 30, (c') e controlli (c).

(±)Cis-4-4'-DMAR a 30 e 60 mg/kg ha causato l'iperpressione di HSP70 nella corteccia frontale (ANOVA unidirezionale; $F(3,30) = 73.77$, $p < 0,0001$; Figura 12B), mentre (±)cis-4-4'-DMAR a 10 mg/kg, da solo, risultava inefficace. La co-iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 10 mg/kg con la dose inefficace di (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg ha causato iperpressione di HSP70 rispetto a quella indotta dalla singola iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR (ANOVA unidirezionale; $F(5,44) = 26,72$, $p < 0,0001$; Figura 12B). Al contrario, la co-iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 60 mg/kg con la dose inefficace di (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg ha aumentato l'immunoreattività di HSP70 analogamente a quello indotto dalla singola iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 60 mg/kg.

(±)Cis-4-4'-DMAR ha ridotto a 10 e 30 mg/kg l'immunoreattività per HSP90 nella corteccia frontale (ANOVA unidirezionale; $F(3,30) = 9,819$, $p = 0,0001$; Figura 12C). Il (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg ha ridotto l'espressione di HSP90, mentre la co-iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR a 10 e 60 mg/kg con (±)trans-4-4'-DMAR a 30 mg/kg non ha modificato l'immunoreattività di HSP90 rispetto a quella indotta dalla singola iniezione di (±)cis-4-4'-DMAR (ANOVA unidirezionale; $F(5,44) = 9,040$, $p < 0,0001$; Figura 12C).

5 Discussione

Il presente studio ha dimostrato per la prima volta la tossicità del (±)cis-4,4'-DMAR nei topi, con effetti incrementativi se assunto insieme alla forma (±)trans-4,4'-DMAR in miscele racemiche. (±)Cis-4,4'-DMAR ha causato agitazione psicomotoria, sudorazione, salivazione, ipertermia, stimolazione dell'aggressività, convulsioni e morte, indotte in modo dose-dipendente. Al contrario, il (±)trans-4,4'-DMAR risultava inattivo. Tuttavia, la loro co-somministrazione ha comportato un peggioramento degli effetti tossici causati da (±)cis-4,4'-DMAR, inducendo ipertermia rapida e grave, convulsioni e morte degli animali. L'analisi immunoistochimica ha mostrato che questa intossicazione acuta ha causato un'elevata espressione di marcatori di stress ossidativo/nitrosativo (8-OHdG, iNOS, NT e NOX2), apoptosi (Smac/DIABLO e NF-κB) e proteine da shock termico (HSP27, HSP70, HSP90) nella corteccia frontale, suggerendo un potenziale danno neurotossico. Gli studi sull'escrezione urinaria hanno suggerito che il peggioramento dei parametri fisiologici e neuro-comportamentali potrebbe essere correlato all'inibizione del metabolismo della forma (±)cis-4,4'-DMAR da parte del (±)trans-4,4'-DMAR. Un punto di forza del presente studio riguarda la sua rilevanza clinico-tossicologica dovuta all'uso di dosi di 4-4'-DMAR nei topi equivalenti a quelle utilizzate nell'uomo (HED; dose equivalente umana); queste erano associate a risposte lievi, intermedie e forti (Figura 13).

Mouse Dose (mg/kg)	HED	Human Dose	Human Dosage	Effects
	(mg/kg)	(mg)		
0.1	0.0081	0.486	<i>Low</i>	high state of vigilance, euphoria, decreased appetite, increased frequency of heartbeat and motor activity
1	0.081	4.86		
3	0.243	14.58		
10	0.81	48.6	<i>Intermediate</i>	restlessness, agitation and insomnia
30	2.43	145.8	<i>high</i>	involve severe anorexia, mild paranoia (sometimes hallucinations), hyperthermia, bruxism, facial spasms, an increase in aggression and desire for violence, seizures, an increased heart rate that will be involved in a cardiac arrest
60	4.86	291.6		

Figura 13. 4,4'-DMAR - HED

Sebbene lo studio sia basato esclusivamente sul modello murino preclinico, questo potrebbe consentire una valutazione traslazionale degli effetti farmaco-tossicologici che potrebbero essere osservati nell'uomo. Le alterazioni dei parametri fisiologici e neuro-comportamentali osservate nei topi risultavano coerenti con le manifestazioni cliniche tipicamente osservate nei consumatori di 4-4'-DMAR, con sintomi e segni che includevano agitazione psicomotoria, sudorazione, salivazione, ipertermia, aggressività, convulsioni e possibile morte^{14 10}. Questo quadro è probabilmente correlato all'aumento del rilascio di catecolamine e alla trasmissione serotonergica facilitata¹³.

Analogamente a 4-MAR, l'agitazione psicomotoria è stato il primo effetto comportamentale osservato dopo la somministrazione di (±) cis-4,4'-DMAR; non solo per un aumento dell'attività di locomozione spontanea, ma anche per uno schema di "iperattività insolita" (ad es. spostamenti orizzontali rapidi e improvvisi in tutte le direzioni, comportamento di virata sostenuti, cadute involontarie dal piatto alto durante la valutazione dei test, stereotipie di movimento).

Il comportamento di svolta e le stereotipie indotte da 4-4'-DMAR sono state tipicamente riportate dopo la somministrazione di altri stimolanti sintetici, come anfetamine, 4-MAR, MDPV, mefedrone, metedrone, α -PVP, α -PBP, 4'-MePPP, MDMA e MPA^{27 28 29 30}.

Sebbene un precedente studio abbia dimostrato che la stimolazione motoria e le stereotipie causate dal 4-MAR siano indipendenti dalla serotonina e prevenute solo dal blocco dei recettori dopaminergici D1 e D2²⁷, gli effetti motori indotti dal 4-4'-DMAR potrebbero dipendere anche sul segnale serotonergico, dato il suo profilo farmacodinamico più simile a quello dell'MDMA rispetto a 4-MAR e aminorex.

(±)Cis-4,4'-DMAR ha causato agitazione psicomotoria associata a aggressività stimolata nei topi, quadro già osservato per altri psicostimolanti come cocaina, MDPV, metiopropamina, metanfetamina, anfetamina, e caratteristico negli utilizzatori di stimolanti

²⁷ Batsche, K.; Ashby, C.R., Jr.; Lee, C.; Schwartz, J.; Wang, R.Y. The behavioral effects of the stereoisomers of 4-methylaminorex, a psychostimulant, in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, 269, 1029–1039.

²⁸ Badiani, A.; Oates, M.M.; Day, H.E.W.; Watson, S.J.; Akil, H.; Robinson, T.E. Amphetamine-Induced Behavior, Dopamine Release, and c-fosmRNA Expression: Modulation by Environmental Novelty. *J. Neurosci.* 1998, 18, 10579–10593.

²⁹ De-Giorgio, F.; Bilel, S.; Tirri, M.; Arfè, R.; Trapella, C.; Camuto, C.; Foti, F.; Frisoni, P.; Neri, M.; Botrè, F.; et al. Methiopropamine and its acute behavioral effects in mice: Is there a gray zone in new psychoactive substances users? *Int. J. Leg. Med.* 2020, 134, 1695–1711.

³⁰ Marti, M.; Neri, M.; Bilel, S.; Di Paolo, M.; LA Russa, R.; Ossato, A.; Turillazzi, E. MDMA alone affects sensorimotor and prepulse inhibition responses in mice and rats: Tips in the debate on potential MDMA unsafety in human activity. *Forensic Toxicol.* 2019, 37, 132–144.

sintetici e in particolare di catinoni, che possono dare origine alla cosiddetta sindrome da delirio eccitato (EDS)^{31 32}.

Una delle principali alterazioni dei parametri causate da (\pm)cis-4,4'-DMAR è stata l'ipertermia. Nelle nostre condizioni sperimentali (temperatura ambiente 22-23°C), (\pm)cis-4,4'-DMAR ha indotto ipertermia, coerentemente con quanto osservato con altri stimolanti sintetici come MDMA, metanfetamina, cocaina, metilone, MDPV, α -PVP^{33 34 35}.

L'ipertermia, che è uno dei sintomi della sindrome serotoninergica, può essere sostenuta da un aumento del segnale serotoninergico, che ha un legame diretto con la termoregolazione. (\pm)Cis-4,4'-DMAR, promuovendo la trasmissione serotoninergica e possibilmente attivando i recettori 5HT_{2A/C}, potrebbe indurre ipertermia, aumentando il metabolismo, ed inducendo iperattività, accoppiata con ipertermia, e causando vasocostrizione periferica; questo scenario è stato tipicamente riportato anche per MDMA e cocaina^{35 36}. Tuttavia, anche il rilascio di noradrenalina indotto da 4,4'-DMAR può spiegare il suo effetto ipertermico. Inoltre, l'aumento dei livelli plasmatici di noradrenalina può portare a una perdita di dissipazione del calore attraverso la vasocostrizione mediata da α 1AR, mentre la stimolazione dei recettori adrenergici α 1 e β 3 può agire a livello mitocondriale nel muscolo scheletrico, disaccoppiando la proteina-3 (UCP-3) che induce la termogenesi. Nel complesso, l'ipertermia è considerata un potenziale effetto avverso acuto grave e potenzialmente fatale. Secondo la letteratura, questa condizione può essere associata a una serie di complicanze quali edema cerebrale, rabdomiolisi, iponatriemia, coagulazione intravascolare disseminata (CID) e coma.

Le convulsioni sono tra gli effetti avversi più pericolosi causati nell'uomo dagli psicostimolanti. La somministrazione sistemica di (\pm)cis-4,4'-DMAR ha causato

³¹ Penders, T.M.; Gestring, R.E.; Vilensky, D.A. Intoxication Delirium following Use of Synthetic Cathinone Derivatives. *Am. J. Drug Alcohol Abus.* 2012, 38, 616–617.

³² Kasick, D.P.; McKnight, C.A.; Klisovic, E. “Bath Salt” Ingestion Leading to Severe Intoxication Delirium: Two Cases and a Brief Review of the Emergence of Mephedrone Use. *Am. J. Drug Alcohol Abus.* 2012, 38, 176–180.

³³ Glennon, R.A.; Young, R. Neurobiology of 3,4-methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP). *Brain Res. Bull.* 2016, 126 Pt 1, 111–126.

³⁴ Albers, D.S.; Sonsalla, P.K. Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: Pharmacological profile of protective and nonprotective agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, 275, 1104–1114.

³⁵ Kiyatkin, E.A.; Kim, A.H.; Wakabayashi, K.T.; Baumann, M.; Shaham, Y. Effects of Social Interaction and Warm Ambient Temperature on Brain Hyperthermia Induced by the Designer Drugs Methylone and MDPV. *Neuropsychopharmacology* 2014, 40, 436–445.

³⁶ Nakamura, M.; Shintani-Ishida, K.; Ikegaya, H. 5-HT_{2A} Receptor Agonist-Induced Hyperthermia Is Induced via Vasoconstriction by Peripheral 5-HT_{2A} Receptors and Brown Adipose Tissue Thermogenesis by Peripheral Serotonin Loss at a High Ambient Temperature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2018, 367, 356–362.

convulsioni nei topi, così come rilevato con altri stimolanti quali cocaina³⁷, MDMA³⁸, metanfetamina e 4-metilamminorex.

In particolare, l'iniezione sistemica di (±)cis-4,4'-DMAR ha indotto convulsioni e morte dose-dipendenti nel topo maschio adulto a 30 mg/kg, con letalità di circa il 50%, e a 60 mg/kg, con una letalità di circa il 100%.

Sorprendentemente, nel presente studio, il (±)trans-4,4'-DMAR da un punto di vista neuro-comportamentale e fisiologico non è risultato di per sé attivo, ma era in grado di potenziare gli effetti di (±)cis-4,4'-DMAR e ne ha aumentato la tossicità. Al momento, non sono stati condotti altri studi farmacologici in vivo con lo stereoisomero (±)trans-4,4'-DMAR, mentre è stato pubblicato solo uno studio farmacodinamico in vitro che mostra che (±)trans-4,4'-DMAR presenta una potenza inferiore rispetto allo stereoisomero (±) cis-4,4'-DMAR¹⁶. Tuttavia, in un recente studio di farmacocinetica è stato riscontrato che, mentre il composto (±)cis-4,4'-DMAR viene metabolizzato ed escreto nell'urina del topo, lo stereoisomero (±)trans-4,4'-DMAR non viene metabolizzato²⁵ suggerendo un metabolismo stereoselettivo. Inoltre, il (±)trans-4,4'-DMAR potrebbe avere un diverso legame con le proteine plasmatiche o tissutali, evenienza comune nelle molecole chirali. Ulteriori studi dovranno essere intrapresi per indagare su questo aspetto. Tuttavia, i dati in nostro possesso mostrano che il (±)trans-4,4'-DMAR, sebbene inattivo dal punto di vista neuro-comportamentale, ha causato una minore escrezione urinaria dei metaboliti (M1 e M2) del (±) cis-4,4'-DMAR, causando un aumento del (±) cis-4,4'-DMAR stesso (Figura 8). Ciò suggerirebbe che il (±)trans-4,4'-DMAR possa inibire il metabolismo (±)cis-4,4'-DMAR, aumentando così i suoi livelli di biodisponibilità. Questa ipotesi risulta altresì coerente con il peggioramento delle alterazioni neurocomportamentali osservate negli stessi animali in cui sono stati effettuati gli studi sull'escrezione urinaria. Il peggioramento degli effetti farmaco-tossicologici derivanti dalla co-somministrazione di (±)cis-4,4'-DMAR e (±)trans-4,4'-DMAR è stato drammatico (Figura 7), dimostrando il grande pericolo dovuto all'assunzione di questi stereoisomeri in miscela, come purtroppo potrebbe accadere con preparati acquistati sul web.

3.5. Studi immunoistochimici

Questo è stato il primo studio a indagare sul danno cerebrale indotto da 4,4'-DMAR. I risultati degli studi in vivo hanno suggerito il verificarsi di fenomeni legati ad alterazioni del

³⁷ Miller, K.A.; Witkin, J.M.; Ungard, J.T.; Gasior, M. Pharmacological and behavioral characterization of cocaine-kindled seizures in mice. *Psychopharmacology* 2000, 148, 74–82.

³⁸ Hanson, G.R.; Jensen, M.; Johnson, M.; White, H.S. Distinct features of seizures induced by cocaine and amphetamine analogs. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 377, 167–173.

SNC (ad es. ipertermia; convulsioni). Alla luce di ciò, e per analogia con altri stimolanti (es. MDMA¹⁹ e cocaina³⁹) abbiamo ipotizzato che, in seguito all'assunzione di 4,4'-DMAR, si possa verificare stress ossidativo e/o nitrosativo nell'encefalo.

Abbiamo quindi valutato l'espressione di 8-OHdG (8-idrossi-2'-deossiguanosina), un marker di danno ossidativo indotto da ROS (specie reattive dell'ossigeno) sul DNA⁴⁰, osservandone la sovraespressione nei topi trattati con 4-4'-DMAR, e in particolare, ai dosaggi più elevati ((±) cis 30, (±) cis 60 e (±) trans 30 + (±) cis 60). Questi risultati suggeriscono che la somministrazione di 4-4'-DMAR ha, in questo caso, causato danno al DNA mediato da ROS. Abbiamo quindi valutato l'espressione di NOX2 (NADPH ossidasi 2), uno dei principali enzimi produttori di ROS, che invece non risultava aumentato nei topi trattati rispetto ai controlli. Si potrebbe quindi dedurre che nel meccanismo del danno al DNA mediato da ROS indotto da 4-4'-DMAR siano coinvolte altre vie, che dovranno essere studiate in ricerche future. Tra queste, potrebbe esservi la produzione di superossido da parte di iNOS (ossido nitrico sintetasi inducibile), fenomeno che può verificarsi in condizioni di stress ossidativo⁴¹. Questo enzima, che nei neuroni è responsabile della produzione di una quota di NO, in condizioni di stress può produrlo rapidamente, portando alla produzione di perossinitrito, potente ossidante e agente nitrante. Abbiamo osservato che l'espressione di iNOS nei topi trattati è maggiore rispetto ai controlli, in particolare alla dose di (±) cis 60 e (±) trans 30 + (±) cis 60, c'è un grande aumento dell'espressione di iNOS ($p < 0.001$).

Era quindi ragionevole aspettarsi il verificarsi di danni derivati da specie reattive dell'azoto (RNS). Dunque, abbiamo studiato l'espressione di NT, noto per essere un marker diretto di stress nitrosativo, essendo il prodotto della nitratura della tirosina mediata da RNS come l'anione perossinitrito e il biossido di azoto, formato in presenza di NO⁴². Abbiamo osservato un aumento statisticamente significativo di NT alle dosi (±) cis 30 e (±) trans 30 + (±) cis 60, ma non alla dose (±) cis 60. Alla dose di (±) cis 10, NT era addirittura ridotto rispetto ai controlli. Dall'analisi di questi dati è possibile ipotizzare l'insorgenza di stress nitrosativo in seguito alla somministrazione di 4-4'-DMAR, tuttavia non è possibile trarre conclusioni sull'effetto che questo abbia sul DNA cellulare.

³⁹ Poon, H.F.; Abdullah, L.; Mullan, M.A.; Mullan, M.J.; Crawford, F.C. Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. *Neurochem. Int.* 2007, 50, 69–73.

⁴⁰ Valavanidis, A.; Vlachogianni, T.; Fiotakis, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health Part C* 2009, 27, 120–139.

⁴¹ Tejero, J.; Shiva, S.; Gladwin, M.T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol. Rev.* 2019, 99, 311–379.

⁴² Ischiropoulos, H. Biological Tyrosine Nitration: A Pathophysiological Function of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, 356, 1–11.

Si ribadisce che i risultati riportati nello studio sono relativi all'analisi della corteccia frontale, tuttavia, da un'analisi preliminare non abbiamo rilevato cambiamenti in aree specifiche, che invece erano diffusi in tutte le regioni del SNC esaminate (es. corteccia, striato, ippocampo, cervelletto).

Avendo osservato l'insorgenza di ipertermia nei topi trattati con 4-4'-DMAR, abbiamo valutato l'espressione di alcune proteine dello shock termico (HSP27²⁰, HSP70²¹, HSP90²²), che hanno dimostrato di essere correlate alla risposta al danno termico. HSP27 risultava sovraespressa nei topi trattati ai dosaggi di (\pm)cis 30, (\pm)cis 60 e (\pm)trans 30 + (\pm)cis 60. È interessante notare che si è verificato un aumento significativo dell'espressione di HSP27 nei topi trattati con (\pm)trans 30 + (\pm)cis 10 e (\pm)trans 30 + (\pm)cis 60 rispetto a (\pm)cis 10 e (\pm)cis 60. Tale andamento, coerente con i rispettivi incrementi di temperatura registrati in vivo, può suggerire un maggior potenziale della miscela (\pm)cis-(\pm)trans nell'indurre l'ipertermia e la conseguente risposta cellulare adattativa. HSP70 ha mostrato una tendenza simile, con l'eccezione che la somministrazione di (\pm)trans 30 + (\pm)cis 60 non è stata associata all'espressione di HSP70 rispetto a (\pm)cis 60. Una possibile spiegazione è che HSP27 ha mostrato un aumento precoce allo stimolo rispetto a HSP70 ed i topi trattati con (\pm) cis 60 sono tutti morti rapidamente, non consentendo la piena espressione di HSP70²². Per quanto riguarda HSP90, abbiamo osservato una ridotta espressione nei topi trattati con 4-4'-DMAR. Questa tendenza è difficile da spiegare, poiché ci si poteva ragionevolmente aspettare un aumento dell'espressione, analogamente ad altri HSP. HSP90 è fisiologicamente abbondante all'interno della cellula ed è importante nella formazione e nella funzione di diversi complessi proteici che mantengono l'omeostasi cellulare. Inoltre, svolge un ruolo importante nella risposta allo stress termico⁴³. La sua ipoespressione potrebbe, quindi, ridurre la capacità della cellula di resistere allo stress termico e ossidativo indotto dal 4-4'-DMAR.

Il danno termico alla cellula può indurre una fra due opposte risposte: l'apoptosi, che rimuove le cellule danneggiate per prevenire l'infiammazione, e la risposta allo shock termico, per mantenere la sopravvivenza cellulare. L'attività di modulazione dei meccanismi di apoptosi esercitata dalle HSP è ben nota⁴⁴. In particolare, HSP70 agisce su diversi target, tra cui JNK, prevenendo il rilascio del citocromo c dai mitocondri. JNK⁴⁵ è a sua volta coinvolto nel

⁴³ Eppink, B.; Krawczyk, P.M.; Stap, J.; Kanaar, R. Hyperthermia-induced DNA repair deficiency suggests novel therapeutic anti-cancer strategies. *Int. J. Hyperth.* 2012, 28, 509–517.

⁴⁴ Beere, H.M. 'The stress of dying': The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 2004, 117(Pt 13), 2641–2651

⁴⁵ Chauhan, D.; Li, G.; Hideshima, T.; Podar, K.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Munshi, N.; Kharbanda, S.; Anderson, K.C. JNK- dependent Release of Mitochondrial Protein, Smac, during Apoptosis in Multiple Myeloma (MM) Cells. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 17593–17596.

rilascio di Smac/DIABLO. Anche HSP27⁴⁶ sembra avere un ruolo inibitorio sul rilascio di Smac/DIABLO. Infatti, Smac/DIABLO si lega con gli inibitori delle proteine dell'apoptosi (IAP), liberando così le caspasi per attivare l'apoptosi⁴⁷. La nostra valutazione dell'espressione di Smac/DIABLO ha mostrato un aumento significativo alle dosi di (±)cis 30, (±)cis 60 e (±)trans 30 + (±)cis 60. Inoltre, l'espressione di Smac/DIABLO è maggiore in soggetti trattati con (±)trans 30 + (±)cis 60 rispetto a (±)cis 60. Si potrebbe quindi concludere che alte dosi di 4-4'-DMAR abbiano un effetto pro-apoptotico. Questi dati sono coerenti sia con l'andamento dei marker di stress radicalico (in particolare con 8-OHdG e iNOS), sia con l'espressione di HSP27 e HSP70. Tuttavia, non è possibile, con i dati attuali, determinare se il 4-4'-DMAR induca stress ossidativo/nitrosativo di per sé o se questo sia secondario all'ipertermia. Questi due fenomeni sono strettamente correlati considerando, ad esempio, che in condizioni di ipertermia, iNOS contribuisce all'apoptosi NO-dipendente⁴⁸. È stato riportato che i ROS attivino e reprimano la segnalazione di NF-κB. Ad esempio, i ROS spesso stimolano la via NF-κB nel citoplasma, ma inibiscono l'attività di NF-κB nel nucleo⁴⁹. Nella maggior parte dei casi l'espressione dei geni bersaglio di NF-κB promuove la sopravvivenza cellulare, fra questi sono compresi quelli che si oppongono agli effetti dei ROS⁵⁰. Alla luce di ciò, la nostra osservazione di sovraespressione di NF-κB nei topi trattati con 4-4'-DMAR non è sorprendente. Per quanto riguarda le analisi istologiche, il riscontro di lieve edema cerebrale è coerente con quanto osservato nei decessi associati al 4,4'-DMAR¹⁷.

⁴⁶ Chauhan, D.; Li, G.; Hideshima, T.; Podar, K.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Catley, L.; Tai, Y. T.; Hayashi, T.; Shringarapur, R.; et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 2003, *102*, 3379–3386.

⁴⁷ Morrish, E.; Brumatti, G.; Silke, J. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells* 2020, *9*, 406.

⁴⁸ Aravindan, N.; Mohan, S.; Herman, T. S.; Natarajan, M. Nitric oxide mediated inhibition of NFκB regulates hyperthermia-induced apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 2009, *106*, 999–1009.

⁴⁹ Kabe, Y.; Ando, K.; Hirao, S.; Yoshida, M.; Handa, H. Redox Regulation of NFκB Activation: Distinct Redox Regulation between the Cytoplasm and the Nucleus. *Antioxid. Redox Signal.* 2005, *7*, 395–403.

⁵⁰ Morgan, M. J.; Liu, Z.-G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 2010, *21*, 103–115.

6 Conclusioni

I risultati emersi dallo studio, preclinico ed in condizioni controllate, hanno evidenziato meccanismi di neurotossicità mediata da 4-4'-DMAR precedentemente misconosciuti o solo ipotizzati. I dati ottenuti possono fornire preziosi spunti sia dal punto di vista clinico che forense.

Il profilo farmacologico del 4-4'-DMAR è risultato assai simile a quello dell'MDMA, rendendo dunque il corteo sintomatico da esso indotto potenzialmente trattabile con le metodiche attualmente utilizzate in medicina d'emergenza per l'intossicazione da MDMA⁵¹ (diazepam per agitazione e convulsioni, raffreddamento corporeo e dantrolene per l'ipertermia, labetalolo per l'ipertensione).

Dal punto di vista tossicologico forense, la miglior caratterizzazione dell'escrezione urinaria può potenzialmente fornire informazioni sulla quantità e sulla natura della sostanza assunta (cis- o miscela cis- + trans-).

Anche il patologo forense può trovare giovamento dagli esiti dello studio. In casi di decessi da 4-4'-DMAR, anche qualora le analisi tossicologiche risultino positive, definire efficaci le concentrazioni rilevate può risultare arduo, stante la scarsità di dati in letteratura. In tal senso, una migliore comprensione del danno d'organo indotto da 4-4'-DMAR, ed in particolare dall'ipertermia risulta fondamentale. Quest'ultima risulta difficilmente apprezzabile post mortem, se non in presenza di precisi dati clinici, circostanziali o di un intervento precoce del medico legale. La possibilità di valutare immunostochimicamente l'espressione delle heat shock proteins potrebbe rivelarsi un metodo efficace per dimostrare l'avvenuta ipertermia e dunque per meglio inquadrare l'efficacia delle concentrazioni di stupefacente rilevate.

Il successivo passo di questa sperimentazione è rappresentato dall'applicazione su tessuti umani dei marcatori esaminati. Ciò, stante la rarità dei decessi da 4-4'-DMAR ben circostanziati dal punto di vista tossicologico, rende fondamentale la formazione di una rete di collaborazione a livello nazionale.

⁵¹ Hall AP, Henry JA, Acute toxic effects of 'Ecstasy' (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management. *British Journal of Anaesthesia*, Volume 96, Issue 6, June 2006, Pages 678-685.

7 Bibliografia

1. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report 2020: Trends and Developments*; Publications Office of the European Union: Lisbon, Portugal, 2020.
2. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction e Europol, *EU drug markets report 2019*. 2019.
3. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report 2021: Trends and Developments*; Publications Office of the European Union: Lisbon, Portugal, 2021.
4. M. Coppola e R. Mondola, «4,4'-DMAR: Chemistry, Pharmacology and Toxicology of a New Synthetic Stimulant of Abuse», *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 117, n. 1, pagg. 26–30, lug. 2015, doi: 10.1111/bcpt.12399.
5. D. Brandt *et al.*, «Characterization of a novel and potentially lethal designer drug (\pm)-cis-para-methyl-4-methylaminorex (4,4'-DMAR, or 'Serotoni')», *Drug Test. Anal.*, vol. 6, n. 7–8, pagg. 684–695, 2014, doi: 10.1002/dta.1668.
6. A. Rickli, K. Kolaczynska, M. C. Hoener, e M. E. Liechti, «Pharmacological characterization of the aminorex analogs 4-MAR, 4,4'-DMAR, and 3,4-DMAR», *NeuroToxicology*, vol. 72, pagg. 95–100, mag. 2019, doi: 10.1016/j.neuro.2019.02.011.
7. T. Hofmaier *et al.*, «Aminorex, a metabolite of the cocaine adulterant levamisole, exerts amphetamine like actions at monoamine transporters», *Neurochem. Int.*, vol. 73, pagg. 32–41, lug. 2014, doi: 10.1016/j.neuint.2013.11.010.
8. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) and Europol, «Early warning notification 2014/7. Link suspected between deaths and new psychoactive substance: 4-methylaminorex, para-methyl derivative». 2014.
9. B. Loi, M. Zloh, M. A. De Luca, N. Pintori, J. Corkery, e F. Schifano, «4,4'-Dimethylaminorex ("4,4'-DMAR"; "Serotoni") misuse: A Web-based study», *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, vol. 32, n. 3, pag. e2575, mag. 2017, doi: 10.1002/hup.2575.
10. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *4,4'-DMAR report on the risk assessment of 4,4'-DMAR in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances*. Luxembourg: Publications Office, 2015.
11. COUNCIL IMPLEMENTING DECISION (EU) 2015/1873 of 8 October 2015; Official Journal of the European Union, 127, 20.5.2005, p. 32.
12. Schedules of Controlled Substances: Placement of 4,4'-DMAR in Schedule I. Federal Register Volume 86, Number 153 (Thursday, August 12, 2021).

13. Maier, J.; Mayer, F.P.; Brandt, S.D.; Sitte, H.H. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Aminorex Analogues. *ACS Chem. Neurosci.* 2018, 9, 2484–2502.
14. Glanville, J.; Dargan, P.; Wood, D.M. 4-Methyl-5-(4-methylphenyl)-4,5-dihydrooxazol-2-amine (4,4' -DMAR, 4,4' -dimethylaminorex): Availability, prevalence of use, desired effects and acute toxicity. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.* 2015, 30, 193–198.
15. Maier, J.; Mayer, F.; Luethi, D.; Holy, M.; Jäntschi, K.; Reither, H.; Hirtler, L.; Hoener, M.C.; Liechti, M.E.; Piffl, C.; et al. The psychostimulant (±)-cis-4,4'-dimethylaminorex (4,4'-DMAR) interacts with human plasmalemmal and vesicular monoamine transporters. *Neuropharmacology* 2018, 138, 282–291.
16. McLaughlin, G.; Morris, N.; Kavanagh, P.V.; Power, J.D.; Twamley, B.; O'Brien, J.; Talbot, B.; Dowling, G.; Mahony, O.; Brandt, S.; et al. Synthesis, characterization, and monoamine transporter activity of the new psychoactive substance 3',4'-methylenedioxy-4-methylaminorex (MDMAR). *Drug Test. Anal.* 2014, 7, 555–564.
17. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *EMCDDA–Europol Joint Report on a New Psychoactive Substance: 4,4'-DMAR (4-Methyl-5-(4-methylphenyl)-4,5-dihydrooxazol-2-amine)*; EMCDDA—Europol Joint Publications: Lisbon, Portugal, 2014.
18. Cosbey S. et al. Multiple Fatalities Involving a New Designer Drug: *Para*-Methyl-4-Methylaminorex. *Journal of Analytical Toxicology*, Volume 38, Issue 6, July/August 2014, Pages 383–384, <https://doi.org/10.1093/jat/bku031>
19. Schiavone, S.; Neri, M.; Maffione, A.B.; Frisoni, P.; Morgese, M.G.; Trabace, L.; Turillazzi, E. Increased iNOS and Nitrosative Stress in Dopaminergic Neurons of MDMA-Exposed Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1242.
20. Tang, S.; Buriro, R.; Liu, Z.; Zhang, M.; Ali, I.; Adam, A.; Hartung, J.; Bao, E. Localization and Expression of Hsp27 and α B-Crystallin in Rat Primary Myocardial Cells during Heat Stress In Vitro. *PLoS ONE* 2013, 8, e69066.
21. Doberentz, E.; Genneper, L.; Böker, D.; Lignitz, E.; Madea, B. Expression of heat shock proteins (hsp) 27 and 70 in various organ systems in cases of death due to fire. *Int. J. Leg. Med.* 2014, 128, 967–978.
22. Luo, M.; Meng, Z.; Moroishi, T.; Lin, K.C.; Shen, G.; Mo, F.; Shao, B.; Wei, X.; Zhang, P.; Wei, Y.; et al. Heat stress activates YAP/TAZ to induce the heat shock transcriptome. *Nat. Cell Biol.* 2020, 22, 1447–1459.

23. Vigolo, A.; Ossato, A.; Trapella, C.; Vincenzi, F.; Rimondo, C.; Seri, C.; Varani, K.; Serpelloni, G.; Marti, M. Novel halogenated derivatives of JWH-018: Behavioral and binding studies in mice. *Neuropharmacology* 2015, *95*, 68–82.
24. Ossato, A.; Bilel, S.; Gregori, A.; Talarico, A.; Trapella, C.; Gaudio, R.M.; DeGiorgio, F.; Tagliaro, F.; Neri, M.; Fattore, L.; et al. Neurological, sensorimotor and cardiorespiratory alterations induced by methoxetamine, ketamine and phencyclidine in mice. *Neuropharmacology* 2018, *141*, 167–180.
25. Chieffi, C.; Camuto, C.; De-Giorgio, F.; de la Torre, X.; Diamanti, F.; Mazzarino, M.; Trapella, C.; Marti, M.; Botrè, F. Metabolic profile of the synthetic drug 4,4'-dimethylaminorex in urine by LC–MS-based techniques: Selection of the most suitable markers of its intake. *Forensic Toxicol.* 2020, *39*, 89–100.
26. Camuto, C.; Pellegrini, S.; De-Giorgio, F.; de la Torre, X.; Marti, M.; Mazzarino, M.; Botrè, F. Urinary excretion profile of methiopropamine in mice following intraperitoneal administration: A liquid chromatography–tandem mass spectrometry investigation. *Drug Test. Anal.* 2020, *13*, 91–100.
27. Batsche, K.; Ashby, C.R., Jr.; Lee, C.; Schwartz, J.; Wang, R.Y. The behavioral effects of the stereoisomers of 4-methylaminorex, a psychostimulant, in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, *269*, 1029–1039.
28. Badiani, A.; Oates, M.M.; Day, H.E.W.; Watson, S.J.; Akil, H.; Robinson, T.E. Amphetamine-Induced Behavior, Dopamine Release, and c-fos mRNA Expression: Modulation by Environmental Novelty. *J. Neurosci.* 1998, *18*, 10579–10593.
29. De-Giorgio, F.; Bilel, S.; Tirri, M.; Arfè, R.; Trapella, C.; Camuto, C.; Foti, F.; Frisoni, P.; Neri, M.; Botrè, F.; et al. Methiopropamine and its acute behavioral effects in mice: Is there a gray zone in new psychoactive substances users? *Int. J. Leg. Med.* 2020, *134*, 1695–1711.
30. Marti, M.; Neri, M.; Bilel, S.; Di Paolo, M.; La Russa, R.; Ossato, A.; Turillazzi, E. MDMA alone affects sensorimotor and prepulse inhibition responses in mice and rats: Tips in the debate on potential MDMA unsafety in human activity. *Forensic Toxicol.* 2019, *37*, 132–144.
31. Penders, T.M.; Gestrung, R.E.; Vilensky, D.A. Intoxication Delirium following Use of Synthetic Cathinone Derivatives. *Am. J. Drug Alcohol Abus.* 2012, *38*, 616–617.
32. Kasick, D.P.; McKnight, C.A.; Klisovic, E. “Bath Salt” Ingestion Leading to Severe Intoxication Delirium: Two Cases and a Brief Review of the Emergence of Mephedrone Use. *Am. J. Drug Alcohol Abus.* 2012, *38*, 176–180.

33. Glennon, R.A.; Young, R. Neurobiology of 3,4-methylenedioxypropylamphetamine (MDPV) and α -pyrrolidinovalerophenone (α -PVP). *Brain Res. Bull.* 2016, *126 Pt 1*, 111–126.
34. Albers, D.S.; Sonsalla, P.K. Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: Pharmacological profile of protective and nonprotective agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995, *275*, 1104–1114.
35. Kiyatkin, E.A.; Kim, A.H.; Wakabayashi, K.T.; Baumann, M.; Shaham, Y. Effects of Social Interaction and Warm Ambient Temperature on Brain Hyperthermia Induced by the Designer Drugs Methylenedioxymethamphetamine and MDPV. *Neuropsychopharmacology* 2014, *40*, 436–445.
36. Nakamura, M.; Shintani-Ishida, K.; Ikegaya, H. 5-HT_{2A} Receptor Agonist-Induced Hyperthermia Is Induced via Vasoconstriction by Peripheral 5-HT_{2A} Receptors and Brown Adipose Tissue Thermogenesis by Peripheral Serotonin Loss at a High Ambient Temperature. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2018, *367*, 356–362.
37. Miller, K.A.; Witkin, J.M.; Ungard, J.T.; Gasior, M. Pharmacological and behavioral characterization of cocaine-kindled seizures in mice. *Psychopharmacology* 2000, *148*, 74–82.
38. Hanson, G.R.; Jensen, M.; Johnson, M.; White, H.S. Distinct features of seizures induced by cocaine and amphetamine analogs. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, *377*, 167–173.
39. Poon, H.F.; Abdullah, L.; Mullan, M.A.; Mullan, M.J.; Crawford, F.C. Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. *Neurochem. Int.* 2007, *50*, 69–73.
40. Valavanidis, A.; Vlachogianni, T.; Fiotakis, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Health Part C* 2009, *27*, 120–139.
41. Tejero, J.; Shiva, S.; Gladwin, M.T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol. Rev.* 2019, *99*, 311–379.
42. Ischiropoulos, H. Biological Tyrosine Nitration: A Pathophysiological Function of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998, *356*, 1–11.
43. Eppink, B.; Krawczyk, P.M.; Stap, J.; Kanaar, R. Hyperthermia-induced DNA repair deficiency suggests novel therapeutic anti-cancer strategies. *Int. J. Hypertherm.* 2012, *28*, 509–517.
44. Beere, H.M. 'The stress of dying': The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 2004, *117*(Pt 13), 2641–2651.

45. Chauhan, D.; Li, G.; Hideshima, T.; Podar, K.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Munshi, N.; Kharbanda, S.; Anderson, K.C. JNK- dependent Release of Mitochondrial Protein, Smac, during Apoptosis in Multiple Myeloma (MM) Cells. *J. Biol. Chem.* 2003, *278*, 17593–17596.
46. Chauhan, D.; Li, G.; Hideshima, T.; Podar, K.; Mitsiades, C.; Mitsiades, N.; Catley, L.; Tai, Y.T.; Hayashi, T.; Shringarpure, R.; et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 2003, *102*, 3379–3386.
47. Morrish, E.; Brumatti, G.; Silke, J. Future Therapeutic Directions for Smac-Mimetics. *Cells* 2020, *9*, 406.
48. Aravindan, N.; Mohan, S.; Herman, T.S.; Natarajan, M. Nitric oxide mediated inhibition of NFκB regulates hyperthermia-induced apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 2009, *106*, 999–1009.
49. Kabe, Y.; Ando, K.; Hirao, S.; Yoshida, M.; Handa, H. Redox Regulation of NFκB Activation: Distinct Redox Regulation between the Cytoplasm and the Nucleus. *Antioxid. Redox Signal.* 2005, *7*, 395–403.
50. Morgan, M.J.; Liu, Z.-G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell Res.* 2010, *21*, 103–115.
51. Hall AP, Henry JA, Acute toxic effects of ‘Ecstasy’ (MDMA) and related compounds: overview of pathophysiology and clinical management. *British Journal of Anaesthesia*, Volume 96, Issue 6, June 2006, Pages 678-685.