



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi dels efectes neuroplàstics i neurotòxics de l'MDMA en models experimentals d'alteracions del Sistema Nerviós Central

Sònia Abad Florensa

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

**Estudi dels efectes neuroplàstics i neurotòxics de
l'MDMA en models experimentals d'alteracions
del Sistema Nerviós Central**

Sònia Abad Florensa

2016



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

PROGRAMA DE DOCTORAT: RECERCA, DESENVOLUPAMENT I
CONTROL DE MEDICAMENTS

Estudi dels efectes neuroplàstics i neurotòxics de l'MDMA en models experimentals d'alteracions del Sistema Nerviós Central

Memòria que presenta **Sònia Abad Florensa** per optar al títol de doctor
per la Universitat de Barcelona

Directors

Dr. Antoni Camins Espuny

Dra. Elena Escubedo Rafa

Tutor:

Doctorand

Jordi Camarasa Garcia

Sònia Abad Florensa

Aquest treball ha estat realitzar al departament de Farmacologia i Química Terapèutica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona i ha estat finançat per:

**Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre
Drogas**

(Projectes: PND12/102)



Ministerio de Ciencia e Innovación

(Projectes: SAF2010-15948; SAF2011-23631; SAF2012-39852;
SAF2013-46135)



Generalitat de Catalunya

(Projectes: 2011SGR0977; 2014SGR2025)



CIBERNED

(Projectes: CB06/05/0024)



Imatge de la portada: Fotografia de neurones piramidals de l'àrea CA1 de l'hipocamp de rata marcades amb la tinció de Golgi.

Publicacions derivades de la present Tesi Doctoral

Abad S, Ramon C, Pubill D, Camarasa J, Camins A, Escubedo E (2016). **Adolescent exposure to MDMA induces dopaminergic toxicity in substantia nigra and potentiates the amyloid plaque deposition in the striatum of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice.** En revisió en BBA Molecular Basis of Disease.

Abad S, Camarasa J, Pubill D, Camins A, Escubedo E (2015). **Adaptive Plasticity in the Hippocampus of Young Mice Intermittently Exposed to MDMA Could Be the Origin of Memory Deficits.** Molecular Neurobiology. DOI 10.1007/s12035-015-9618-z

Abad S, Junyent F, Auladell C, Pubill D, Pallàs M, Camarasa J, Escubedo E, Camins A (2014). **3,4-Methylenedioxymethamphetamine enhances kainic acid convulsive susceptibility.** Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 54:231-42

Abad S, Fole A, del Olmo N, Pubill D, Pallàs M, Junyent F, Camarasa J, Camins A, Escubedo E. (2014) **MDMA enhances hippocampal-dependent learning and memory under restrictive conditions, and modifies hippocampal spine density.** Psychopharmacology 231:863-74.

Comunicacions en congressos

Abad, S.; Ramón, C.; Camarasa, J.; Pubill, D.; Camins A; Escubedo, E.; **Comparative study of behavioral and striatal parameters in double transgenic APP^{swe}/PS1^{dE9} versus wildtype mice.** 9 th FENS Forum Neuroscience. Milan (2014)

Abad, S.; Ramón, C.; Camarasa, J.; Pubill, D.; Escubedo, E.; Camins, A. **MDMA accelerates but does not potentiates the pathogenesis of Alzheimer disease.** IX Simposi de Neurobiologia Experimental. Barcelona (2014)

Abad, S.; Ramón, C.; Camarasa, J.; Pubill, D.; Camins, A.; Escubedo, E. **MDMA is not able to produce a classic dopaminergic toxicity in the APP^{swe}/PS1^{dE9} striatum but potentiates the A β deposition.** II Congreso Internacional de Investigación e Innovación en Enfermedades Neurodegenerativas (CIIEN-CIBERNED). Barcelona (2014)

Abad, S.; Ramon, C.; Camarasa, J.; Pubill, D.; Camins, A.; Escubedo, E. **Chronic administration of MDMA in APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice does not exacerbate Alzheimer's disease in adulthood.** Basic & Clinical Pharmacology and Toxicology Volume 115, Supplement s1. 17th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology (WCP2014)

Abad, S.; Pubill, P.; Pallas, M.; Auladell, C., Camarasa, J.; Camins, A.; Junyent, F.; Escubedo, E. **MDMA fails to potentiate kainate-induced neurotoxicity but increases sensitivity to subconvulsant doses of this glutamatergic agonist.** 6th European Congress of Pharmacology. Granada (2012)

“Si siempre intentas ser normal,
nunca sabrás lo fantástica que puedes ser”

Maya Angelou

Al meu cosí Marc, gràcies a tu

“Show must go on”

Per mi, la tesi doctoral era un desig des del primer dia que vaig trepitjar el laboratori, malgrat això no va ser fins anys després que em va sortir l'oportunitat de portar-la a terme. I ara, després de cinc anys d'alegries, experiències i com no estrès, realment es fa difícil plasmar en unes línies tot el recolzament, ajuda i companyonia de la gent que ha fet possible que aquest dia hagi arribat.

Primerament, estic profundament agraïda als meus dos directors de tesi, Dra. Elena Escubedo i el Dr. Antoni Camins, que van apostar per mi i em van donar la seva confiança per poder entrar a treballar en els seus grups. Gràcies Elena per haver-me guiat durant tots aquests anys, pels teus comentaris, suggeriments, correccions i disponibilitat, gràcies per la teva dedicació i compromís constants i per preocupar-te més enllà del laboratori. Gràcies Toni per deixar-me la llibertat de portar a terme les meves idees com a investigadora, fent que sempre m'hagi sentit valorada a nivell professional, preocupar-te pel meu futur i tenir-me en compte en els teus projectes. Gràcies pels teus consells i valoracions. Gràcies als dos per la vostra proximitat. També voldria donar les gràcies al tutor de la meva tesi, el Dr. Jordi Camarasa pel seu suport per poder realitzar la tesi, pels seus consells estadístics i en l'àmbit científic, per la seva voluntat i dedicació. Al Dr. David Pubill, pels seus consells a nivell experimental, com en el cultius o bindings. I per la seva ajuda en la traducció dels articles. A tots vosaltres, moltes gràcies.

També m'agradaria agrair la seva col·laboració i ajuda a la Dra. Carme Auladell, Dra. Esther Verdaguer i Dr. Felix Junyent. Gràcies per obrir-me la porta del vostre laboratori, per tots els consells i ànims durant aquest llarg camí.

De la mateixa manera m'agradaria agrair la seva ajuda a la Dra. Núria del Olmo i al Dr. Alberto Fole de la Universidad Sant-Pablo CEU de Madrid, per ensenyar-me la tècnica de tinció de Golgi. Tampoc puc oblidar a tot el grup del *Laboratory of Behavioral Genetics LGC* de la EPFL en Lausanne (Suïssa), sobretot a la Dra. Carmen Sandi, la qual em va acollir molt amablement en el seu laboratori durant la meva estància de sis mesos donant-me l'oportunitat de poder viure una experiència tant professional com personal. I als meus companys de grup que van fer que l'estada fos una experiència difícil d'oblidar: Laura, Sophie, Fiona, Maxim, Roman, Olivia, Jocelyn, Ioannis, Isabelle, Alex, Thomas, Damian, Aurelie, Clara, Gonzalo.

Evidentment a tots els meus companys de laboratori d'aquí per la seva companyonia i per fer el dia a dia més fàcil: Miguel, Gemma, Gaia, Emma, Christian, Vero, David P, Luisa, Nacho, Dimitri, Núri, Sergi,

AGRAÏMENTS

Laia, Aurelio, Mohammad, Oriol, Francesc, Natty, Patty, Lety, Mario (gracias por tus conocimientos informaticos). Carla, per la teva ajuda amb els APP. Andrés, gràcies per ajudar-me amb l'anglès. Gracias Jose, por tus consejos, cálculos, bromas, risas, enfados... Porque realmente aprendí mucho laboratorio de ti. Te echamos de menos. Gracias Miren por ser como eres, con esa alegría que se contagia, y porque te considero mucho más que una compañera de trabajo. Y por último, gracias Raúl porque has hecho que esta tesis sea mucho más fácil con tu ayuda. Gracias por tener siempre un si como respuesta cada vez que te pido algo, porque los dos sabemos que pido mucho. Y por supuesto por hacer de mis “crisis” mucho más llevaderas.

També vull agrair al grup del “depar” perquè amb vosaltres va començar tot, la passió pel laboratori i una bona amistat: Javi, Dani, Marty, Pou, Laura, David, Chipi, Pizi, Richy, Sara.

Com no gràcies a la Mar, per fer que tot el tema burocràtic sigui més fàcil, i perquè li tinc una gran estima. La Silvia per la seva contribució com a tècnic facilitant la feina del dia a dia i sense queixar-se mai, i a tots els professors del departament.

A tots els meus amics que m'han aguantat en els moments d'estrès, de desànim, de crisis existencials, d'eufòria i d'alegria. Als meus amics d'Alcarràs, el Pepo per animar-me sempre, Jaume, Julià, Albert, More, Laia, Ivet, Monica, Natxi, Raquel, a les Majetes, a la Núria que fa molts anys que caminem juntes, a la Betty i a la Maria que sempre estan al meu costat donant-me suport tant a les verdes com a les madures, a l'Anna amb el seu positivisme, a la Montse la meva “tata”, al Sergi el meu padrinet de Bcn, a les nenetes de la universitat i a molts més que si continués seria una llista massa llarga.

També a l'Hèctor, que malgrat tot, sempre m'ha ajudat, m'ha recolzat i m'ha animat en els moments de defalliment en el meu camí professional.

I per últim i el més important, agrair a la meva família que SEMPRE han estat, estan i estaran al meu costat. Ells són els qui han fet possible que arribi fins aquí, pel seu sacrifici, pel seu recolzament, pels seus consells, per la seva paciència ... Gràcies mama, papa, Irene. Sou el meu pilar. També a les meves padrines, Ramona i Lola, sempre tan orgullosos de la seva neta. A la meva padrineta Lola que és com la meva germana gran. A la tieta Montse i els seus llibres. I a tots els meus tiets i cosins, especialment al meu cosí Marc que ens ha donat a tots una lliçó de valentia i lluita continua. Us estimo.

ÍNDICE

ÍNDIX	I
Acrònims - Abreviatures	VII
INTRODUCCIÓ	1
1. HISTÒRIA I EVOLUCIÓ DE LES DROGUES: DE L'ANTIGUITAT A LA SITUACIÓ ACTUAL	3
2. DROGUES I ADOLESCENTS	5
2.1 El cervell adolescent	6
3. 3,4- METILENDIOXIMETAMFETAMINA	7
3.1 Origen i Història	7
3.2 Estructura química	9
3.3 Epidemiologia	10
3.4 Farmacocinètica i metabolisme	11
3.5 Efectes farmacològics	14
3.5.1 <i>Efectes aguts</i>	15
3.5.2 <i>Efectes a llarg termini</i>	16
3.6 Mecanisme d'acció	17
3.7 Neurotoxicitat	18

3.7.1	<i>Efectes a llarg termini sobre els terminals</i>	19
3.7.2	<i>El paper de la dopamina</i>	20
3.7.3	<i>El paper de la hipertèrmia</i>	21
3.7.4	<i>Estrès oxidatiu</i>	22
3.7.5	<i>El paper del mitocondri</i>	25
4.	MDMA, HIPOCAMP I MEMÒRIA	28
4.1	Estructura i organització de l'hipocamp	28
4.1.1	<i>Connexions pròpies de l'hipocamp</i>	29
4.2	Aprenentatge, memòria i plasticitat	31
4.3	Efectes de l'MDMA en els processos cognitius	35
5.	MDMA I NEURODEGENERACIÓ EXCITOTÒXICA	38
5.1	Increment de calci i excitotoxicitat	38
5.2	Receptors glutamatèrgics	41
5.2.1	<i>Receptors NMDA</i>	41
5.2.2	<i>Receptors AMPA/KAINAT</i>	44
5.2.3	<i>Receptors metabotròpics</i>	46
5.3	Model experimental del àcid kaínic	47
5.4	MDMA i excitotoxicitat	50
6.	MDMA I MALALTIA D'ALZHEIMER	52
6.1	Malaltia d'Alzheimer	52

6.1.1 Aspectes generals	52
6.1.2 Epidemiologia	52
6.1.3 Síntomes i signes	53
6.1.4 Tipus d'Alzheimer	54
6.1.5 Factors de risc	54
6.2 Model experimental APP ^{swe} /PS1 ^{dE9}	60
6.2.1 Processament de l'APP i generació de plaques β - amiloides	61
6.3 Efectes de l'MDMA en la malaltia d'Alzheimer	63
OBJECTIUS	65
2.1 Estudi dels efectes de l'MDMA en la plasticitat i la memòria	67
2.2 Estudi dels efectes de l'MDMA en un model d'excitotoxicitat	67
2.3 Investigar els efectes de l'MDMA sobre la via nigroestriatal en un model de la malaltia d'Alzheimer	67
RESULTATS	69
3.1 Publicació 1	71
<i>MDMA enhances hippocampal-dependent learning under restrictive conditions, and modifies hippocampal spine density</i>	
3.2 Publicació 2	85
Adaptative plasticity in the hippocampus of young mice intermittently exposed to MDMA could be the origin of the memory deficits	
3.3 Publicació 3	101

3,4- Methylendioximetamphetamine enhances kainic acid susceptibility

3.4 Publicació 4 115

Adolescent exposure to MDMA induces dopaminèrgic toxicity in substantia nigra and potentiates the amyloid plaque deposition in the striatum of APP^{swe}/PS1^{dE9}

DISCUSSIÓ 145

4.1 Estudi dels efectes de l'MDMA en la plasticitat i la memòria 148

4.1.1 Efectes en rata..... 149

4.1.2 Efectes en ratolí 155

4.2 Estudi dels efectes de l'MDMA en un model d'excitotoxicitat 161

4.3 Efectes de l'MDMA sobre la via nigroestriatal en un model de la malaltia d'Alzheimer..... 166

CONCLUSIONS 175

BIBLIOGRAFIA 179

ACRÒNIMS – ABREVIATURES

[³H]paroxetina	<i>Tritiate-paroxetine</i> (Paroxetina tritiada)
4-HNE	<i>4-Hydroxynonenal</i> (4-Hidroxinonenal)
5-HIAA	<i>5-Hydroxyindoleacetic acid</i> (àcid 5-hidroxiindolacètic)
5-HT	<i>5-Hydroxytryptamine</i> (Serotonina)
5-HTT	<i>Serotonine Transporter</i> (Transportador de serotonina)
6-OHDA	<i>6-Hydroxydopamine</i> (6-hidroxidopamina)
ABD	<i>Agonist Binding Domain</i> (Domini d'unió a l'agonista)
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> (Corticotropina)
AD	<i>Alzheimer Disease</i> (Malaltia d'Alzheimer)
ADAM10	<i>A Disintegrin and metalloproteases domain-containing protein 10</i> (Família d'enzims Adamalisin)
ADH	<i>Antidiuretic Hormone</i> (Hormona antidiürètica; vasopressina)
AIF	<i>Apoptosis-Inducing Factor</i> (Factor induïble d'apoptosis)
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> (àcid α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropionic)
AP5	<i>2R)-amino-5-phosphonovaleric acid; (2R)-amino-5-phosphonopentanoate</i> (Àcid D(-)-2-amino-5-fosfonovalèric)
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i> (Proteïna precursora amiloide)
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (Trifosfat d'Adenosina)
AUC	<i>Area under the curve</i> (Àrea sota la corba)
BACE	<i>Beta-secretase 1; beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1</i> (Enzim beta secretasa 1)
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> (Factor neurotròfic derivat del cervell)
CaBP	<i>Calcium Binding Protein</i> (Proteïnes d'unió al Calci)
CaMKII	<i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i> (Proteïna quinasa II dependent de Ca ²⁺ /calcineurina)
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> (Fosfat d'adenosina cíclic)
CB	<i>Calbindin</i> (Calbindina)

ACRÒNIMS - ABREVIATURES

CDK-5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i> (Ciclina dependent de quinasa 5)
COMT	<i>Catechol-O-methyl transferase</i> (Catecol-O-metiltransferasa)
COX	<i>Cyclooxygenase</i> (Enzim Ciclooxygenasa)
CR	<i>Calretinin</i> (Calretinina)
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> (Element de resposta a unió a cAMP)
DA	<i>Dopamine</i> (Dopamina)
DAG	<i>Diacyl-glycerol</i> (Diacilglicerol)
DAT	<i>Dopamine Transporter</i> (Transportador de dopamina)
DG	<i>Dentat Girus</i> (Gir dentat)
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DNA	<i>Desoxiribunucleic acid</i> (Àcid desoxiribonucleic)
DOPAC	<i>3,4-Dihydroxyphenylacetic acid</i> (Àcid 3,4-dihidrofeniacètic)
Drp1	<i>Dinamin-related Protein 1</i> (Proteïna relacionada dinamina 1)
EC₅₀	<i>Half maximal effective concentration</i> (Concentració Efectiva mitja)
EEG	<i>Electroencephalography</i> (Electroencefalograma)
ELA	Esclerosi lateral amiotròfica
EMCDDA	European Monitoring Centre of Drug and Drug Addiction
EPSC	<i>Excitatori PostSynaptic Currents</i> (Corrents post-sinàptiques excitatòries)
ERK	<i>Extracelullar signal-regulated kinase</i> (Quinasa que regula la senyalització extracel·lular)
ETC	<i>Electron Transport Chain</i> (Cadena de transport d'electrons)
FAD	<i>Familial Alzheimer Disease</i> (Malaltia d'Alzheimer Familiar)
FST	<i>Forced Swimming Test</i> (Test de natació forçada)
GSH	<i>Glutathione</i> (Glutatió)
GSK-3β	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i> (Quinasa Glicogen sintasa 3 β)

HC	<i>Hippocampus</i> (Hipocamp)	
HHA	<i>3,4-dihydroxyamphetamine</i>	(3,4- dihidroxiamfetamina)
HHMA	<i>3,4-dihydroxymethamphetamine</i>	(3,4- dihidroximetamfetamina)
HMMA	<i>3-hydroxy-4-methoxymethamphetamine</i> (4-hidroxi-3- metoxiamfetamina)	
i.c.v	Intracerebroventricular	
i.p.	Administració intraperitoneal	
IEG	<i>Immediate Early Gene</i> (Gens d'expressió immediata)	
K.O.	<i>Knock-out</i> (animals)	
KAR	<i>Kainate Receptor</i> (Receptors de Kainat)	
LTD	<i>Long-Term Depression</i> (Depressió de llarga durada)	
LTP	<i>Long-Term Potentiation</i> (Potenciació de llarga durada)	
MAO-A	<i>Monoamine oxidase A</i> (Monoamino oxidasa A)	
MAO-B	<i>Monoamine oxidase B</i> (Monoamino oxidasa B)	
MAPK	<i>Mitogen-Activated protein Kinase</i> (Proteïna quinasa activada per mitogen)	
MDA	<i>3,4-Methylendioxiamphetamine</i>	(3,4- metilendioamfetamina)
MDMA	<i>3,4-Methylendioximethamphetamine</i>	(3,4- Metilendioximetamfetamina)
Mfn2	<i>Mitofusin 2</i> (Mitofusina 2)	
MPTP	<i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i>	(1- metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> (Imatge per Ressonància Magnètica)	
MWM	<i>Morris Water Maze</i> (Test del laberint d'aigua)	
NA	<i>Noradrenaline</i> (Noradrenalina)	
NAC	<i>N-Acetyl Cysteine</i> (N-acetilcisteïna)	
NAc	<i>Nucleus Accumbens</i> (Nucli Accumbens)	
NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> (Nicotinamida adenina dinucleòtid)	
NMDA	<i>N-methyl-D aspartate</i> (N-metil-D-aspartat)	
NMDAR	Receptors NMDA	

ACRÒNIMS - ABREVIATURES

NT	Neurotransmissor
OF	<i>Open Field Test</i> (Test del camp obert)
OXPHOS	<i>Oxidative Phosphorilation</i> (Fosforilació oxidativa)
PFC	<i>Prefrontal Cortex</i> (Còrtex Prefrontal)
PGC-1α	peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α
PKA	<i>Protein kinase A</i> (Proteïna quinasa A)
PKC	<i>Protein Kinase C</i> (Proteïna quinasa C)
PS1	<i>Presenilin1</i> (Presenilina 1)
PS2	<i>Presenilin 2</i> (Presenilina 2)
PV	<i>Parvalbumin</i> (Parvalbumina)
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espècies reactives d'oxigen)
s.c.	Administració subcutània
SNC	Sistema Nerviós Central
SNP	Sistema Nerviós Perifèric
TH	<i>Tyrosine Hydroxilase</i> (Tirosina Hidroxilasa)
TLE	<i>Temporal Lobe Epilepsy</i> (Epilèpsia del lòbul temporal)
TPH	<i>Tryptophan Hydroxilase</i> (Triptòfan hidroxilasa)
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B o Tyrosine receptor kinase B</i> (Receptor Tirosina quinasa B)
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime
VMAT	<i>Vesicular monoamine transporter</i> (Transportador Vesicular de monoamines)
VTA	<i>Ventral Tegmental area</i> (Àrea ventral tegmental)
WHO	<i>World Health Organization</i> (OMS: Organització Mundial de la Salut)
WT	<i>Wild-type</i> (salvatges) animals

INTRODUCCIÓ

1. HISTÒRIA I EVOLUCIÓ DE LES DROGUES: DE L'ANTIGUITAT A LA SITUACIÓ ACTUAL

Es denomina substància d'abús o psicoactiva, a tota substància que introduïda en l'organisme té la capacitat per modificar la consciència, l'humor o els pensaments d'un individu (World Health Organization, 2004). El consum de drogues apareix com una constant històrica en el recorregut de la humanitat, utilitzant-se tant en el pla religiós, com terapèutic, productiu o lúdic, en funció de les diferents cultures i religions. L'ús i abús de les drogues ha sofert un procés evolutiu en el transcurs de la història segons la transformació de la societat. El relat bíblic ja menciona el consum i els efectes de la droga universal per excel·lència: l'alcohol. Les primeres societats urbanes com Egipte, Mesopotàmia i la vall de l'Indu, van aportar a la Humanitat junt amb les legislacions positives més antigues que es coneixen (Codi de Manu, Codi d'Hammurabi), les primeres notícies documentades sobre l'existència de drogues embriagadores. En el cas d'Egipte, per exemple, les drogues més habituals van ser l'opi i una espècie de cervesa el consum del qual es gravava amb impostos. Heus aquí alguna de les característiques que acompanyaran a les drogues en el seu recorregut històric: el seu ús institucionalitzat, la seva vessant legal-il·legal i la seva unió a una rendibilitat econòmica.

Si l'alcohol ha estat la droga històrica d'Occident, de Turquia a la Índia, passant per l'altiplà de l'Iran, el protagonisme l'ocupa els derivats del cànnabis i el cascall. L'opi és també una de les drogues amb més història. El primer document data l'any 1550 abans de Crist (a.C) en un paper egipci, on es parlava de càpsules d'opi per produir un son reparador, encara que es creu que el seu ús es remunta molt abans. En el cas del cànnabis, la referència més antiga figura en un llibre de la farmacopea Xina de l'any 2737 a.C., on se li atribueix caràcter medicinal per al tractament de diverses dolències com el reuma, el beri-beri, la malària i certs trastorns mentals. Des de llavors, aquestes drogues es van estendre entre els diferents pobles mediterranis o d'Extrem Orient (Francesc Freixa, 1982). A partir del segle XVIII, el consum d'aquestes drogues es va expandir a Europa juntament amb la cocaïna, primer en ambients

INTRODUCCIÓ

elitistes i a mitjans del segle XIX de manera més generalitzada. Els nous procediments per introduir en el cos humà les substàncies farmacològiques, com la xeringa i l'agulla, i la industrialització dels productes farmacèutics van afavorir l'auge del consum de drogues. No va ser, però, fins al segle XX on a Occident les drogues van tenir més ressò amb l'aparició de moviments de protesta en contra del model social establert, com el moviment *beat* o també el moviment *hippy*. Aquests moviments partien d'una marginació voluntària del sistema, d'una no participació per a no contribuir a lo rebutjable: armes nuclears, guerra del Vietnam i valors de classe mitja occidentals. En el moviment *hippy*, la seva mística de l'amor veia en la droga un instrument de sinceritat i el plaer, requisits indispensables per exaltar el valor suprem: la vida, entesa com un joc i una alegria. En certa manera, la droga ha vingut en part a significar la necessitat d'una nova espiritualitat en un mon que el laïcisme s'arrela sense precedents. Com a contrapartida, a Espanya va sorgir la denominada *movida madrileña*, un moviment social, cultural i lúdic desenvolupat a Madrid entre els anys 1977-1984, en que artistes liberals i excèntrics pretenien trencar amb l'anterior època franquista i la censura. Paral·lelament, a València va sorgir la coneguda *ruta del bakalao o ruta Destroy* (finals dels 70-90), i va consistir en el major moviment *clubbing* d'Espanya, amb conseqüències a llarg termini sobre la manera d'oci nocturn que es coneix a dia d'avui. Va ser en aquest moviment on les anomenades drogues de disseny van entrar en escena amb una gran acollida entre els joves arribant al seu punt àlgid de consum. Des d'aleshores, aquestes drogues han format part del panorama oci-cultural de la societat espanyola. En l'actualitat on el desenvolupament de les noves tecnologies com Internet ha propiciat diferents maneres de comerç, l'accés a noves drogues s'ha vist facilitat.

Cal destacar que en la cronologia de l'ús de les drogues s'ha passat d'un consum restringit als sectors més alts de la societat en l'antiguitat, a un consum ampli sense límits, on actualment el sector més vulnerable per les seves característiques dins la societat són els adolescents i els joves adults.

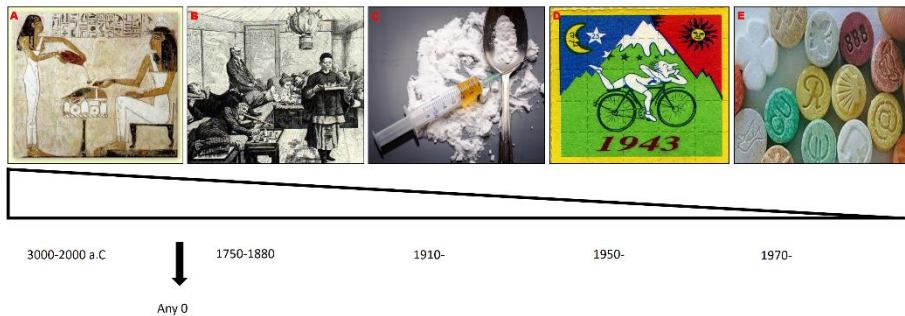


Figura 1. Cronologia de l'evolució de les drogues al llarg de la història. Panel A: consum d'alcohol en les societats egípcies; Panel B: Fumador d'opi a França. El làudan, la morfina i l'opi eren drogues comuns i legals en Europa i Amèrica durant el segle XIX. Panel C: es sintetitza l'heroïna per primera vegada. L'ús de la xeringa i l'agulla facilita la seva administració. Panel D: El LSD (dietilamida de l'àcid lisèrgic) és la droga per excel·lència del moviment *hippy*. Panel E: actuals drogues de disseny.

2. DROGUES I ADOLESCÈNCIA

Al llarg de les cultures i del temps, l'adolescència s'ha senyalat sempre com un període de canvis tant a nivell físic com psíquic. Encara que molts adolescents condueixen amb èxit la transició de la dependència a la auto-suficiència de convertir-se en una persona independent dins de la societat, l'adolescència no deixa de ser un període on l'aparició de malalties psiquiàtriques i trastorns de la conducta, de l'alimentació i abús de substàncies, tendeix a l'alça (Paus et al., 2008). Els adolescents normalment mostren una conducta atrevida i en relació a altres edats exhibeixen una quantitat desproporcionada de comportaments com la imprudència, la impulsivitat, l'assumpció de riscos i la recerca de noves sensacions. En referència al consum de drogues, a banda d'existir el risc de convertir-se en addictes, hi ha evidències que suggereixen que la taxa de progressió a alcohòlic o drogoaddicte podria ser inusualment ràpida. Per exemple, l'addició a la cocaïna sembla ser molt més ràpida en els adolescents que en els consumidors adults, suggerint un potencial d'addicció superior en aquesta edat (Spear, 2000).

INTRODUCCIÓ

2.1 El cervell adolescent

El cervell és un òrgan dinàmic que està en continua remodelació, i l'adolescència és un període on aquesta remodelació és més accentuada i els factors ambientals poden tenir més impacte. Estudis realitzats amb ressonància magnètica (MRI) han demostrat una reducció en la matèria gris cortical i un increment en la matèria blanca que abasta dels 4 als 20 anys. S'ha observat que els canvis en matèria blanca són lineals, mentre que en la matèria gris hi ha un increment a la preadolescència seguit d'una disminució en l'adolescència tardana (Giedd et al., 1999; Gogtay et al., 2004). A nivell cel·lular, aquests canvis corresponen amb una sobreproducció d'axons i sinapsis en la pubertat, seguit d'un fenomen d'eliminació de neurones i sinapsis de més a fi d'incrementar la eficiència de la transmissió neuronal, al final de l'adolescència (fenomen de *pruning*) (Figura 2) (Crews et al., 2007; Prince et al., 2015).

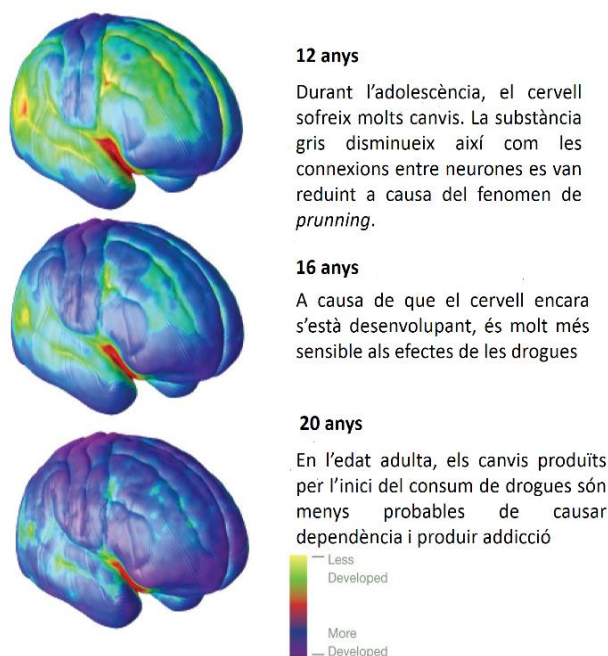


Figura 2. Imatges de ressonància magnètica. Verd indica cervell menys desenvolupat ; lila cervell més desenvolupat. Els canvis en la matèria gris són específics de cada regió, amb un pic al voltant dels 12 anys per al lòbul frontal i parietal i als 16 anys pel lòbul temporal, mentre en el lòbul occipital és produït cap als 20 anys.

El còrtex prefrontal (PFC) i l'hipocamp (HC) són probablement les dos àrees principals on més canvis es produeixen durant l'adolescència. S'ha observat que el volum absolut del PFC disminueix mentre que el de l'HC augmenta (Sowell et al., 2001; Guerri & Pascual, 2010). Cal mencionar que el PFC és l'àrea que està involucrada en les funcions executives com la flexibilitat cognitiva, el processament de la memòria, l'autoregulació i l'avaluació del risc i recompensa (Crews et al., 2007). En canvi, l'HC participa en els processos de memòria i aprenentatge (O'Keefe & Dostrovsky, 1971; Morris et al., 1982; Miller & Cohen, 2001). Per tant, modificacions en aquestes regions poden repercutir en alteracions cognitives i emocionals en l'edat adulta.

3. 3,4-METILENDIOXIMETAMFETAMINA

3.1 Origen i Història

La 3,4-Metilendioximetilamfetamina (MDMA) o més coneguda amb el nom d'èxtasi és un derivat amfetamínic que va ser sintetitzat per primera vegada i patentat al 1912 sota el nom safril-metil-amina per la companyia farmacèutica Merk. En aquell moment, no se li va donar cap importància farmacològica, ja que només era el precursor d'un nou compost actiu, la hidrastinina, un agent coagulant. Les primeres proves farmacològiques que es van realitzar amb l'MDMA van ser al 1927 als laboratoris Merck pel científic Oberlin, conclouent que no tenia efectes purament simpaticomimètics. No va ser fins als anys 50 que es va provar la seva toxicitat per primer cop en un estudi de la Universitat de Michigan, patrocinat per l'armada dels Estats Units, però els efectes toxicològics i sobre el comportament no van ser publicats fins l'any 1973 per Hardman H.F. i col. (1973) (Hardman et al., 1973). L'any 1976 va ser el primer cop que l'MDMA va ser utilitzat en psicoteràpia pel doctor Leo Zeff, encara que no va fer públic cap de les seves sessions. A partir d'aquell moment l'MDMA va començar a popularitzar-se amb el nom d'ADAM entre els psicoterapeutes, gràcies als seus efectes d'incrementar l'autoestima del pacient i facilitar la comunicació terapèutica. No es fins

INTRODUCCIÓ

al 1978 que es publica per primer cop els efectes de l'MDMA en humans (Shulgin & Nichols, 1978). Mentre els doctors i els psicoterapèutics estaven ocupats buscant nous usos terapèutics per l'MDMA, aquesta era utilitzada vastament als carrers amb ús recreatiu entre els anys 70 i 80, sota el nom d'èxtasi. Va ser el Regne Unit el primer en il·legalitzar l'MDMA a l'any 1977, seguit dels Estats Units 1985, pel seu potencial d'abús i per la falta d'aplicació terapèutica. L'organització Mundial de la Salut (OMS) la va incloure en la llista 1 en la Convenció sobre substàncies psicotròpiques a l'any 1985, on actualment encara es troba classificada. La seva il·legalització, però, no va disminuir el seu consum i a finals dels anys 80 el protagonisme de l'MDMA en festes techno i "raves" va fer que fos un element indispensable dins de la cultura nocturna a nivell mundial. Actualment encara continua sent una de les drogues psico-estimulants predilectes pels adolescents i els joves adults.



Figura 3. Patent nº 274350 del 1912. El text cita: Tema de la patent es: Procediment de fabricació de alkyloxyaryl-, dialkyloxyaryl- and alkylendioxyarylamino propane i els seus derivats nitrogens monoalquilats. ('Gegenstand des Patent es ist: Verfahren zur Darstellung von Alkyloxyaryl-, bzw. deren am Stickstoff monoalkylierten Derivaten'). Principi de la patent: 24 de desembre de 1912. El document es refereix a la llei de patents de l'abril de 1891 i 6 de juny de 1911. (Freudenmann 2006).

La principal via de consum de l'MDMA és l'oral, i la forma més habitual es en forma de pastilles que es poden trobar en diferents colors, forma i símbols. Encara que també la podem trobar en pols i forma cristal·lina, el que fa que també es pugui esnifar (insuflació nasal).



Figura 4. Formes habituals de consum de l'èxtasi.

3.2 Estructura química

L'MDMA és una base sintètica que pertany al grup de les fenietilamines, emparentada estructuralment amb l'alcaloide al·lucinogen mescalina, i l'estimulant amfetamina. Com altres amfetamines, l'MDMA té un centre quiral amb un parell d'enantiòmers, que mostren diferent activitat farmacològica, metabolisme estereoselectiu i diferent acumulació en l'organisme (Figura 5). L'enantiòmer S (+) és el responsable de l'efecte psicoestimulant i dels efectes empàtics, en contra de les propietats al·lucinògenes que presenta l'isòmer R (de la Torre et al., 2004b). El que es troba al mercat i per tant el que es consumeix és el racèmic, fent que la suma de les propietats dels dos isòmers li confereixen les seves propietats estimulants i relativament al·lucinògenes.

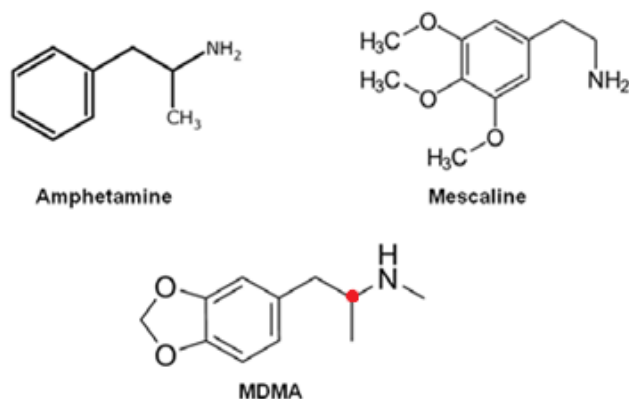


Figura 5. Estructura química de l'amfetamina, mescalina i MDMA. El punt vermell en l'MDMA indica el centre quiral de la molècula.

3.3 Epidemiologia

S'estima que un total de 246 milions de persones, o 1 de cada 20 entre les edats de 15 i 64 anys van consumir substàncies il·legals al 2013 (UNODC (2015): *The United Nations Office on Drugs and Crime*). A nivell europeu, es considera que casi una quarta part de la població adulta, més de 80 milions de persones, han provat drogues il·legals en algun moment de la seva vida. L'MDMA és una de les drogues més consumides i es troba en el quart lloc en la llista, després del cànnabis, cocaïna i amfetamina. S'estima que en l'any 2013, 1.8 milions de joves adults (de 15 a 34 anys; 1.4% d'aquest grup d'edat) van consumir aquesta droga. Per tant la magnitud del problema de les drogues és plausible a nivell mundial i la preocupació social, econòmica i política és evident. Darrerament, la innovació en el mercat i l'augment de la puresa són obvis en el cas de l'MDMA. Després d'un temps en el qual les pastilles d'MDMA van presentar una reputació de baixa qualitat i de producte adulterat, actualment existeix una major disponibilitat d'una MDMA de gran puresa, tant que en l'últim any, el EMCDDA (2015) (*European Monitoring Centre of Drugs and Drug Addiction*) i la Europol han advertit sobre els riscos per la salut vinculats al consum d'aquest tipus de droga.

Cal destacar que en l'any 2013 Espanya va ser un dels països on el número de confiscacions per MDMA va ser més gran, encara que cal mencionar que en aquest any no es disposen de dades de països com França, Polònia o els Països Baixos, les quals suposarien una contribució important (Figura 6). En conjunt, tots aquests indicadors de mercat de l'MDMA apunten a una recuperació des d'un mínim assolit aproximadament 5 anys enrere.

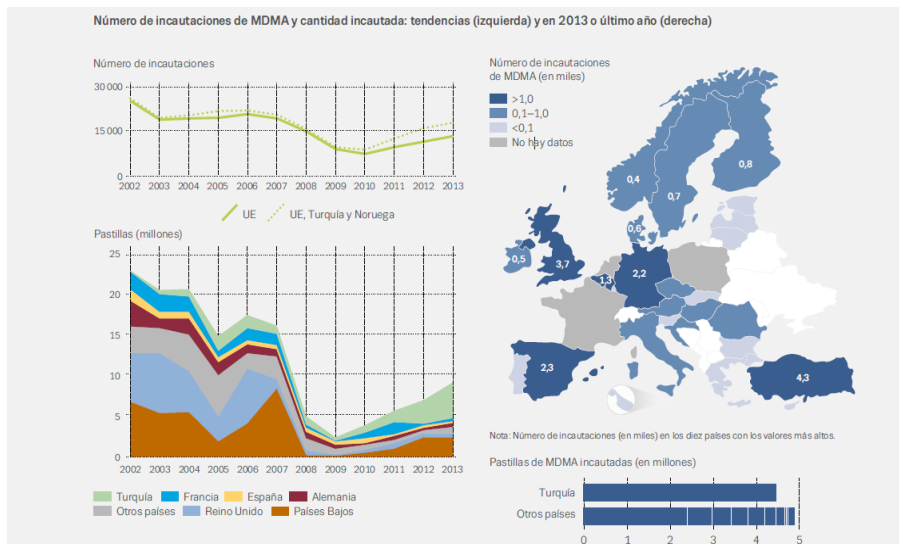


Figura 6. Mapa de confiscacions d'èxtasis a Europa durant el 2013

3.4 Farmacocinètica i metabolisme

L'MDMA és una base dèbil amb un pKa al voltant de 9 i d'elevada liposolubilitat (LogP 1.68). Es caracteritza per tenir un pes molecular baix, una unió a proteïnes plasmàtiques baixa (sobre un 20%) i un alt volum de distribució (6.4 L/Kg) en una dosi de 100mg (de la Torre, Farré et al., 2004). Aquestes propietats li confereixen una distribució àmplia i facilitat per travessar les membranes i els teixits, fent que els efectes es comencin a percebre 30-60 minuts després de la seva administració, i arribant a la concentració màxima (C_{max}) al cap d'1.5-3h hores (Capela et al., 2009). A dosis baixes (50,75, 100 mg) l'àrea sota la corba (AUC) i la C_{max} incrementen de manera dosi-dependen, mentre que

INTRODUCCIÓ

a partir de 150 mg de dosis, l'increment dels paràmetres cinètics no són proporcionals, indicant una cinètica no lineal. Això segurament es degut a una saturació del metabolisme d'aquesta substància, a més d'una interacció dels seus metabòlits amb els enzims implicats en la seva via metabòlica. El temps de vida mitja d'eliminació amb una dosis de 100mg és entre 8-9 hores (de la Torre et al., 2004b; Capela et al., 2009).

El metabolisme de l'MDMA ha estat estudiat tan *in vivo* com *in vitro* en diferents espècies animals, sent aquestes investigacions de gran rellevància per la possible implicació dels metabòlits en el mecanisme de la neurotoxicitat. Les dues vies principals de metabolització són: 1) l'N-desmetilització de l'amina secundària i 2) l'O-desmetilenació de l'anell metilendioxi (Figura 7). Les reaccions de N-metilació i O-metilació són catalitzades per isoenzims del citocrom P450. Dos dels principals enzims implicats en el metabolisme d'aquest derivat amfetamínic, l'enzim CYP2D6 i la catecol-metil-transferasa (COMT) estan subjectes d'exhibir polimorfisme genètic, condicionant d'aquesta manera els efectes tòxics que l'MDMA pot presentar a nivell interindividual.

L'ordre de la via de metabolització pot diferir segons l'espècie estudiada, així mateix trobem que en humans s'ha descrit que la principal via de metabolització és la O-desmetilenació donant lloc a la formació d'3,4-dihidroximetamfetamina (HHMA), un compost altament inestable i que seguidament es conjugat per l'àcid glucurònic o sulfat. A més, també pot ser metilat per la COMT a l'4-hidroxi-3-metoximetamfetamina (HMMA). Aquests metabòlits estan majoritàriament tan en plasma com en orina en forma de conjugats glucurònics. A diferència de la rata, la concentració plasmàtica de l'3,4-metilendioxiamfetamina (MDA), producte de l'N-desmetilització, un compost farmacològicament actiu i amb una toxicitat similar o inclús major sobre les neurones serotoninèrgiques que la pròpia MDMA, normalment és troba per sota del 5% (de la Torre & Farré, 2004).

En canvi, tant en rata com en ratolí la principal via és la N-desmetilització donant lloc a la formació de l'MDA. En rata, està descrit que a dosis baixes el ràtio de transformació [MDA]:[MDMA] és 0.5 i és dosis-depenent, mentre que a dosis a partir 10mg/kg hi ha una saturació

de l'eliminació hepàtica. Els metabòlits HHMA i HMMA també es troben en concentracions altes en plasma després de l'administració de la substància. Encara que en ratolí el principal metabòlit també és l'MDA, s'ha observat que després de repetides dosis del derivat amfetamínic (30mg/kg cada 3h, 3 cops), una hora després de l'última administració, els nivells plasmàtics de l'MDMA són 450% més alts que l'MDA i 1900% més que l'HHMA. Tant els nivells de l'HHMA i l'HMMA són molt similars i representen entre l'1 i el 5%. En determinar les concentracions en estriat, només l'MDMA i l'MDA van ser detectades sent la concentració de MDMA 940% superior a l'MDA (Escobedo et al., 2005). L'alta concentració d'MDMA en els dos compartiments segurament es degut a la inhibició del seu metabolisme, coincidint amb la farmacocinètica no-lineal. En les 3 espècies esmentades la farmacocinètica de l'MDMA és enantiòmer-selectiva, es a dir, tots els metabòlits conserven el centre quiral i poden representar una barreja dels dos enantiòmers. En humans l'enantiòmer (S)-MDMA presenta una semi vida d'eliminació més curta, resultat que està en concordança amb els efectes subjectius i psicomotors reportats en subjectes exposats a l'MDMA, mentre que en el seu homòleg (R)-MDMA l'eliminació és més llarga correlacionant-se amb els efectes d'estat d'ànim i cognitius que presenten els individus dies després del seu consum (Pizarro, N & Farré, M 2004).

El coneixement del metabolisme de l'MDMA és de gran rellevància, ja que diversos autors estan d'acord en el fet que els metabòlits d'aquest derivat amfetamínic juguen un paper clau en el desenvolupament de la neurotoxicitat causada per l'MDMA (Chu et al., 1996; Miller et al., 1996; Esteban et al., 2001; Escobedo et al., 2005).

INTRODUCCIÓ

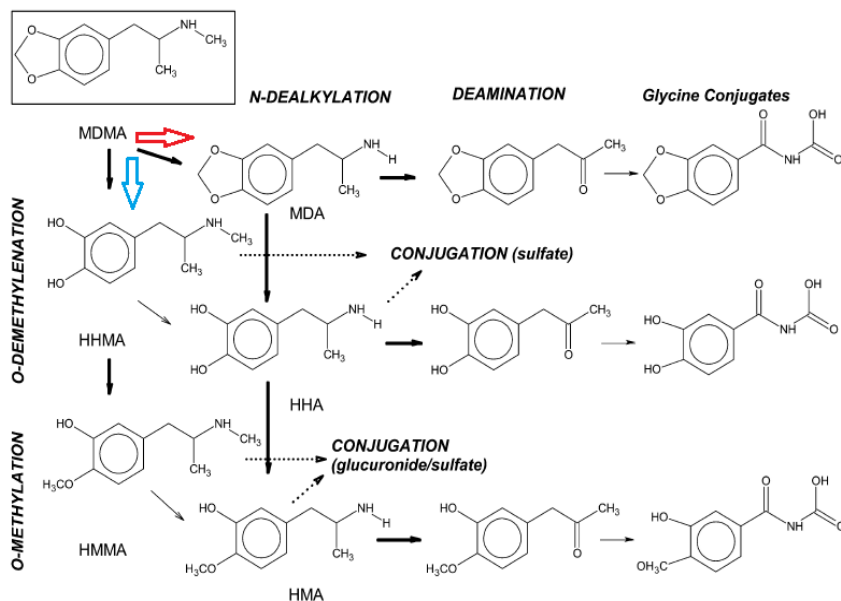


Figura 7. Les vies metabòliques de disposició hepàtica de l'MDMA. La fletxa vermella indica la principal via en rosegadors. La fletxa blava indica la principal via en humans. (adaptada de la Torre 2004).

3.5 Efectes farmacològics

L'MDMA afecta tant al sistema nerviós central (SNC) com al perifèric (SNP), i són precisament els efectes en el SNC el que fan que sigui una de les drogues més consumides pels joves adolescents. Està classificada com a droga entactògena, ja que Nichols (1986) va concloure que l'MDMA no encaixava en les fins aleshores classificacions de droga al·lucinògena o psicodèlica, per tant l'autor en funció de la distintiva farmacologia de l'MDMA, va fixar la denominació de droga entactògena (Nichols, 1986). Es denomina substància entactògena aquella que provoca sentiments d'aproximació als altres, empatia i sociabilitat.

3.5.1 Efectes aguts

3.5.1.1 Efectes desitjats: Eufòria, benestar, estimulació i augment de l'energia, disminució de la son, extroversió, sentiments de proximitat amb els altres, empatia, sociabilitat, intensificació de la percepció visual, tàctil i acústica, moderada desrealització (sense al·lucinacions, efectes disfòrics) (Liechti et al., 2000).

3.5.1.2 Efectes no desitjats: Com a contrapartida dels efectes desitjats l'MDMA provoca també una sèrie d'efectes adversos depenen de la dosi consumida. Els principals efectes fisiològics d'aquesta substància inclouen un augment de la pressió arterial, taquicàrdia, palpitations, bruxisme, nistagmes, midriasis, dolor muscular, hipertèrmia, nàusees, tremolor, sudoració, hiperreflèxia i insomni. La hipertèrmia és un dels efectes colaterals més importants, ja que s'han reportat casos on la temperatura corporal va assolir més de 43°C. Evidentment, això pot donar lloc a efectes toxicològics molt importants, com rabdomiòlisi, coagulació intravascular disseminada i fallada renal. També s'ha comprovat que provoca canvis en el sistema neuroendocrí, produint un increment en plasma de les hormones adrenocorticotropa (ACTH), cortisol, prolactina, dehidroepiandrosterona (DHEA), antidiürètica (ADH, vasopressina), oxitocina i un augment d'arginina, acompanyat d'una disminució plasmàtica de sodi (hiponatrèmia) (de la Torre et al., 2004b). El sistema immunitari també es veu afectat per l'efecte agut de la droga, fent que després del consum de l'MDMA hi hagi un període en que la immunocompetència està altament afectada. Les alteracions permanents en la homeòstasis immunològica que es registren poden comportar un empitjorament general de la salut amb un increment de la susceptibilitat de patir infeccions o trastorns relacionats amb el sistema immune (Pacifci et al., 2002). A nivell psicològic, dies després del consum de la substància els subjectes reporten sentiment de letargia, irritabilitat, depressió, mal humor i paranoia.

INTRODUCCIÓ

3.5.2 Efectes a llarg termini

Malauradament els efectes a llarg termini estan més relacionats amb la neurotoxicitat que presenta aquesta substància, encara que un estudi recent relaciona el consum d'èxtasi en el desenvolupament de malalties cardiovasculars (Baumann & Rothman, 2009). Els efectes neurotòxics són més difícils de determinar, ja que en humans aquests estan basats en mètodes indirectes o en estudis de neuroimage. D'altra banda, aquests estudis presenten la problemàtica que la gran majoria de consumidors d'èxtasis prenen també altres substàncies com tabac, alcohol, cànnabis, cocaïna, entre d'altres, el qual podria ser que alguns dels efectes atribuïts a l'MDMA siguin provocats per altres substàncies o que aquestes puguin potenciar els efectes nocius de la pròpia droga (Parrott, 2000; Dafters et al., 2004).

De totes maneres, estudis realitzats amb consumidors d'èxtasi mostren una reducció en la densitat de neurones serotoninèrgiques i del transportador de serotonina (5-HTT) en el còrtex i hipocamp. La densitat del 5-HTT en el còrtex i hipocamp està relacionada amb el rendiment de la memòria, suggerint que canvis en la seva densitat pot donar lloc a problemes de memòria (McCann et al., 2005, 2008; Kish et al., 2010). De fet, els efectes adversos més comunicats són problemes de memòria i aprenentatge, augment de la impulsivitat, depressió, atacs de pànic, entre altres problemes psiquiàtrics (Parrott, 2000, 2015; Jacobsen et al., 2004; de Win et al., 2006; Capela et al., 2009). Entre els estudis duts a terme hi ha una certa controvèrsia en el fet que no en tots els estudis s'ha correlacionat el consum de l'MDMA amb problemes cognitius. L'aparició, segurament, dels dèficits cognitius aniria molt lligada al tipus de consumidor ("heavy": persona amb un historial de gran consum d'èxtasi) (Mueller et al., 2016). Per exemple, Jager i col. (2007) (Jager et al., 2007) afirmen que no hi ha evidències d'efectes nocius en la funcionalitat del cervell a dosis baixes d'èxtasis (dosis màxima: 10 pastilles d'èxtasis), deixant una porta oberta a la discussió de l'ús terapèutic de l'MDMA, com alguns autors han proposat especialment en el tractament de l'estrès post-traumàtic (PTSD) (Doblin, 2002; Mithoefer et al., 2011; Oehen & Schnyder, 2013).

3.6 Mecanisme d'acció

L'MDMA actua principalment sobre el sistema monoaminèrgic, tenint una major afinitat pel sistema serotoninèrgic ($EC_{50} = 74.3 \pm 5.6$ nM), seguidament del noradrenèrgic ($EC_{50} = 136 \pm 17$ nM) i dopaminèrgic ($EC_{50} = 278 \pm 12$ nM) (Han & Gu, 2006; Baumann & Rothman, 2009). Actua com a substrat del 5-HTT utilitzant-lo per entrar dins de la cèl·lula, encara que a dosis altes pot entrar també per difusió. Un cop dins la cèl·lula provoca un alliberament de la serotonina (5-HT) de les vesícules d'emmagatzematge, possiblement a través del transportador vesicular (VMAT), per canvis en el gradient de pH, fent que incrementi la concentració de 5-HT al citosol. Degut a aquest increment de neurotransmissor (NT) en el citosol, es produeix un alliberament massiu de 5-HT en l'esclatxa sinàptica mitjançant el 5-HTT, el qual inverteix la seva funcionalitat, inhibint la posterior recaptació del NT (White et al., 1996; Green et al., 2003; Capela et al., 2009). A més a més, l'MDMA inhibeix l'activitat de l'enzim triptòfan hidroxilasa (THP), enzim limitant de la síntesi de 5-HT, efecte que provoca una reducció en la síntesi d'aquest NT, afavorint la depleció. També és un inhibidor reversible de l'enzim monoamino oxidasa A (MAO-A) i parcialment de la MAO-B, enzims encarregats de la degradació de les catecolamines, les quals es troben en la membrana externa del mitocondri (Leonardi & Azmitia, 1994). La suma de tots aquests processos fan que hi hagi una gran concentració de 5-HT en la sinapsis, donant lloc als efectes tan característics d'aquesta substància. Els efectes al·lucinògens de la droga són conseqüència de l'estimulació del receptor serotoninèrgic 5-HT_{2A} (Figura 8).

Per altra banda, s'ha observat que l'MDMA també s'uneix a altres receptors amb alta afinitat com el receptor α_2 -adrenèrgic, el receptor d'histamina H₁ i el receptor muscarínic M₁. També s'uneix, encara que no amb tanta afinitat, amb el receptor α_1 -adrenèrgic, muscarínic M₂, β -adrenèrgic, 5-HT₁, i els receptors de dopamina (DA) D₁ i D₂ (Capela et al., 2009). Recentment també s'ha descrit que actua sobre els receptors nicotínics $\alpha_4\beta_2$ i com agonista parcial dels receptors nicotínics α_7 (Garcia-Ratés et al., 2010). Els sistemes dopaminèrgic, GABAèrgic i

INTRODUCCIÓ

glutamatèrgic també estan implicats en el seu mecanisme d'acció (Simantov, 2004).

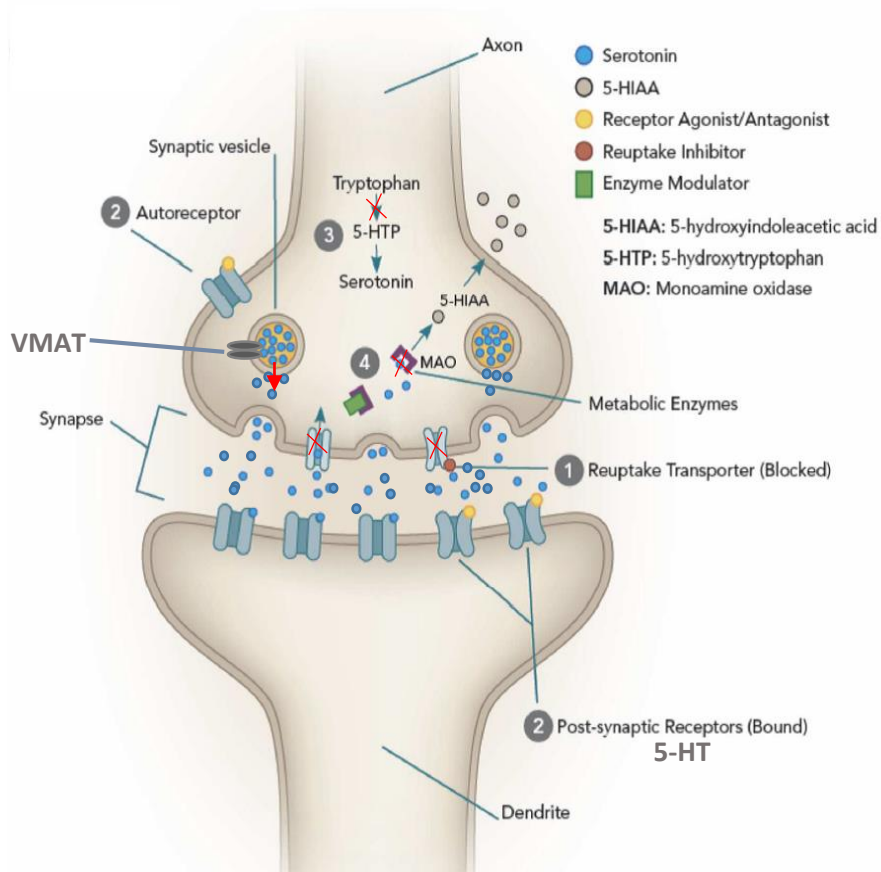


Figura 8. Esquema del mecanisme d'acció de l'MDMA sobre els terminals serotoninèrgics.

3.7 Neurotoxicitat

La neurotoxicitat de l'amfetamina ve determinada pels efectes aguts que produeix, tenint aquests conseqüències a llarg termini. En el procés de generació de la neurotoxicitat hi estan involucrats efectes com la hipertèrmia, l'alliberament massiu de 5-HT, DA i NA, la formació d'estrès oxidatiu, l'excitotoxicitat o alteracions en el mitocondri. Tenint en compte la seva acció directa sobre el SNC, la recerca en humans queda molt limitada, així doncs els estudis en animals de laboratori són d'una

gran ajuda per poder comprendre el mecanisme pel qual l'MDMA provoca els seus efectes. Cal destacar, però, que la neurotoxicitat que presenta aquest compost és una neurotoxicitat espècie-selectiva. En humans, primats i rata actua com a neurotoxina fonamentalment serotoninèrgica, mentre que en ratolí és principalment dopaminèrgica.

3.7.1 Efectes a llarg termini sobre els terminals

El primer estudi en reportar que l'MDMA produïa neurotoxicitat serotoninèrgica en rata va ser publicat l'any 1986 per Schmidt (Schmidt et al., 1986). Des de llavors, un gran nombre d'estudis han descrit alteracions en aquest sistema. La neurotoxicitat d'aquesta amfetamina està associada a una reducció a llarg termini en els marcadors bioquímics del sistema serotoninèrgic, sobretot una disminució dels nivells de 5-HT i el seu principal metabòlit l'àcid 5-hidroxiindolacètic (5-HIAA). Aquests estudis confirmen que les reduccions més severes es localitzen al neocòrtex, estriat i hipocamp (Schmidt et al., 1986; Stone et al., 1986; Commins et al., 1987; O'Hearn et al., 1988). A més a més, la unió de [³H]paroxetina al 5-HTT pre-sinàptic (substància marcador d'aquest sistema de transport) es troba reduïda indicant neurodegeneració dels terminals serotoninèrgics. L'activitat de l'enzim TPH també es troba disminuïda. Segons diferents estudis la taxa de recuperació neuronal sembla ser dependent de la regió cerebral afectada i de la dosi, comprenent de poques setmanes fins a un any (Battaglia et al., 1988; Scanzello et al., 1993). La neurotoxicitat serotoninèrgica és de lluny la més estudiada, però alguns autors descriuen alteracions en altres regions del cervell. Així, Schmued va analitzar la localització de la degeneració neuronal induïda per l'MDMA (20 o 40mg/kg dosi única) en tot el cervell i va observar degeneració neuronal al còrtex parietal, còrtex insular, al talem ventromedial/ventrolateral i a la *tenia tecta* (Schmued, 2003).

Tal com s'ha esmentat anteriorment, l'MDMA difereix en la seva farmacologia en rata i en ratolí. Està ben establert que aquesta substància actua com a neurotoxina dopaminèrgica en ratolí, (Stone et al., 1986; O'Callaghan & Miller, 1994). O'Shea i col. (2001) van demostrar que la

INTRODUCCIÓ

fluoxetina no inhibia la toxicitat induïda per l'MDMA, tal com ocorre amb la rata (O'Shea et al., 2001). En canvi, en administrar un inhibidor de la recaptació de DA (GBR 12909), van observar un increment de l'alliberament de DA però una prevenció de la pèrdua de terminals dopaminèrgics 7 dies després. Els autors hipotetitzen que probablement l'MDMA no utilitza els transportador de DA per entrar a la cèl·lula sinó que a causa de la seva liposolubilitat ho fa per difusió passiva, i que probablement el GBR 12909 prevé l'entrada dins la cèl·lula dels metabòlits neurotòxics de l'MDMA evitant d'aquesta manera la seva toxicitat.

3.7.2 El paper de la dopamina

Diversos estudis han demostrat que l'MDMA provoca un alliberament de DA (Spanos & Yamamoto, 1989; Nash & Yamamoto, 1992), i que aquest increment de DA podria jugar un paper clau en la neurotoxicitat induïda per aquesta substància. Aquestes conclusions estan basades en el fet que el pretractament amb reserpina, 6-hidroxidopamina (6-OHDA) o amb un inhibidor selectiu del transportador de DA prevé la toxicitat de les neurones serotoninèrgiques induïda per l'MDMA (Stone et al., 1986; Brodtkin et al., 1993). D'altra banda, una administració intracerebroventricular (i.c.v.) de 5-HT facilita l'alliberament de DA (Benloucif et al., 1993; Koch & Galloway, 1997). Donat aquests estudis previs, Sprague i col. (1998) van elaborar una hipòtesi sobre la neurotoxicitat de l'MDMA on la DA hi juga un paper principal. Aquesta hipòtesi afirma que l'MDMA provoca un alliberament agut de 5-HT i DA, seguit d'una depleció intraneuronal de l'emmagatzematge de 5-HT. Aquest alliberament inicial de 5-HT activa els receptors post-sinàptics 5-HT_{2A/2C} localitzats en les neurones GABAèrgiques, resultant en una disminució de la transmissió GABAèrgica i un increment de la síntesi i alliberament de DA. Aquest excés de DA pot ser transportat a través del 5-HTT a dins del terminal serotoninèrgic depleccionat, on per acció de la MAO-B, la DA pot ser metabolitzada produint peròxid d'hidrogen (H₂O₂) i espècies reactives d'oxigen (ROS), donant lloc a una degeneració del terminal sinàptic (Sprague et al., 1998).

3.7.3 El paper de la hipertèrmia

S'han dut a terme un gran nombre d'estudis on es relaciona el paper de la hipertèrmia en la neurotoxicitat induïda per aquesta substància. A més s'ha observat que en rata la temperatura ambiental pot afectar la resposta neurotòxica de la droga, un fet a destacar si considerem que els adolescents normalment la consumeixen en ambients tancats i on la temperatura és més elevada. L'MDMA genera poiquilotèrmia, així una temperatura ambiental alta afavoreix la hipertèrmia després de l'administració de l'MDMA, mentre que una temperatura ambiental baixa provoca hipotèrmia (Malberg & Seiden, 1998; Green et al., 2004). Molts autors relacionen la hipertèrmia amb una depleció més gran de NT, com 5-HT i DA (Malberg & Seiden, 1998; O'Shea et al., 2005). I d'altres conclouen que la hipotèrmia podria protegir de la neurotoxicitat (Malberg et al., 1996). En ratolins, l'MDMA produeix la mateixa resposta que l'observada en rates, no obstant els canvis detectats en la temperatura corporal després de l'administració del derivat amfetamínic són molt més variables que els observats en rata. Encara que s'ha reportat una resposta hipertèrmica, aquesta varia en funció de la dosi i la soca. Per exemple, quan l'MDMA va ser administrat a la soca C57/Bl6 (20 mg/kg, cada 2h 4 cops; s.c) els autors van descriure un increment de la temperatura aproximadament de 2°C amb una durada de 8 hores (Johnson et al., 2000, 2002a), en canvi el mateix laboratori utilitzant la soca BALB/c i dosis més baixes de la droga (5 i 10mg/kg cada 2h, 4 cops; s.c.), van observar una resposta hipotèrmica dependent de la dosi (Johnson et al., 2002b). O'Shea i col. (2001) va descriure un efecte bifàsic de la temperatura corporal dependent de la dosi en la soca Swiss-Webster, així doncs a una dosi baixa (10mg/kg cada 3h 3 cops; i.p.) l'MDMA va produir un efecte hipotèrmic, mentre que a dosis altes (30mg/kg cada 3h 3 cops; i.p.) va induir un efecte hipertèrmic següentament d'una hipotèrmia (O'Shea et al., 2001). Sembla que en ratolins els canvis de temperatura no estiguin tan relacionats amb la neurotoxicitat com en la rata.

Un dels altres mecanismes pel qual la hipertèrmia pot conduir a un increment de la neurotoxicitat és a través de la producció de ROS. Colado i col. (2001) van administrar conjuntament amb MDMA

INTRODUCCIÓ

clometiazol, un agent antioxidant el qual va ser capaç de prevenir tant la hipertèrmia com la producció de ROS en l'HC. No obstant, quan la temperatura de les rates es va mantenir elevada amb una manta tèrmica hi va haver una manca d'inhibició de la producció de ROS. Els autors postulen que la producció d'estrès oxidatiu podria ser previnguda inhibint la hipertèrmia (Colado et al., 2001).

Entre els diferents mecanismes que es consideren per explicar la hipertèrmia produïda per l'MDMA, la DA podria tenir-ne un paper clau, ja que l'administració conjuntament del derivat amfetamínic amb fluoxetina, un inhibidor de la recaptació de 5-HT, prevé la degeneració dels terminals serotoninèrgics induïda per l'MDMA però no té efecte sobre la hipertèrmia (Malberg et al., 1996; Sanchez et al., 2001). Per tant, els autors proposen que l'efecte hipertèrmic no depèn de l'alliberament de 5-HT. Aquesta hipòtesi queda reforçada per la inhibició de la hipertèrmia induïda per la p-cloroamfetamina, un alliberador de serotonina, amb l'antagonista del receptor D₁, SCH 23390 (Sugimoto et al., 2001). Actualment el mecanisme exacte encara no està del tot establert.

3.7.4 Estrès oxidatiu

La producció d'estrès oxidatiu ve generat per un desequilibri entre la producció de ROS i el seu mecanisme d'eliminació (Figura 9). Aquests desequilibris poden donar lloc a efectes tòxics importants danyant proteïnes, lípids i el DNA a través de la producció de peròxids i radicals lliures. Aquest fenomen és un factor comú en el desenvolupament i progressió de moltes malalties, entre les que destaquen les malalties neurodegeneratives, actualment un repte per la salut pública.

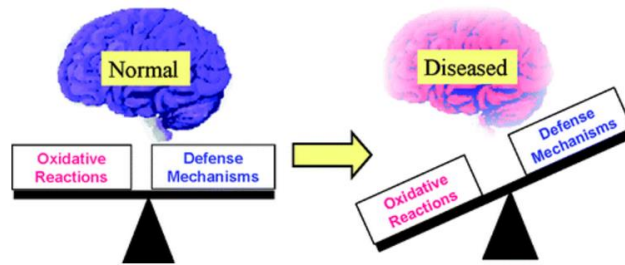


Figura 9. Representació gràfica del desequilibri la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) i els mecanismes antioxidants del SNC.

Una de les hipòtesis més ben establertes és que l'MDMA causa neurotoxicitat a través de la producció de ROS (Sprague & Nichols, 1995; Colado et al., 1997; Jayanthi et al., 1999), els quals poden ser formats per diferents mecanismes. En primer lloc és ben conegut que el propi metabolisme de la substància pot produir metabòlits altament reactius, com les quinones. Les quinones són compostos oxidants i electrofílics, amb una elevada predisposició a l'oxidació degut als seus potencials redox (Milhazes et al., 2006). Les quinones, com a compostos electrofílics, reaccionen amb nucleòfils com substàncies endògenes que contenen grups tiols com el glutatió (GSH) o N-acetilcisteïna (NAC) (Figura10) (Hiramatsu, 1990; Patel et al., 1991; Jones et al., 2005). Alguns autors hipotetitzen que aquests metabòlits són els responsables de la neurotoxicitat de l'MDMA, ja que l'administració i.c.v. de l'MDMA no produeix la toxicitat observada quan s'administra per via perifèrica (Esteban et al., 2001; Escobedo et al., 2005). Easton i col. (2003) van administra directament el metabòlit 5-(glutatió-S-il)- α -MeDA i van observar canvis en el comportament similars als produïts per l'administració perifèrica de l'MDMA, així com alteracions en el sistema dopaminèrgic, serotoninèrgic i noradrenèrgic a curt termini (Easton et al., 2003).

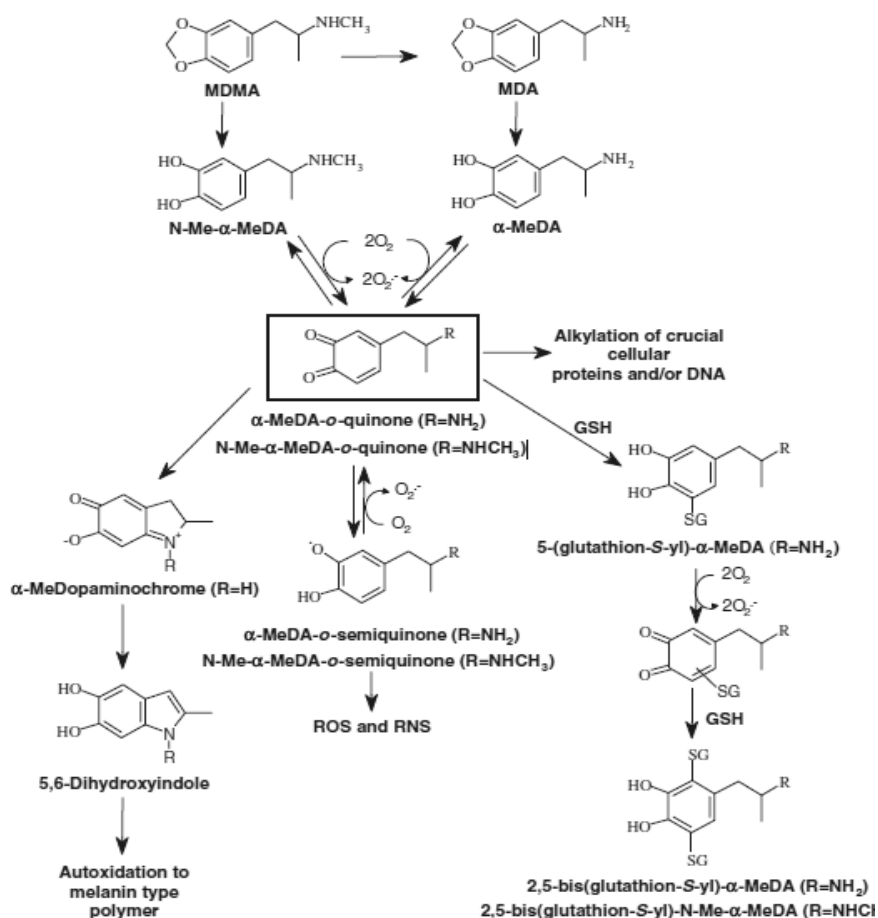


Figura 10. Mecanisme proposat per la producció dels derivats tòxics de l'MDMA com les orto-quinones, semiquinones i aminocrom. Els catecols són fàcilment oxidats a les seves corresponents ortoquinones, les quals poden entrar en el cicle redox i generar radicals semiquinones, portant a la formació de ROS i espècies reactives del nitrogen (RNS: reactive nitrogen species). Alternativament, les ortoquinones poden experimentar una adducció amb nucleòfils com el GSH, proteïnes o inclús el DNA. Quan les ortoquinones entren en procés de ciclació pot donar lloc a la formació d'aminocroms i compostos relacionats, els quals poden sotmetre's a més oxidació i polimerització formant pigments insolubles de melanina de color marró o negre (Capela et al., 2009).

Una altra font de generació de ROS és a través de la MAO que catalitza l'oxidació de monoamines com la DA, 5-HT i la NA. El metabolisme d'aquestes substàncies dona lloc a la formació residual de H₂O₂, que a la

vegada pot reaccionar amb el Fe^{2+} , generant el radical hidroxil ($\text{HO}\cdot$) (reacció de Fenton) (Monks & Lau, 1997). Diversos estudis han demostrat la implicació de la MAO-B en la neurotoxicitat de l'MDMA. Així, l'administració de selegilina, un inhibidor de la MAO-B, abans del tractament amb la droga reverteix els efectes tòxics a nivell del terminal serotoninèrgic, com la depleció de 5-HT, la peroxidació lipídica i la inhibició de l'enzim TPH. Sprague & nichols 1995 també van descriure que els animals knock-out (KO) en MAO-B són resistents als efectes tòxics serotoninèrgics de l'MDMA (Sprague & Nichols, 1995; Fornai et al., 2001).

D'altra banda, cal destacar també que la DA, *per se*, pot ser fàcilment oxidada i produir quinones que, com s'explica en l'apartat anterior, reaccionen fàcilment formant ROS. Aquesta ràpida oxidació no només involucra la DA, ja que la NA també es una catecolamina alliberada per l'MDMA.

Finalment, està descrit que l'MDMA pot incrementar els nivells de calci (Ca^{2+}) intracel·lular (Garcia-Ratés et al., 2010). Un increment de Ca^{2+} pot desencadenar una activació d'enzims dependents de Ca^{2+} , com l'òxid nítric sintetasa (NOS), resultant amb una generació d'òxid nítric (NO) que pot reaccionar amb el radical superòxid (O_2^-) amb la conseqüent formació del radical ONOO \cdot i produir estrès oxidatiu.

3.7.5 El paper del mitocondri

En els darrers anys el paper del mitocondri en la neurotoxicitat induïda per les amfetamines ha crescut considerablement, ja que aquest òrganul juga un paper clau en la correcta funcionalitat neuronal i la supervivència de la cèl·lula. Donat que el mitocondri és el principal productor de ROS en estat fisiològic, un petit desequilibri pot desencadenar un increment d'estrès oxidatiu alterant la funcionalitat d'aquest òrganul, donant lloc a l'aparició de diverses malalties.

L'interès per la implicació de el mitocondri va augmentar després que Nixford i col. (2001) demostressin que certs inhibidors de la cadena de transport d'electrons (ETC) podien incrementar la neurotoxicitat induïda

INTRODUCCIÓ

per l'MDMA, tan en rata com en ratolí (Nixdorf et al., 2001). Altres estudis han demostrat que l'administració de substrats del metabolisme energètic poden atenuar la neurotoxicitat. Així, la perfusió de nicotinamida (el precursor de la nicotinamida adenina dinucleòtid deshidrogenasa (NADH)) o la ubiquinona (o Coenzim Q10 que forma part de la ETC), 2 hores abans de la primera infusió d'MDMA (10mg/kg i.p cada 2h, 4 cops) i fins 6 hores després, va atenuar la depleció de 5-HT (analitzada 5 dies després) (Darvesh & Gudelsky, 2005). Puerta i col. (2010) van descriure una disminució en l'activitat del complex I després de l'administració de dosis creixents d'èxtasi (10, 20 i 30mg/kg cada 2h) en ratolins, que va ser evident des d'una hora després fins a les 24h post-administració, resultant en un increment del radical superòxid O_2^- , intensificant l'estrès oxidatiu (Puerta et al., 2010). A més, la DA per si mateixa pot inhibir l'activitat del complex I, sense tenir efecte en els altres complexos (II, IV o V) (Brenner-Lavie et al., 2008, 2009). Per tant, els autors hipotetitzen que donades les condicions que s'originen després de l'administració d'aquesta substància, com l'excés de DA i la inhibició de la MAO, podria ser que fos la mateixa DA la responsable de la inhibició del complex I. En neurones, l'alta dependència del mitocondri per abastar la demanda d'adenosina 5'-trifosfat (APT) i el tamponament de l'increment de Ca^{2+} per la neurotransmissió, requereix una regulació acurada del transit mitocondrial a través de l'axó. Barbosa i col. (2014) van demostrar una reducció del trànsit mitocondrial en cultius de neurones d'hipocamp tractades amb MDMA, dependent de la proteïna associada a microtúbuls TAU, a través de la implicació de l'activitat de la proteïna glicogen sintetasa 3β (GSK 3β). Les alteracions en el transport van ser dependents de les proteïnes mitofusina 2 (Mfn2) i proteïna relacionada dinamina (Drp1), les quals regulen els processos de fusió i fissió (Figura 11) (Barbosa et al., 2014). Aquests resultats concorden amb l'increment de fosforilació de TAU a través de la proteïna GSK 3β i l'activació de la quinasa dependent de ciclina 5 (CDK-5) en ratolins descrit per Busceti 2008 (Busceti et al., 2008). Alteracions en el transport mitocondrial o en l'equilibri dinàmic entre els processos de fusió i fissió pot contribuir a un dèficit neuronal important o fins i tot a la mort neuronal (Perier et al., 2012).

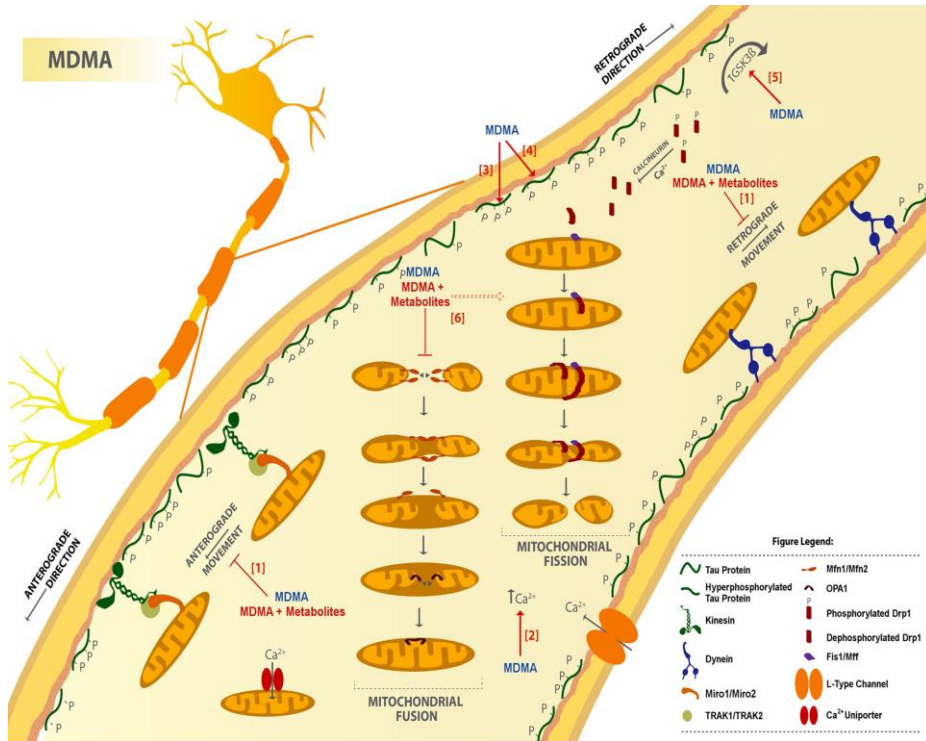


Figura 11. Mecanisme proposat per la deficiència en el transport mitocondrial, tant anterògrad com retrògrad, induït per l'MDMA i els seus metabòlits. 1) El derivat amfetamínic afecta tant el transport anterògrad com retrògrad. 2) L'augment en la concentració de Ca^{2+} està associat amb els dèficits de transport induïts per l'MDMA. 3-4) L'MDMA incrementa la fosforilació de Tau dependent de la proteïna GSK3 β , produint una desestabilització dels microtúbuls. 6) Tant l'MDMA com els seus metabòlits incrementen la fragmentació dels mitocondris axonals (Barbosa et al., 2014).

Alves i col. (2007) van descriure que l'administració d'MDMA en rates (10mg/kg s.c. cada 2h 4 cops) provoca a nivell del mitocondri un increment de la peroxidació lipídica i de carbonils proteics. Addicionalment, l'anàlisi del DNA mitocondrial (mtDNA) va revelar eliminacions en els gens de la nicotinamida adenina dinucleòtid fosfat deshidrogenasa subunitat I (NDI) i la subunitat II (NDII), subunitats del complex I mitocondrial, i el citocrom c oxidasa subunitat I del complex IV, amb el subsegüent empitjorament en els gens necessaris per la síntesi de proteïnes, les quals són complexes essencials per la producció d'energia a través de la ETC. Tots aquests efectes van ser revertits per l'inhibidor de la MAO-B, selegilina.

Ha quedat ben establert que l'MDMA pot afectar diversos processos essencials pel correcte funcionament del SNC, per tant la comprensió i l'estudi dels seus efectes sobre possibles alteracions del SNC és de gran importància per poder prevenir o combatre els efectes a llarg termini.

En els següents apartats estudiarem la relació entre aquest derivat amfetamínic i diferents alteracions del SNC.

4. MDMA, HIPOCAMP I MEMÒRIA

Tal com s'ha mencionat anteriorment, el PFC i l'HC són probablement les dues regions del cervell que més canvis sofreixen durant l'adolescència, i tant l'una com l'altra estan involucrades en processos essencials com la presa de decisions, l'aprenentatge i la memòria (Crews et al., 2007). Per tant, alteracions en aquestes dues regions poden repercutir seriosament en els processos cognitius.

4.1 Estructura i organització de l'HC

La formació hipocampal és una estructura en forma de C i es troba situat al lobus temporal medial. Es poden distingir 3 regions diferents: i) el gir dentat (DG), l'hipocamp pròpiament que consisteix en 3 zones CA (*Cornu Ammonis*): CA1, CA2, CA3 i el subicle. El terme hipocamp en sí, defineix la regió limitada pel subicle a un extrem i el gir dentat per l'altre (van Strien et al., 2009). L'HC conté dos regions de cèl·lules principals. L'extrem subicular està format per cèl·lules piramidals de mida petita i que corresponen a la regió CA1 de Lorente de Nó (1934). La zona proximal al gir dentat està caracteritzada per cèl·lules piramidals de mida més gran, que corresponen a la regió CA3, l'única que rep contactes sinàptics des de les fibres musgoses que provenen del gir dentat. Una altra de les regions presents en l'HC és la regió CA2, que es situa entre les dues anteriors (Kosaka et al., 1988; Ribak et al., 1996; van Strien et al., 2009). Les neurones principals de les regions CA són

neurones piramidals (glutamatèrgiques), denominades així per la seva morfologia i que constitueixen aproximadament el 90% de totes les neurones de les regions CA de la formació hipocampal (Sweatt, 2004). Els cossos cel·lulars de les cèl·lules piramidals es disposen en una capa simple de somes densament agrupats formant *l'estrat piramidal*. La disposició dels somes cel·lulars i projeccions dendrítiques i axonals en l'HC s'observa clarament en seccions transversals de l'òrgan, formant capes que es corben i pleguen unes sobre les altres.

El DG està format bàsicament per un sol tipus cel·lular, les cèl·lules granulars del DG, que formen una sola capa compacta que recobreix l'extrem lliure de la regió CA3, i que estan disposades en forma d'una V o una U. Al llarg de la capa granular i en tota la seva extensió es poden trobar interneurons de mida gran que utilitzen el GABA com a neurotransmissor (Stanfield & Cowan, 1988). Per sota de la capa granular es troba la denominada regió hilus o capa polimòrfica, compresa entre les dues vores de cèl·lules granulars del DG i la regió CA3 de la *banya de Amón*.

4.1.1 Connexions pròpies de l'HC

L'organització funcional bàsica de l'HC es denomina circuit trisinàptic, anomenat així perquè l'HC es considerat com una estructura que conté 3 sinapsis excitadores en sèrie. La primera, les fibres perforants derivades del còrtex entorrinal (que travessen el subicle i la fissura hipocampal en el seu camí cap al DG) contacten sobre les cèl·lules granulars del DG. La segona, els axons de les cèl·lules granulars, les fibres musgoses, formen sinapsis amb les cèl·lules piramidals de la CA3. Finalment, els axons de la CA3 de la via colateral de *Schaffer* contacten sinàpticament amb les cèl·lules de la CA1, les quals projecten, al seu torn, sobre el còrtex entorrinal tant directament com indirectament a través del subicle, tancant d'aquesta manera el circuit (Amaral & Witter, 1989) (Figura 12).

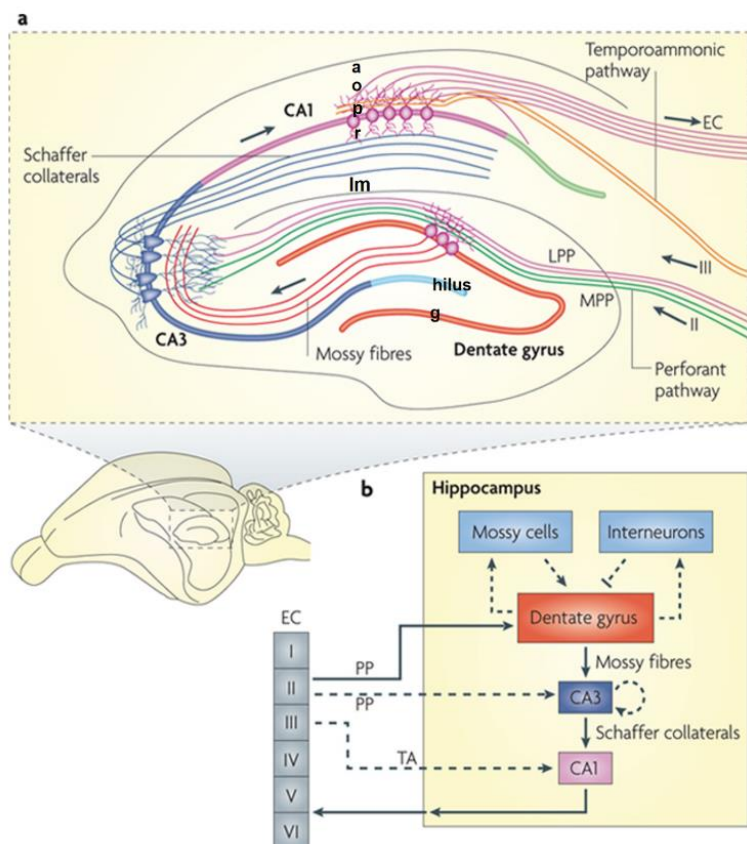


Figura 12. El circuit neuronal d'hipocamp en rosegador. a) Esquema del circuit hipocampal. a: estrat alveus, o: estrat oriens, p: estrat piramidal; r: estrat radiatum, Im: estrat lucunosum-moleculare, g: capa granular del gir dentat b) Diagrama de la xarxa neuronal d'hipocamp. La via excitatòria trisinàptica (còrtex entorrinal (EC) – gir dentat – CA3 – CA1 – EC) està dibuixada per fletxes contínues. Els axons de les neurones de la capa II del EC projecten cap al DG a través de la via perforant (PP), incloent la via perforant lateral (LPP) i la via perforant medial (MPP). El DG envia projeccions a les cèl·lules piramidals de la CA3 mitjançant les fibres musgoses. Les neurones piramidals de la CA3 transmeten la informació a les neurones piramidals de la CA1 a través de la via de Schaffer. Les neurones de la CA1 envien projeccions de tornada a les capes profundes de les neurones del EC. La CA3 també rep projeccions directes de la capa II del EC mitjançant la via PP. La CA1 rep entrada directa de la capa III del EC a través de la via temporoammonic (TA). Les cèl·lules del DG també projecten a les cèl·lules musgoses del hilus i a les interneurons hilars, les quals envien projeccions excitatòries i inhibidores, respectivament, a les cèl·lules granulars (Deng et al., 2010).

Naturalment, aquest circuit intrínsec tancat pot ampliar-se considerant altres tipus de connexions sinàptiques i altres vies. L'HC és el component central del sistema límbic, que a més comprèn el còrtex olfatiu, l'amígdala, l'àrea septal, els cossos mamil·lars i els nuclis talàmics

anteriors. Els components de l'estructura hipocàmica es troben altament interconnectats a través de circuits neuroanatòmics, i extensament amb els còrtexs d'associació del lòbul temporal, que reben senyals tant de les àrees d'associació de totes les modalitats sensorials com de l'hipocamp (Figura 13). Constitueix, doncs, una estructura de flux d'informació bidireccional de totes les regions associatives corticals del SNC (Squire & Zola-Morgan, 1991). Això suggereix que l'HC forma part d'un sistema d'integració sensorial multimodal dins del SNC, participant en processos tals com la memòria i l'aprenentatge (Morris et al., 1982; Sweatt, 2004).

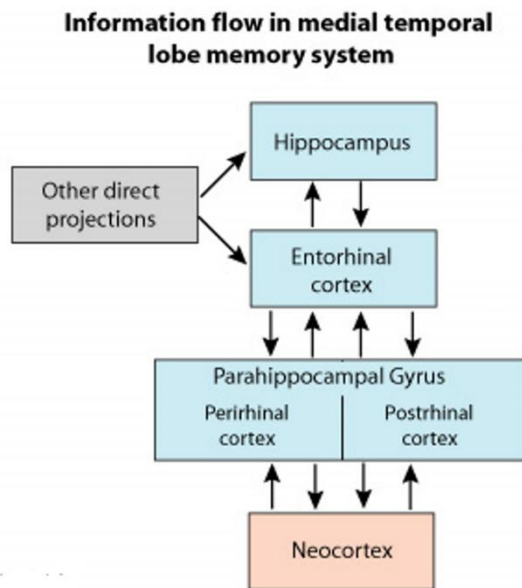


Figura 13. Esquema del flux d'informació en el sistema de memòria del lòbul temporal medial. Les estructures que estan en blau són les que formen part d'aquest sistema. El neocòrtex, el qual transporta informació sobre l'entorn, projecta a l'hipocamp a través del còrtex entorhinal (Bizon & Gallagher, 2005).

4.2 Aprenentatge, memòria i plasticitat

L'aprenentatge és el procés pel qual un individu adquireix uns coneixements o habilitats. La memòria és el procés cognitiu pel qual es codifica, s'emmagatzema, i es recupera informació i experiències passades. La memòria i l'aprenentatge estan relacionats entre sí però són

INTRODUCCIÓ

dos processos diferents. La memòria depèn de l'aprenentatge perquè porta a l'emmagatzemament i a la recuperació de la informació apresada. Però l'aprenentatge també depèn en certa mesura de la memòria, en la qual el coneixement emmagatzemat en la nostra memòria proporciona el marc en el qual el nou coneixement està vinculat per l'associació i la inferència. Aquesta capacitat dels humans per recordar experiències passades per tal d'imaginar el futur i planificar accions és un atribut altament avantatjós en la nostra supervivència i en el desenvolupament com espècie.

La memòria pot ser classificada en:

- Memòria a curt termini, és la part inicial de la memòria i s'encarrega d'organitzar i analitzar informació, la duració és de segons.
- Memòria a llarg termini, és el que pròpiament entenem per memòria, són els nostres coneixements del món físic, els records d'esdeveniments, etc. Existeixen dos categories principals de memòria a llarg termini:
 - ✓ *memòria implícita*, la qual no és dependent de l'HC i inclou la memòria procedimental, on les regions del cerebel i l'estriat es troben implicades, i la memòria emocional o perceptiva, amb la participació de l'amígdala;
 - ✓ *memòria declarativa o explícita*, la qual depèn de la formació hipocampal i inclou la memòria episòdia i semàntica (Figura 14).

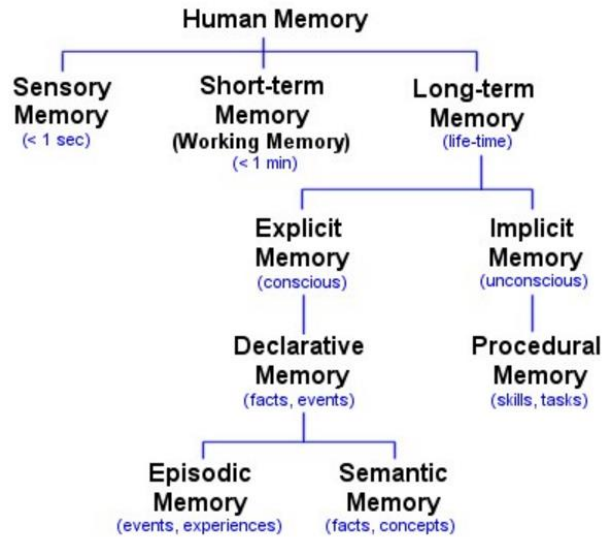


Figura 14. Esquema de classificació de la memòria. (www.human-memory.net)

L'aprenentatge implica plasticitat neuronal, es a dir, canvis a nivell estructural i bioquímic en les sinapsis, alterant els efectes de les neurones post-sinàptiques. Aquest procés principalment es dona a la formació hipocampal. A nivell cel·lular, un concepte important de plasticitat sinàptica rellevant per la formació de la memòria a llarg termini és la potenciació a llarg termini o *long-term potentiation* en anglès (LTP). La LTP potencia la transmissió de la senyal entre dos neurones adjacents i pot ser induïda per una estimulació d'alta freqüència en la sinapsis. Es creu que el NT glutamat juga un paper important en la formació de la LTP activant els receptor N-metil-D-aspartat (NMDA) i els receptor àcid α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazolepropionic (AMPA) hipocampals, els quals estan localitzats en la superfície de la membrana de les neurones. L'activació d'aquests receptors dona lloc a l'obertura dels canals de Ca^{2+} i Na^+ , on l'increment de Ca^{2+} porta a l'activació de l'adenilat ciclasa, el qual converteix l'ATP en monofosfat d'adenosina cíclic (cAMP). La formació de cAMP contribueix a l'activació de la proteïna kinasa A (PKA) i de la proteïna CREB (cAMP response element-binding factor). El CREB actua com a factor de transcripció al nucli induint la transcripció i incrementant la producció de diferents

INTRODUCCIÓ

proteïnes essencials per la construcció de noves sinapsis (Figura 15) (Abel & Lattal, 2001). S'ha demostrat que la eficàcia sinàptica pot induir canvis morfològics en les espines dendrítiques, les qual són petites protuberàncies que es troben en la superfície de les neurones i formen part del component post-sinàptic de la gran majoria de les connexions sinàptiques excitatòries del cervell. S'ha suggerit que l'augment de la grandària i/o nombre d'espines dendrítiques augmenta la solidesa de les connexions entre les neurones. Els canvis morfològics en les espines dendrítiques requereixen de la síntesi de noves proteïnes, incloent components del citoesquelet, quinases i receptors. Aquest procés es creu que és el mecanisme cel·lular subjacent al fenomen de LTP (Harris et al., 2003; Soria Fregozo & Pérez Vega, 2012).

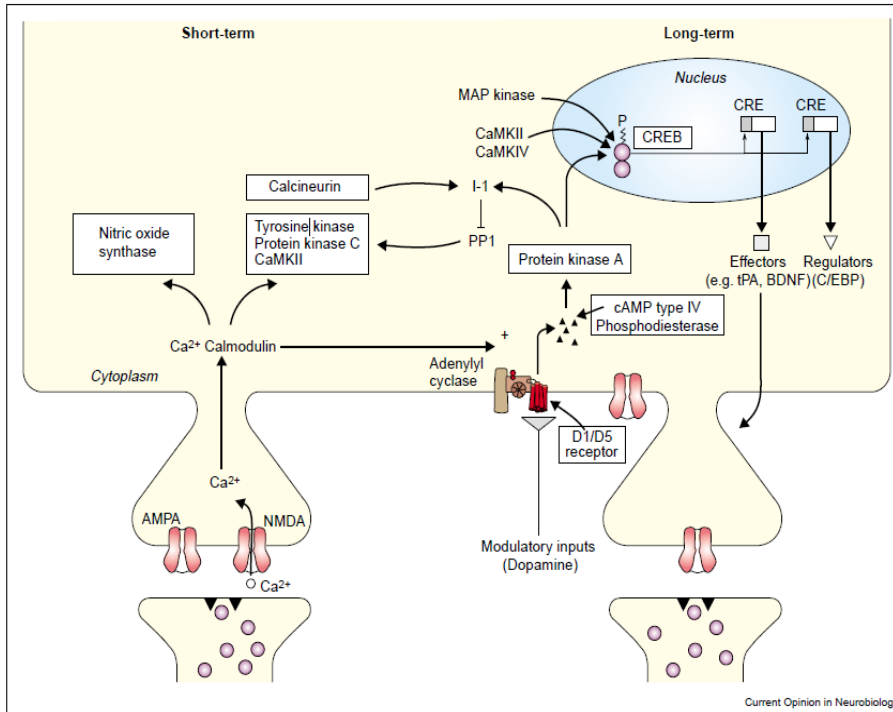


Figura 15. Esdeveniments moleculars subjacents a la potenciació tant a curt com a llarg termini. L'estimulació dels receptors NMDA, com a resultat de la despolarització post-sinàptica a través dels receptors AMPA i de la unió del glutamat, permet l'entrada de Ca²⁺ a la neurona post-sinàptica. Entre els efectes immediats del Ca²⁺ es troben l'activació de CaMKII, PKC i la calcineurina. La LTP es produeix quan l'adenilat ciclasa es activa per Ca²⁺ o per una corrent modulatòria, la qual activa l'adenilat ciclasa a través dels receptors acoblats a proteïna G. Això porta a un increment dels nivells de cAMP, la qual activa PKA i transloca al nucli on fosforila CREB. Altres proteïnes, com CaMKII, CaMKIV i MAP quinases (MAPK), també regulen l'expressió gènica. CaMKII: Calci Calmodulina proteïna quinasa II; CaMKIV: Calci Calmodulina Proteïna quinasa IV; PKC: proteïna quinasa C; MAPK: proteïnes quinases activades per mitogens (Mitogen Activated Protein Kinases); PKA: Protein quinasa A. (Abel & Lattal, 2001)

4.3 Efectes de l'MDMA en els processos cognitius

Estudis realitzats amb neuroimatge han demostrat una reducció de la densitat del SERT en consumidors d'MDMA (Semple et al., 1999; Reneman et al., 2001; Thomasius et al., 2003; McCann et al., 2005, 2008), indicant que l'MDMA pot causar neurotoxicitat en humans, tal com s'ha esmentat en apartats anteriors. Encara que la magnitud i la persistència de la neurotoxicitat d'aquesta droga, així com les seves

INTRODUCCIÓ

conseqüències a nivell funcional són tema de controvèrsia.(Morgan, 2000; Green et al., 2003; Gouzoulis-Mayfrank & Daumann, 2006; Baumann et al., 2007; Capela et al., 2009) les evidències globals suggereixen que dosis altes d'MDMA en animals de laboratori i un consum alt en individus produeix alteracions cognitives que poden perdurar en el temps, particularment donant lloc a dèficits d'aprenentatge i memòria. Diversos estudis afirmen que la toxicitat que provoca l'MDMA en l'HC podria ser la base d'alguns d'aquests dèficits. Cal tenir en compte que l'HC és una de les àrees més susceptibles a la degeneració serotoninèrgica induïda per la droga (Sharkey et al., 1991). Per exemple, Sprague i col (2003) van observar neurotoxicitat serotoninèrgica en l'HC, amb una disminució del 34% dels nivells de 5-HT, després d'un regim agut d'MDMA (20mg/kg 2 cops al dia cada 12h) 2 setmanes després del tractament. A més els autors van realitzar el test del laberint d'aigua (Morris Water Maze) una setmana després de l'administració de la droga i van observar un dèficit en la memòria de referència però no en la fase d'adquisició. Els autors conclouen que aquest dèficit de memòria esta relacionat amb la toxicitat en l'hipocamp produïda per la droga (Sprague et al., 2003). Un altre estudi dut a terme per Broening i col. (2001) va demostrar que l'MDMA produïa diferents efectes segons l'edat en que la rata era tractada. Així doncs, rates acabades de néixer tractades del dia postnatal 11 al 20 (5, 10 o 20mg/kg dos dosis cada 8h), van mostrar un empitjorament de l'aprenentatge espacial i de la memòria de manera dosis-dependent en l'edat adulta, mentre que rates neonatals tractades del dia 1 al 10 no van mostrar pràcticament cap tipus de dèficit en memòria o aprenentatge. En aquest cas, el dèficit cognitiu no es relaciona amb canvis en els nivells de NT, ja que la determinació d'aquests va revelar una disminució en els nivells de 5-HT i un increment en NA en HC en tots els grups tractats amb l'MDMA (Broening et al., 2001). Aquests resultats suggereixen que l'efecte de l'MDMA depèn de la fase de maduració del SNC en el moment d'administrar la droga. Addicionalment, també s'han descrit alteracions en la LTP, encara que amb resultats contradictoris. Arias-Cavieres i col. (2010) van observar una disminució de la LTP en HC després de l'administració d'MDMA, mentre que Morini i col. (2011) i Rozas i col. (2012), descriuen un increment (Arias-Cavieres et al., 2010; Morini et al., 2011; Rozas et al., 2012). D'altra banda, estudis realitzats amb amfetamina afirmen que

aquesta és capaç de millorar la memòria tant en animals de laboratori com en humans (Soetens et al., 1993; Brown et al., 2000; Wiig et al., 2009). Un estudi clínic realitzat amb pacients d'esclerosi múltiple va demostrar l'eficàcia de la l-amfetamina en millorar els processos cognitius dels pacients (Benedict et al., 2008). Els efectes en els processos cognitius de les amfetamines semblen dependre, entre altres factors, de l'espècie i l'edat en que la droga es estudiada, del regim d'administració i el temps d'abstinència entre l'administració del derivat amfetamínic i el test cognitiu.

Està ben establert que les drogues d'abús produeixen addicció, i que aquesta ve donada per una sèrie de canvis extremadament estables en el cervell que són els responsables de la conducta anòmala del consumidor. Diversos estudis postulen que el mecanisme molecular i cel·lular subjacent a la plasticitat associada a l'addicció dels psicoestimulants podria ser similar a aquell implicat en els processos d'aprenentatge i memòria (Nestler, 2001; Beninger & Gerdjikov, 2004; D.M. et al., 2009). Alguns autors han confirmat que l'administració del derivat amfetamínic pot produir un increment del factor neurotròfic derivat del cervell (*Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) en anglès), un factor de creixement amb la funció de mantenir la supervivència de les neurones existents i fomentar el creixement i la diferenciació de noves neurones i sinapsis (Martínez-Turrillas et al., 2006; Hemmerle et al., 2012), a més de modificar l'activitat de CREB (Garcia-Osta et al., 2004) i incrementar c-FOS en varies zones del cervell (Stephenson et al., 1999).

Estudis realitzats investigant les conseqüències de l'MDMA a llarg termini sobre la memòria i l'aprenentatge en ratolins són escassos, probablement degut a que en ratolí el derivat amfetamínic no provoca degeneració dels terminals sinàptics en HC (Chipana et al., 2006). Tot i així, s'ha descrit que els animals tractats amb una dosi aguda i neurotòxica d'MDMA (20mg/Kg, 2 cops) presenten dèficits en la memòria a llarg termini (Ros-Simó et al., 2013). A més també s'ha publicat que l'administració aguda de la droga redueix l'adquisició i l'execució del test d'evitació activa (*active avoidance*), mentre que el tractament previ repetitiu deteriora l'adquisició i recuperació d'aquesta tasca (Trigo et al., 2008).

5. MDMA I NEURODEGENERACIÓ EXCITOTÒXICA

La neurodegeneració excitotòxica és la patologia per la qual les cèl·lules nervioses pateixen disfuncionalitat neuronal i degeneració per una excessiva estimulació de la neurotransmissió glutamatèrgica. Aquesta mort excitotòxica ha estat implicada en diverses alteracions del SNC, com les malalties neurodegeneratives, la isquèmia cerebral i l'epilèpsia, entre d'altres.

5.1 Increment de Ca^{2+} i excitotoxicitat

Els ions de Ca^{2+} son missatgers intracel·lulars que controlen un gran nombre de funcions cel·lulars com el control del creixement i diferenciació cel·lular, l'excitabilitat de la membrana, el procés d'exocitosi i l'activitat sinàptica. Per tant, les neurones disposen d'un mecanisme homeostàtic complex per controlar tant la concentració de Ca^{2+} intracel·lular com la localització dels ions. Aquests mecanismes consisteixen en interaccions complexes entre 4 categories d'esdeveniments: entrada de Ca^{2+} , tamponament, emmagatzematge intern i sortida de Ca^{2+} (Figura 16) (Sattler & Tymianski, 2000).

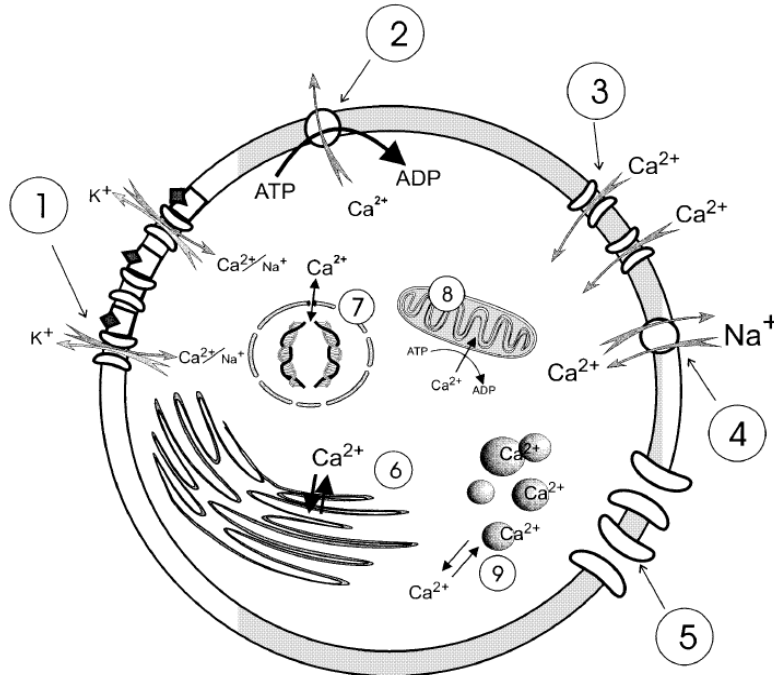


Figura 16. Representació esquemàtica de la homeòstasi del Ca^{2+} en neurones. 1) Entrada de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ amb sortida de K^{+} pels receptors ionotòpics, com els de glutamat. 2) Sortida de Ca^{2+} a través de la bomba iònica amb despesa d'ATP. 3) Entrada de Ca^{2+} a través dels canals dependents de voltatge. 4) Sortida de Ca^{2+} via intercanviador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$. 5) canals iònics addicionals que contribueixen a la repolarització de la membrana i la homeòstasi iònica. 6) Segrest i alliberament de Ca^{2+} a través del reticle endoplasmàtic. 7) Flux de Ca^{2+} a través de la membrana nuclear amb efectes potencials en la transcripció dels àcids nucleics. 8) Segrest de Ca^{2+} a través del mitocondri. 9) Tamponament del Ca^{2+} intracel·lular per les proteïnes d'unió al Ca^{2+} (CaBP) (Sattler & Tymianski, 2000).

Malgrat tots els estudis duts a terme per donar suport a la relació de la sobrecàrrega intracel·lular de Ca^{2+} i el procés de neurotoxicitat, els detalls del mecanisme exacte pel qual el Ca^{2+} desencadenaria la mort neuronal a dia d'avui no estan del tot definits, encara que probablement participi més d'un mecanisme. Molts autors han descrit que l'acció neurotòxica de la sobrecàrrega de Ca^{2+} es atribueix a la sobrestimulació d'enzims com calpaïnes o altres proteases, proteïnes quinases, l'òxid nítric sintetasa, calcineurines i endonucleases. Presumiblement, això portaria a la sobreproducció de productes tòxics com radicals lliures, alteracions letals en l'organització del citoesquelet, o l'activació de senyals genètiques resultant en mort cel·lular (Figura 17). (Sattler &

INTRODUCCIÓ

Tymianski, 2000; Arundine & Tymianski, 2003; Szydlowska & Tymianski, 2010).

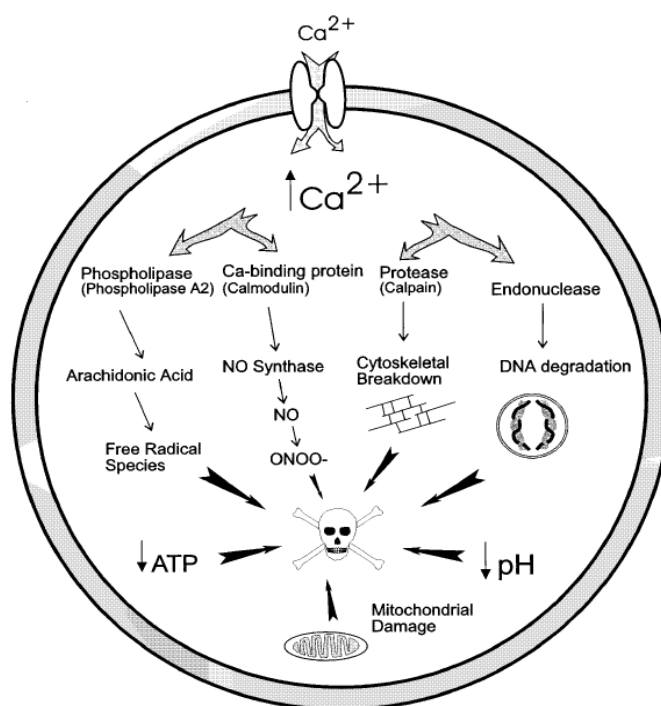


Figura 17. Representació esquemàtica de les diferents vies per les quals el Ca^{2+} pot induir mort neuronal (Sattler & Tymianski, 2000).

A causa de la presència ubiqüa dels ions de Ca^{2+} en les cèl·lules, els diferents processos fisiològics dependents de Ca^{2+} es regulen per separat a través de diferents vies de senyalització. Existeixen diferents rutes d'entrada de Ca^{2+} a la cèl·lula, i moltes d'elles presenten una desregulació després de processos com l'excitotoxicitat. Sattler i col. (1998) van demostrar que el principal determinant de la neurotoxicitat induïda pel Ca^{2+} es la via per la qual aquest catió entra en la cèl·lula. Així, l'entrada de Ca^{2+} mitjançant els canals de Ca^{2+} dependents de voltatge no provoca mort cel·lular, mentre que l'entrada a través de receptors glutamatèrgics està associada amb una toxicitat Ca^{2+} dependent (Sattler et al., 1998). La recerca ha acabat implicant tots els membres de la família dels receptors glutamatèrgics en l'excitotoxicitat (Choi, 1987).

5.2 Receptor glutamatèrgics

Existeixen dos grans grups de receptors de glutamat: els receptors ionotròpics (iGluR) i els metabotròpics (mGluR). Els primers regulen el pas d'ions a través de la membrana plasmàtica i la seva permeabilitat a aquests es modifica quan el glutamat s'uneix al receptor. Els tres majors tipus de receptors que formen els iGluR són: els NMDA, AMPA i 2-carboxil-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina (Kainat). Els receptors metabotròpics, en canvi, després de la unió del glutamat modifiquen la seva interacció amb altres proteïnes citosòliques via proteïnes G, i donen lloc a l'activació de determinades cascades de senyalització intracel·lular (Figura 18) (Kew & Kemp, 2005).

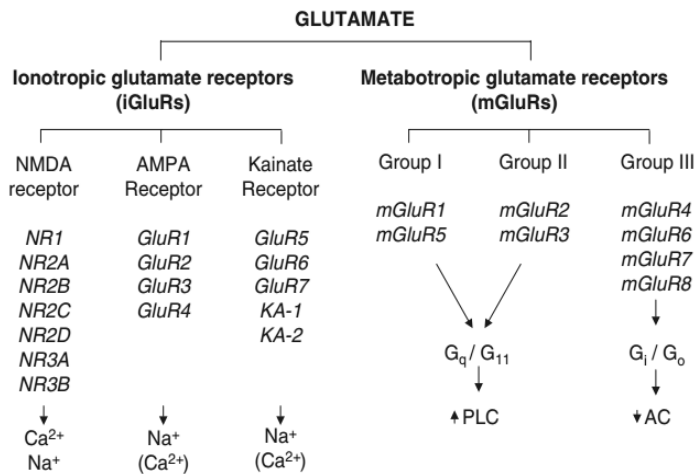


Figura 18. Esquema de la família dels receptors glutamatèrgics. Actualment, la nomenclatura dels receptors de KA s'ha modificat. GluR5 = GluK1; GluR6=GluK2; GluR7=GluK3; KA-1=GluK4; KA-2=GluK5. (Kew & Kemp, 2005)

5.2.1 Receptors NMDA

Són els receptors glutamatèrgics més estudiats i la seva implicació en processos del SNC va des de l'aprenentatge i la memòria fins a la neurodegeneració. Es caracteritzen per posseir una alta permeabilitat al Ca²⁺. Quan s'uneix el glutamat o l'agonista NMDA al receptor, s'estimula l'obertura del canal alliberant Mg²⁺ i permetent l'entrada de Ca²⁺, que actuarà com a segon missatger activant diverses cascades de

INTRODUCCIÓ

senyalització (Mori et al., 1992). Aquests receptors estan formats per la combinació de tres subunitats diferents, NR1-3. Normalment són heterotretàmers compostos de dos subunitats NR1 i dos NR2. Conjuntament les dos subunitats NR1 formen el canal d'ió adequat i exhibeixen totes les propietats clàssiques atribuïdes als receptors NMDA (NMDAR), incloent l'activació per glutamat, el bloqueig per magnesi (Mg^{2+}), la inactivació per zinc (Zn^{2+}), l'activació per glicina, les interaccions amb poliamines i la sensibilitat al pH. La despolarització dels receptors es necessària per alliberar electroestàticament el Mg^{2+} , que es troba bloquejant el porus del canal iònic. Fisiològicament, el Mg^{2+} pot ser retirat per l'activació d'altres receptors glutamatèrgics ionotròpics (AMPA i Kainat) (Lau & Tymianski, 2010). S'ha demostrat, també, que el Zn^{2+} pot alternativament inhibir les corrents dels receptors NMDA provocades pel glutamat (Mayer & Vyklicky, 1989).

En contra, les subunitats NR2 tenen un paper més regulador en els NMDAR. Existeixen 4 subtipus (NR2A-D), on el subtipus NR2A és àmpliament distribuït en el cervell, el NR2B s'expressa particularment en el prosencèfal, el NR2C en el cerebel i el subtipus NR2D en el tàlem. Aquestes subunitats modulen les característiques de les subunitats NR1 esmentades anteriorment. L'activació dels NMDAR requereix la unió simultània dels dos co-agonistes glicina i glutamat (Johnson & Ascher, 1987). La glicina s'uneix a les subunitats NR1 i NR3, mentre que el glutamat s'uneix a la subunitat NR2 (Paoletti & Neyton, 2007b). A més, en els darrers anys les subunitats NR2 han pres protagonisme, ja que s'ha descrit que participen en l'arquitectura post-sinàptica. S'ha demostrat que les subunitats NR2B s'uneixen a proteïnes post-sinàptiques, creant microambients post-sinàptics especialitzats.

Les subunitats NR3 s'expressen en dos isoformes: NR3A, la qual s'expressa en tot el SNC, i la NR3B que s'expressa majoritàriament en neurones motores. Les subunitats NR3 semblen no formar part dels receptors NMDA funcionals quan s'expressen conjuntament amb una de les dos subunitats NR1 o NR2 soles (NR1/NR3 o NR2/NR3) (Paoletti & Neyton, 2007b).

Està ben establert que l'activació dels NMDAR en l'hipocamp està involucrada en la formació de la LTP i l'aprenentatge espacial. Morris i col. (1986) van demostrar que el bloqueig dels NMDAR per l'àcid D(-)-2-amino-5-fosfonovalèric (AP5), un antagonista d'aquest receptors empitjora l'aprenentatge en rates en el MWM i bloqueja la formació de la LTP (Morris et al., 1986). A més, l'activació d'aquest receptors sembla estar implicada en el procés cel·lular de consolidació de la memòria (veure figura 15) (Nakazawa et al., 2004). Per tant, estudis de comportament en rosegadors en els qual la funció dels NMDAR està bloquejada per manipulacions farmacològiques o genètiques indica que els NMDAR hipocampals són crucials per l'adquisició de la memòria dependent de l'hipocamp i particularment per la memòria episòdica. D'altra banda, l'avenç en les tècniques genètiques està començant a revelar les funcions d'aquests receptors en les diferents àrees hipocampals. Així, per exemple els NMDAR en les neurones piramidals de la CA1 semblen tenir un paper important en l'adquisició de la memòria espacial de referència, mentre que els NMDAR de l'àrea CA3 semblen ser importants en la ràpida adquisició de la memòria episòdica i en la recuperació de la memòria associativa (Nakazawa et al., 2004).

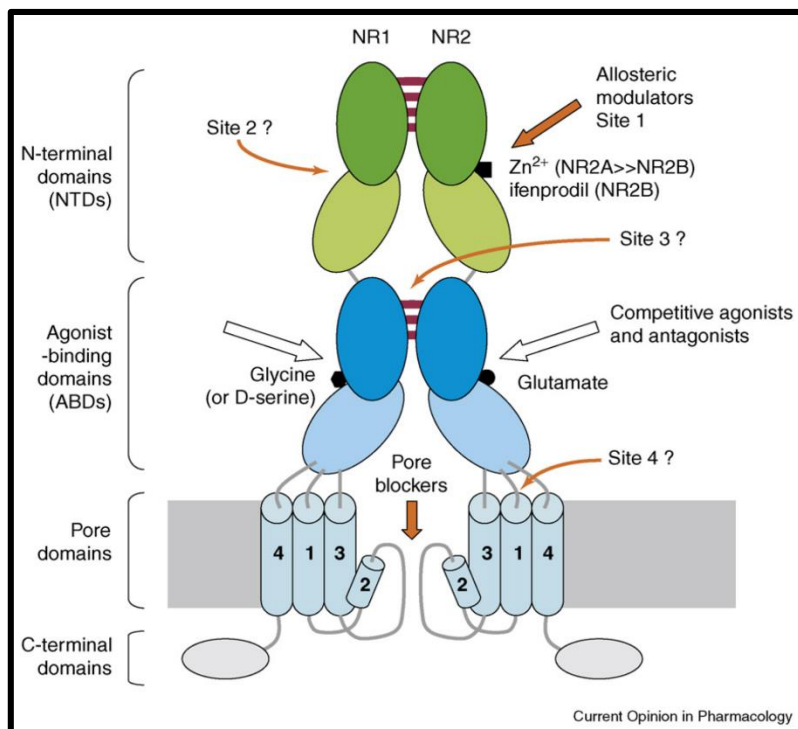


Figura 19. Estructura receptors NMDA. Llocs potencials d'unió als receptors NMDA. La gran majoria de NMDAR estan formats per tetramers, amb l'associació de dos subunitats NR1 i dos NR2 en un "dímer de dimers" formant una arquitectura quaternària. En la figura només es mostra un dels dos heterodimers NR1/NR2. La regió extracel·lular de cada subunitat està formada pels dominis NTD: Domini N-Terminal i pel domini ABD: domini d'unió a l'agonista (agonist binding domain). En la regió extracel·lular, les subunitats dimeritzen al nivell del domini ABD i probablement també al nivell del domini NTD. El domini ABD de la subunitat NR2 es lliga al glutamat, mentre que el domini ABD de la subunitat NR1 s'uneix al co-agonista glicina (o D-serina). Les fletxes blanques indiquen els llocs d'unió als agonistes i antagonistes competitius. Les fletxes gruixudes taronja indiquen els llocs d'unió dels moduladors al·lostèrics com el zinc (NR2A i NR2B NTDs) o pels compostos com l'ifenprodil (NR2B NTDs), els quals actuen com a antagonistes no competitius. El domini de canal iònic també forma llocs d'unió per als bloquejadors del porus com el Mg²⁺ endògen, MK-801, memantina o ketamina, actuant com a antagonistes no competitius. Les fletxes taronja primes indiquen llocs moduladors, que tant poden unir-se moduladors al·lostèrics positius com negatius (Paoletti & Neyton, 2007a).

5.2.2 Receptors AMPA/Kainat

Els receptors AMPA estan formats per la combinació de quatre subunitats (GluR1-4) i només requereixen l'aplicació de glutamat per la seva activació. Són permeables majoritàriament al K⁺ i al Na⁺ i la

permeabilitat al Ca^{2+} ve donada per la composició de les subunitats que formen el receptor. Així, les subunitats GluR1, GluR3 i GluR4 mostren permeabilitat al Ca^{2+} , mentre que la subunitat GluR2 elimina a aquest permeabilitat. Fisiològicament, els AMPAR són els principals receptors glutamatèrgics ionotròpics que intervenen en la transmissió excitatòria glutamatèrgica ràpida (Lau & Tymianski, 2010). La despolarització induïda per l'activació dels AMPAR obre els canals de Ca^{2+} dependents de voltatge i successivament el Mg^{2+} que bloqueja els receptors NMDA es retirat, permeten així l'influx de Ca^{2+} a través d'aquests receptors (Arundine & Tymianski, 2003).

Cal destacar, que una de les principals funcions dels AMPAR és la regulació dels canvis dinàmics en les sinapsis, conegut com a plasticitat neuronal, la qual implica una estreta regulació del trànsit dels AMPAR dins i fora de les sinapsis. El cicle de la vida dels AMPAR des de la seva biosíntesi, transport de membrana i diana sinàptica fins la seva degradació es troba estretament controlat per tota una sèrie d'interaccions amb nombroses proteïnes intracel·lulars amb les subunitats específiques dels AMPAR, així com per modificacions post-translacionals que ocorren en el seu domini citoplasmàtic C-terminal. El tràfic regulat dels AMPAR és el principal mecanisme subjacent als canvis induïts per l'activitat neuronal en la transmissió sinàptica. Generalment, un increment en la funcionalitat d'aquests receptors a les sinapsis resulta en la formació de la LTP, mentre que l'eliminació dels AMPAR sinàptics dona lloc a una LTD (Long-term depression) (Derkach et al., 2007; Anggono & Huganir, 2012).

Els receptors Kainat (KAR) són receptors ionotròpics tetramèrics que es componen per la combinació de 5 subunitats diferents (GluK1-5; antigament GluR5-7 i KA1-2) com homòmers o heteròmers. Les propietats dels KAR són molt similars a les dels AMPAR; són canals de cations no selectius, moderadament permeables al Ca^{2+} . Alguns estudis han demostrat que poden trobar-se tant a nivell pre-sinàptic com post-sinàptic. A nivell pre-sinàptic alguns KAR (GluK2 i Gluk3) faciliten la transmissió glutamatèrgica i la plasticitat a curt termini, mentre que d'altres regulen la transmissió GABAèrgica. A nivell post-sinàptic

INTRODUCCIÓ

(GluK2, GluK4 i GluK5) són activats en condicions d'alliberament endogen de glutamat, exercint una acció excitatòria en les neurones piramidals i les interneurons GABAèrgiques, el que indica que aquest tipus de receptors poden modular la xarxa neuronal en direccions oposades on el resultat general dependrà del balanç de l'activació de les diferents subunitats de KARs. (Vincent & Mulle, 2009). Algunes de les accions dels KAR estan controlades per l'obertura de canals iònics de cations, mentre que altres venen donades per la senyalització indirecta de receptors metabotròpics, donant lloc per exemple a la regulació dels canals dependents de voltatge i canvis en l'excitabilitat neuronal. En l'HC s'expressen predominantment en les fibres musgoses on contribueixen amb petites i lentes corrents post-sinàptiques excitatòries (*EPSC: Excitatory Postsynaptic Currents*) i actuen a través de l'acció metabotròpica per regular les conductàncies de K^+ dependents de Ca^{2+}

5.2.3 Receptor metabotròpics

Estan formats per set dominis que travessen la membrana cel·lular i es troben localitzats tant a nivell pre-sinàptic com post-sinàptic. Existeixen vuit subtipus diferents (mGluR1-8) classificats en tres grups (grup I, II, III). Estan implicats en una gran varietat de funcions com l'aprenentatge i la memòria, l'ansietat i la percepció del dolor (Lau & Tymianski, 2010). Els receptors metabotròpics que formen el grup I (mGluR1, mGluR5) estan acoblats a proteïnes G que activen la fosfolipasa C, la qual té efectes sobre la producció d'inositol trifosfat i la subseqüent mobilització del Ca^{2+} (Abe et al., 1992). Aquest grup també modula els potencials post-sinàptics excitatoris a nivell d'HC via tirosina quinasa de manera proteïna G independent. El grup II (mGluR2, mGluR3) i III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) disminueixen la senyalització de l'adenilat ciclase, resultant amb una inhibició dels canals de calci dependents de voltatge (Chavis et al., 1994). A nivell pre-sinàptic modulen la neurotransmissió funcionant com autoreceptors i modulant l'influx dels canals de Ca^{2+} .

5.3 Model experimental de l'àcid Kaínic

L'àcid kaínic (monohidrat de l'àcid acètic 2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidinil, KA) va ser aïllat per primer cop en l'alga vermella, *Digenea simplex*, trobada en aigües tropicals i subtropicals (Murakami i col. 1953). El KA és un anàleg no degradable del glutamat i una potent neurotoxina que exerceix les seves propietats neuroexcitotòxiques i epileptogèniques actuant sobre els receptors glutamatèrgics KA. En rosegadors, l'administració local o sistèmica de KA desencadena un patró de convulsions repetitives durant varies hores, seguit d'un període de latència, i una posterior aparició espontània de convulsions (Victor Nadler, 1981; Ben-Ari, 1985; Ben-Ari & Cossart, 2000). Aquestes convulsions causen dany cerebral, sovint associat a la formació aberrant de noves sinapsis simultàniament amb un augment de la densitat de KAR, una activació glial, i una desregulació de la homeòstasis cel·lular amb una conseqüent pèrdua de neurones hipocampals (Blumcke et al., 2000; Cavazos et al., 2004; Zheng et al., 2011). Aquestes alteracions són semblants a les que es desenvolupen en l'epilèpsia més freqüent en humans, l'epilèpsia del lòbul temporal (TLE). D'aquesta manera, el model experimental del KA a més de reproduir la TLE, permet la comprensió de mecanismes de mort neuronal presents en malalties neurodegeneratives, com la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Parkinson o l'Esclerosi lateral amiotròfica (ELA) (Pitt et al., 2000; Meredith et al., 2009).

L'HC és la regió més susceptible a la excitotoxicitat del KA a causa dels alts nivells de KAR que s'expressen en aquesta àrea. S'ha descrit que KAR1 s'expressen majoritàriament en les neurones piramidals de la CA3, mentre que KAR2 estan també presents en la CA1, tant a nivell pre-sinàptic com post-sinàptic (Werner et al., 1991; Wisden & Seeburg, 1993; Bahn et al., 1994). La despolarització induïda per l'activació directa dels KAR per baixes concentracions de KA és probablement el primer efecte quan el KA assoleix l'HC després de l'administració sistèmica. A causa de la densa xarxa de receptors glutamatèrgics, l'activitat de les neurones de la CA3 són capaces de generar activitats sincronitzades que poden propagar-se a altres zones del sistema límbic (Figura 19) (Ben-Ari & Cossart, 2000; Vincent & Mulle, 2009). Els

INTRODUCCIÓ

receptors GluR5, que s'expressen en les interneurons GABAèrgiques de la regió CA1, i els receptors GluR6 que majoritàriament s'expressen en la CA3, també intervenen en l'acció excitatòria del KA (Ben-Ari & Cossart, 2000). Els receptors NMDA també podrien jugar un paper important en la excitotoxicitat induïda pel KA, ja que s'ha descrit que l'administració de l'antagonista d'aquests receptors abans o després de les convulsions induïdes per KA prevé la major part del dany excitotòxic observat en estructures del sistema límbic (Brandt et al., 2003). Curiosament, aquesta neuroprotecció parcial dels antagonistes dels receptors NMDA no està associada amb una inhibició de les convulsions recurrents secundàries després del tractament amb KA (Brandt et al., 2003). Aquesta dada suggereix que el dany excitotòxic i l'epileptogenesis no estan governats per les mateixes vies.

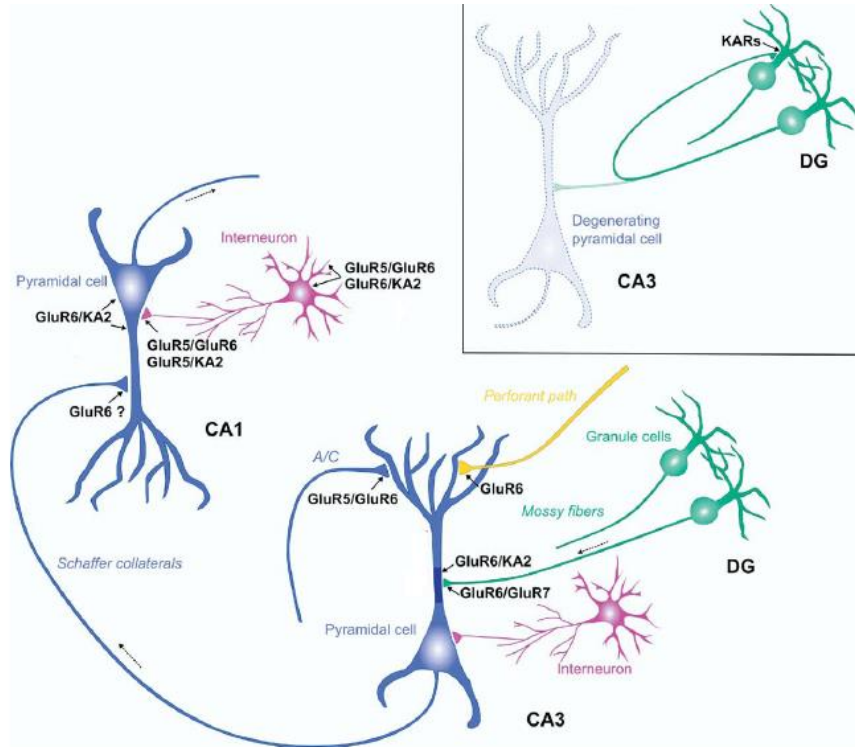


Figura 20. Circuit neuronal en l'HC que genera l'administració de KA; 1) Les cèl·lules piramidals de la CA3 són particularment sensible a l'acció del KA a causa de la seva alta concentració de KAR; 2) El KA causa una reducció en la inhibició GABAèrgica (desinhibició o col·lapse d'inhibició) en les neurones piramidals de la CA1 facilitat per una disminució en les corrents inhib tòries post-sinàptiques GABAèrgiques (*IPSC en anglès*) evocades. Aquest efecte es presumiblement mediat per l'activació dels KAR que contenen la subunitat GluR5 en els terminals GABAèrgics, conduint a una disminució de la probabilitat de l'alliberament de GABA. 3) Paral·lelament, concentracions baixes de KA incrementen la freqüència de les IPSC espontànies a través de l'activació dels KAR en interneurons i la generació de pics de descarrega en aquestes neurones. Tant la facilitació espontània dels IPSC com la inhibició dels IPSC evocats són mediat pels KAR que comprenen la subunitat GluR5. En condicions fisiològiques d'alliberament de glutamat, els KAR pre-sinàptics dels terminals de les fibres musgoses que contenen les subunitats GluR6 i GluR7 faciliten l'alliberament del NT i participen en la plasticitat a curt termini. Al panel de dalt, l'*sprouting* (formació de noves connexions), és una forma de reorganització sinàptica en el DG que ocorre en la TLE en humans i en els models d'epilèpsia en animals (Vincent & Mulle, 2009). GluR5 = GluK1; GluR6 = GluK2; GluR7 = GluK3; KA1 = GluK4; KA2 = GluK5.

L'excitació produïda després de l'activació dels receptors ionotròpics de glutamat indueix a nombrosos esdeveniments cel·lulars, incloent un increment de Ca^{2+} intracel·lular, producció de ROS, disfuncionalitat mitocondrial i mort neuronal en determinades zones del cervell,

particularment en les subregions de l'hipocamp CA1, CA3 i en l'hilus del gir dentat. Aquesta unió del KA amb els receptors provoca una activació glial i una resposta inflamatòria característiques (Figura 20) (Wang et al., 2005).

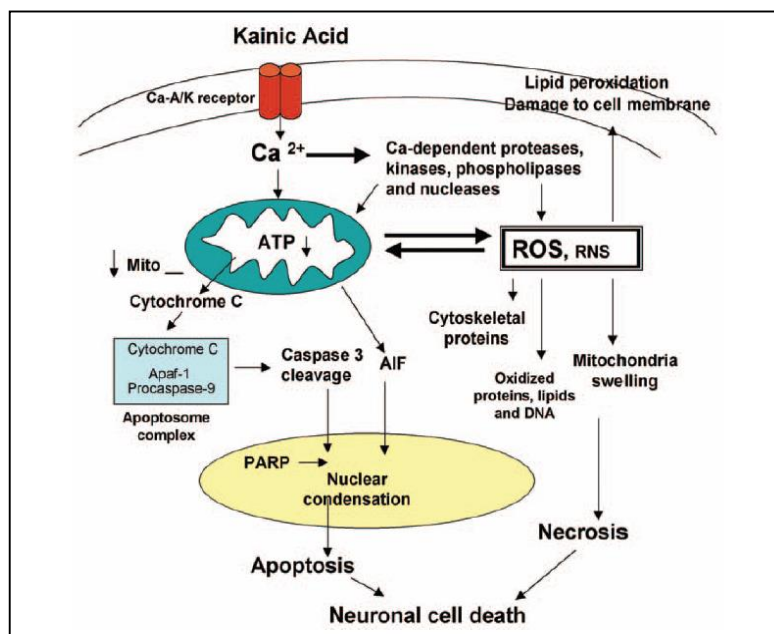


Figura 21. Esquema que representa la toxicitat induïda pel KA. 1) El KA estimula els KAR generant un increment ràpid de Ca^{2+} ; 2) s'activen els enzims dependents de Ca^{2+} i es genera ROS; 3) l'excés de Ca^{2+} i la generació de ROS produeix un col·lapse en el potencial de membrana del mitocondri i una obertura en els porus de transició de permeabilitat mitocondrial (MPT); 4) alliberament de factors mitocondrials (per exemple: citocrom c, factor induït per apoptosi (AIF)); 5) el citocrom-c s'uneix a Apaf1 (apoptosi protease-activating factor-1) i caspasa-9 per formar un complex apoptosoma i activar la via de caspasa-3; 6) Subseqüent condensació nuclear i fragmentació del DNA. Alternativament, una sobrecàrrega intensa de Ca^{2+} podria causar directament inflamació i dany del mitocondri, amb una conseqüent disminució d'ATP i més increment de ROS, resultant en una oxidació de proteïnes, lípids i del DNA, causant mort per necrosi (Wang et al., 2005).

5.4 MDMA i excitotoxicitat

En estudis previs, el nostre grup ha descrit que l'MDMA quan es afegit directament en cultius de cèl·lules PC12 produeix un increment de Ca^{2+} , el qual seria mediat per l'activació dels receptors nicotínics α_7 (Garcia-

Ratés et al., 2010). En el mateix estudi es va observar que la prèvia incubació amb el derivat amfetamínic a una concentració de 50 μ M provocava un augment sostingut (fins 24h després de l'addició de la substància) de la concentració basal d'aquest catió. A aquesta concentració i temps, l'MDMA ocasiona una activació de calpaïna, una proteasa implicada en diversos tipus de neurodegeneració, i l'activació de caspasa-3, una altra proteïna proteasa involucrada en la via apoptòtica. Altres autors també han proposat el paper del Ca²⁺ en la neurotoxicitat de l'MDMA (Azmitia et al., 1990).

El rol de l'excitotoxicitat en els efectes de l'MDMA ha estat proposat per Capela i col. (2006), en base a que l'antagonista del receptors NMDA, MK-801, prevé la mort de cèl·lules corticals exposades a altes concentracions del derivat amfetamínic (Capela et al., 2006). Recentment, s'ha publicat que l'MDMA (10mg/kg cada 2h, 2 o 4 cops) produeix un augment sostingut de glutamat extracel·lular en l'hipocamp de rata, i que seria dependent de l'activació dels receptors de serotonina 5HT_{2A/C} (Anneken & Gudelsky, 2012). A més, s'ha descrit també una disminució de neurones parvalbumina positives en el gir dentat després de l'administració d'MDMA, indicant un efecte sobre les interneurons GABAèrgiques (Anneken et al., 2013). Aquests resultats coincidarien amb l'alteració de diferents gens involucrats en la neurotransmissió GABAèrgica després de l'administració del derivat amfetamínic (Simantov, 2004).

Per altra banda, Giorgi i col. (2005) van demostrar que els ratolins tractats prèviament a dosis baixes d'MDMA eren més susceptibles a l'efecte del KA. En el mateix estudi, vuit setmanes després del tractament amb el derivat amfetamínic se'ls hi va realitzar un encefalograma (EEG) on els ratolins tractats prèviament amb aquesta substància van manifestar canvis persistents en l'activitat de l'encefalograma. Aquesta hiperexcitabilitat latent en les regions del sistema límbic va anar acompanyada d'una hiperactivitat metabòlica (Giorgi et al., 2005).

6. MDMA I MALALTIA D'ALZHEIMER

6.1 Malaltia d'Alzheimer

6.1.1 Aspectes generals:

La malaltia d'Alzheimer (AD: *Alzheimer's disease*) va ser descrita per primera vegada al 1907 per Alois Alzheimer (1864-1915), psiquiatra i anamopatòleg alemany, que va publicar l'estudi clínic i anatòmic d'una pacient de 51 anys (Augusta D.) que va morir d'un quadre de demència progressiva. Des de llavors, sabem que la AD és una malaltia degenerativa i irreversible del SNC que afecta a les àrees associatives corticals i part del sistema límbic. Es considerada com una entitat clínico-patològica associada a una pèrdua progressiva de les funcions cognitives, presentant alteracions psicològiques i del comportament, resultant finalment en demència. La pèrdua de memòria comença manifestant-se com una pèrdua de memòria episòdica, considerada una subcategoria de la memòria declarativa (veure figura 14). La disfuncionalitat de la memòria episòdica impedeix recollir esdeveniments recents incloent activitats autobiogràfiques.

6.1.2 Epidemiologia

La malaltia d'Alzheimer és la causa més comú de demència entre persones d'edat avançada. S'estima que 46.8 milions de persones a nivell mundial van estar afectades d'aquesta demència en el 2015. Aquest número casi es duplica cada 20 anys, estimant-se que arribarà a 74.7 milions al 2030 i 131.5 milions al 2050. Els costos globals de la malaltia han incrementat de 604 bilions de dòlars americans en el 2010 a 818 bilions en el 2015, és a dir un 35.4% (Prince et al., 2015 World Alzheimer Report 2015). Amb aquestes xifres per endavant no cal esmentar que ens trobem davant d'un gran repte per la societat mèdico-científica, ja que des de que Alois Alzheimer va descriure les característiques de la malaltia fins l'actualitat, moltes han estat les troballes científiques per comprendre la malaltia, però a dia d'avui encara no es disposa d'un tractament eficaç contra aquesta patologia.

6.1.3 Síntomes i signes

6.1.3.1 *Síntomes clínics*: pèrdua de memòria, apràxia (alteracions del moviment), afàsia (alteracions del llenguatge), agnòsia (incapacitat per reconèixer persones o objectes), desorientació, disfuncions sensorials i incapacitat per al raonament. S'acaba produint un deteriorament progressiu de la capacitat funcional de l'individu, així com canvis en la personalitat, paranoia, al·lucinacions, apatia, alteracions de la son i depressió (Reiman & Caselli, 1999).

6.1.3.2 *Signes patognòmics*: Les característiques anatomo-patològiques per fer un diagnòstic d'Alzheimer post-mortem són (Figura 21):

- Atròfia cortical, predominantment en el lòbul temporal, amb extensa pèrdua neuronal.
- Presència de plaques senils: dipòsits extracel·lulars formats per pèptids amiloides ($A\beta$).
- Aparició de cabdells neurofibrilars intracel·lulars formats per la proteïna Tau hiperfosforilada.

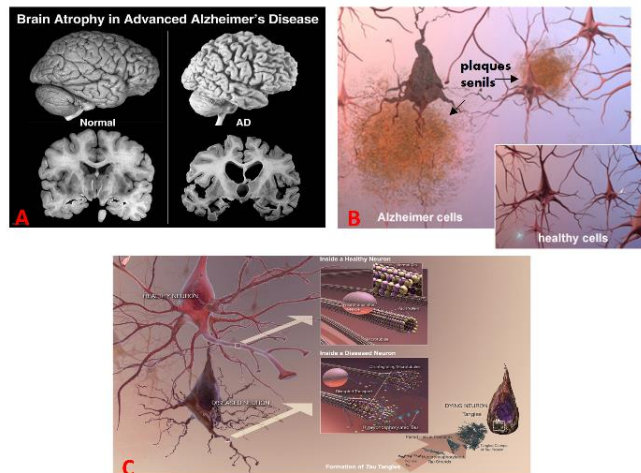


Figura 22. Principals signes patognòmics de la malaltia. Panel A: atrofia cortical a causa de la pèrdua de sinapsis; Panel B: representació de dipòsits de proteïna $A\beta$ -amiloide afectant la transmissió sinàptica; Panel C: formació dels cabdells de Tau fosforilada dificultant el transport axonal.

INTRODUCCIÓ

A més d'aquests signes patognòmics, altres alteracions estructurals i funcionals, com la inflamació i l'estrès oxidatiu, poden sobrevenir-se. Les conseqüències combinades de les plaques i la fosforilació de la proteïna tau, resulten en una disfuncionalitat sinàptica i pèrdua neuronal. En el moment de la mort, el cervell d'un pacient d'AD pot pesar una tercera part del cervell d'una persona de la mateixa edat però sense patir la malaltia.

6.1.4 Tipus d'Alzheimer

La forma familiar de la malaltia d'Alzheimer (FAD) constitueix tan sols el 10% de tots els casos de la AD, sent per tant l'Alzheimer esporàdic o d'inici tardà el majoritari. A diferència de l'Alzheimer esporàdic, en el que l'edat de manifestar-se la malaltia comença sobre els 65 anys, la forma familiar es manifesta de manera precoç, on alguns pacients comencen a desenvolupar els primers símptomes als 40 anys.

Encara que la forma familiar de l'AD és molt menys freqüent que la forma esporàdica, ambdues presenten les mateixes marques histopatològiques (plaques senils i cabdells neurofibrilars), suggerint una patogènesi comú (Gassen & Annaert, 2003). Fins a dia d'avui s'han identificat tres gens, les mutacions de les quals causen FAD: el gen de la proteïna precursora amiloide (APP), localitzat en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 i el gen de la presenilina 2 (PS2) situat en el cromosoma 1. Aquestes mutacions genètiques han estat utilitzades per generar models transgènics de ratolins a fi d'estudiar la malaltia. En referència a la forma esporàdica de la AD, a dia d'avui no es coneix una causa principal que la produeixi, però hi ha una sèrie de factors de risc que hi podrien tenir un paper important.

6.1.5 Factors de risc

L'etiologia de la AD no depèn d'un únic factor, sinó que es desenvolupa degut a una sèrie d'esdeveniments que ocorren en el cervell a través d'un llarg període de temps. Podríem dir que la malaltia d'Alzheimer és multifactorial, comprenent factors genètics, ambientals i d'estil de vida.

6.1.5.1 Gens que poden influir en la susceptibilitat a la malaltia d'Alzheimer.

El primer gen identificat susceptible per desenvolupar la AD va ser el gen de l'apoproteïna E, el qual disposa de tres al·lels que codifiquen per tres isoformes d'apoproteïna E (E2, E3 i E4). Els individus que produeixen la isoforma E4 tenen un major risc de desenvolupar la malaltia. El mecanisme pel qual la isoforma promou la AD no està del tot establert, però hi ha evidències que augmenta l'agregació del pèptid A β i en redueix l'eliminació. A més, es suggereix també que podria incrementar el risc de la AD promovent la patologia cardiovascular, incrementant l'estrès oxidatiu i empitjorant la plasticitat neuronal (Mattson, 2004).

6.1.5.2 L'envelliment

Les cèl·lules del sistema nerviós es veuen afectades per i en resposta a l'envelliment molt més que les cèl·lules d'altres òrgans, ja que les cèl·lules nervioses experimenten amb l'edat un increment en estrès oxidatiu, pertorbació de l'homeòstasi energètica, acumulació de proteïnes danyades i lesions en el seu DNA. Aquests canvis durant el procés d'envelliment normal són exacerbats en poblacions neuronals vulnerables als desordres neurodegeneratius. Per tant, que un individu desenvolupi una malaltia neurodegenerativa durant l'envelliment es determina per factors tant genètics com ambientals que poden contrarestar o facilitar el mecanisme molecular i cel·lular de l'envelliment.

Malauradament, en l'actualitat encara no es coneix el mecanisme pel qual es desenvolupa la malaltia d'Alzheimer, però hi ha un cúmul d'evidències que relacionen l'envelliment amb els desordres neurodegeneratius. Durant el procés d'envelliment es produeixen una sèrie de canvis que poden interaccionar amb els gens i l'entorn, determinant la degeneració, o no, neuronal. Aquests canvis agrupen:

- un increment oxidatiu del DNA, proteïnes i lípids, i acumulació de proteïnes modificades com addició de grups carbonils,

INTRODUCCIÓ

nitrosil, etc., a més d'una important suma de proteïnes atípiques com la proteïna A β (Mattson & Magnus, 2006);

- el glutamat i el procés d'excitotoxicitat, amb la conseqüent mort neuronal;
- un increment de proteïnes pro-apoptòtiques (per exemple caspasa-3) (Mattson & Magnus, 2006);
- alteracions en nombrosos neurotransmissors i vies de senyalització de factors neurotròfics (BDNF) (Mattson, 2004);
- perturbacions en la homeòstasis del Ca²⁺ neuronal.

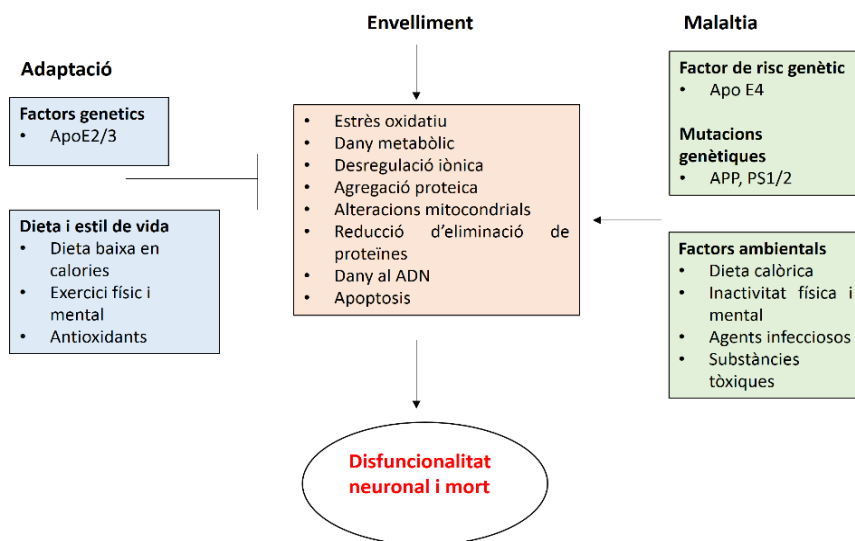


Figura 23. El sistema nerviós pot respondre de forma adaptativa a l'envelliment o sucumbir. En l'envelliment i en la AD, la mort cel·lular pot ser activada per mutacions genètiques específiques o per factors ambientals. Tot això promou l'alteració de l'activitat cel·lular, com la producció de radicals lliures, alteracions energètiques, la homeòstasis del calci i l'activació de la cascada apoptòtica. Aquests efectes juntament amb l'edat actuen coordinant l'increment de l'estrès oxidatiu, la inestabilitat del DNA, la desregulació de la homeòstasis iònica, donant lloc a una desestabilització de la integritat neuronal, i per tant produint una disfunció sinàptica i la mort cel·lular (Figura adaptada de Mattson & Magnus, 2006).

6.1.5.3 Estrès oxidatiu

Nombrosos estudis han relacionat l'estrès oxidatiu amb la malaltia d'Alzheimer (Barnham et al., 2004; Emerit et al., 2004; Mattson, 2004). De fet, existeixen evidències que l'estrès oxidatiu ocorre abans de l'aparició dels símptomes i que el dany oxidatiu no es troba només en les regions afectades del cervell, sinó també a nivell perifèric (Perry et al., 2003; Migliore et al., 2005). A més, alguns autors han descrit que l'estrès oxidatiu ocorre abans de la formació de les plaques A β , donant suport al paper de la disfuncionalitat mitocondrial i l'estrès oxidatiu en els inicis de la malaltia d'Alzheimer (Migliore et al., 2005).

D'altra banda, també s'ha proposat que una de les principals fonts de ROS en la AD està relacionada amb el pèptid A β . Per una part, durant el procés d'agregació dels pèptids A β es genera H₂O₂, procés que requereix oxigen i està potenciat pel Fe²⁺ i el Cu⁺. Quan aquests processos cel·lulars ocorren prop de la membrana cel·lular, aquesta sofreix estrès oxidatiu produint-se oxidació lipídica i com a conseqüència es generen aldehyds neurotòxics, com l'aldehyd 4-hidroxinonenal (4-HNE) o l'acroleïna, que provoquen modificacions covalents en residus proteics de cisteïna, histidina i lisina. Algunes d'aquestes proteïnes modificades per l'estrès oxidatiu inclouen transportadors de membrana (transportadors de glucosa, glutamat i bomba Na⁺/K⁺), receptors metabotrópics (proteïnes G) i canals iònics (canals dependents de voltatge de clorur, NMDA). A més a més, modificacions oxidatives pel 4-HNE i altres espècies reactives sobre la proteïna Tau, poden promoure la seva agregació i per tant induir la formació de cabdells neurofibril·lars. Addicionalment, el pèptid A β pot inclús alterar la homeòstasis del Ca²⁺ i causar estrès oxidatiu a nivell mitocondrial, danyant la cadena transportadora d'electrons, i per tant donant lloc a un augment de la producció d'ions superòxid i disminuint la producció d'ATP (Figura 24) (Varadarajan et al., 2000; Mattson, 2004).

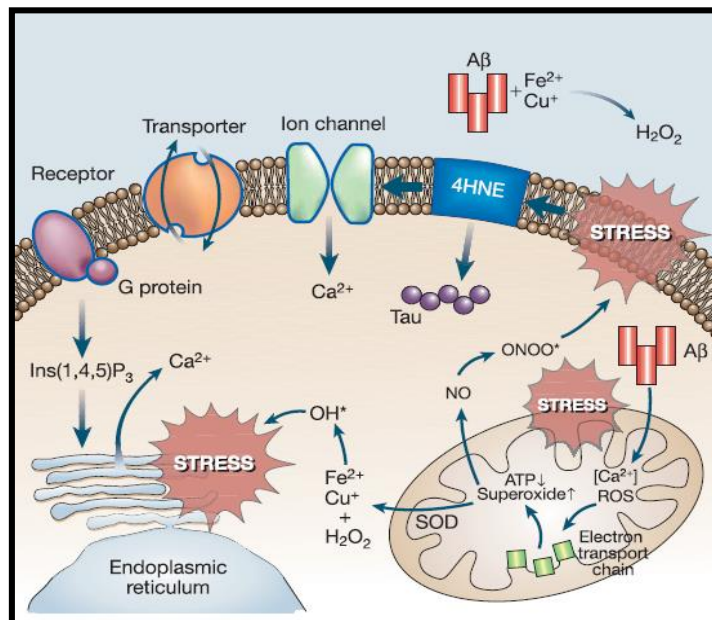


Figura 24. Representació esquemàtica de la generació de ROS i l'alteració de la homeòstasi del Ca^{2+} causat pel pèptid $\text{A}\beta$ (Mattson, 2004).

6.1.5.4 Disfuncionalitat mitocondrial

Cada cop hi ha més consens científic en que la disfuncionalitat mitocondrial i l'estrès oxidatiu van de la mà en els processos neurodegeneratius, i que probablement juguen un paper important en els estadis inicials de la patologia (Lin & Beal, 2006; Moreira et al., 2006; Federico et al., 2012).

El mitocondri és essencial per al correcte funcionament de les neurones a causa de que la capacitat glicolítica limitant d'aquestes cèl·lules les fa dependents de la fosforilació oxidativa aeròbica (OXPHOS) per les seves necessites energètiques. El cervell només representa el 2% del pes total del cos però consumeix un 20% de l'oxigen total. Aquest requeriment energètic és bàsicament degut a una demanda energètica neuronal per mantenir els gradients d'ions a través de la membrana plasmàtica, procés crític per la generació dels potencials d'acció. Aquest requeriment intens d'energia es continu, per tant, períodes breus de privació de glucosa o oxigen poden ocasionar mort neuronal (Moreira et al., 2010).

Swerdlow i col. (2004) van proposar la hipòtesi de la cascada mitocondrial per explicar la forma esporàdica de la AD de començament tardà. Breument, aquesta hipòtesi afirma que la disfuncionalitat mitocondrial és el primer esdeveniment que causa la deposició de les plaques A β , la degeneració sinàptica i la formació dels cabdells neurofibril·lars (Swerdlow & Khan, 2004, 2009).

6.1.5.5 Gènere:

Encara que la severitat d'aquesta demència és semblant en els dos sexes, estudis epidemiològics han suggerit que la disminució en els nivells d'estrògens seguits de la menopausa podria incrementar el risc de patir malalties neurodegeneratives en el sexe femení (Maccioni et al., 2001).

6.1.5.6 Dieta

Diversos estudis han demostrat que la restricció calòrica retarda els efectes del envelliment. En concret, s'ha observat un menor dèficit cognitiu i de les funcions motores, a més d'una disminució del dany en el DNA i l'estrès oxidatiu (Mattson & Magnus, 2006). D'altra banda, s'ha descrit que una dieta rica en grasses saturades podria afavorir el desenvolupament de la malaltia (Mattson, 2004).

6.1.5.7 Danys vasculars

Creixent evidència vincula les malalties vasculars, com la hipertensió arterial, la diabetis mellitus, l'aterosclerosi vascular, entre d'altres, amb el risc de desenvolupar AD (Schmidt et al., 2000).

6.1.5.8 Traumes cerebrals

S'ha descrit la relació entre antecedents de dany cerebral i el futur risc de desenvolupar la malaltia, especialment quan implica pèrdua de consciència o quan es produeix varies vegades (Katzman y Kawas, 1994).

La comprensió de les vies moleculars per les quals les diferents alteracions patològiques comprometen la funcionalitat i la integritat neuronal portant als símptomes clínics és el principal objectiu dels estudis duts a terme durant dècades d'investigació. L'èxit en el desenvolupament de models de ratolins que imitin algunes de les facetes d'aquesta malaltia ha facilitat enormement aquest esforç.

6.2 Model experimental APP^{swe}/PS1^{dE9}

S'han desenvolupat un gran nombre de models animals per estudiar l'etiologia, l'evolució i noves teràpies alternatives per combatre la malaltia. S'han creat diversos models de ratolins transgènics amb mutacions relacionades amb l'AD. La gran majoria estan basats en la hipòtesi de la cascada amiloide, on els ratolins presenten un increment en el depòsit de plaques A β , amb mutacions en els gens de la proteïna APP o de les secretases. Els models de ratolins doble transgènics com el **APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1)** han demostrat tenir un desenvolupament accelerat de la patologia en comparació amb els transgènics d'una única mutació, facilitant d'aquesta manera els estudis que d'una altra manera s'haurien de realitzar en animals més envellits i fràgils (Hock & Lamb, 2001), a més de reduir considerablement el cost dels experiments.

Jankowsky i col. (2001) van desenvolupar uns ratolins transgènics que albergaven la mutació APP^{swe} i la mutació PS1^{dE9}. Aquests ratolins van ser desenvolupats per la co-injecció dins del pronucli de dos construccions transgèniques [ratolí/humana (Mo/Hu) APP695 quimèric albergant la mutació sueca (Swedish K594M/N595L) i la supressió de l'exó 9 de la proteïna PS1] amb un únic lloc d'inserció genòmica resultant en dos transgens que es transmet com un únic locus mendelià (Jankowsky et al., 2001).

Aquests ratolins s'han consolidat com un bon model per estudiar la patologia amiloide de la malaltia, gràcies a que la doble mutació accelera el procés fent aparèixer les primeres plaques en edat primerenques. Al voltant dels 4 mesos el número de plaques observables és molt reduït, mentre que als 6 mesos són fàcilment detectables, per tant el número i la grandària de les plaques incrementa amb l'edat. El patró de deposició

comença en el còrtex i hipocamp i s'estén a altres àrees progressivament així com els animals envelleixen (Garcia-Alloza et al., 2006). A més, aquests animals mostren un increment amb l'edat dels nivells d'A β , on la relació A β 42/A β 40 es favorable a l'A β 42 (Jankowsky et al., 2004; Garcia-Alloza et al., 2006). La toxicitat A β que es desenvolupa per l'envelliment dels ratolins APP/PS1 va acompanyada d'una intensa gliosis, la presència de botons sinàptics excitatoris distròfics i neuritis tau-positiva. Els canvis patològics produïts en aquests ratolins mostren grans similituds amb la AD, com la neuropatologia severa dependent de l'edat associada a una atrofia cerebral i una disminució del metabolisme de la glucosa (Bilkei-Gorzo, 2014).

6.2.1 Processament de l'APP i generació de plaques β -amiloides.

Els pèptids d'A β són formats per la proteòlisis de l'APP per l'escissió seqüencial d'aquesta proteïna per diferents complexos d'enzim anomenats α -, β - i γ -secretases. En el complex α -secretasa s'han estat identificades tres enzims, tots ells pertanyents a la família *ADAM*, una família de desintegrines i metaloproteases (*Adamalysin family*); ADAM9, ADAM10 i ADAM17 (Allinson et al., 2003). L'enzim β -secretasa, és un tipus d'enzim de proteïna integral I, que pertany a la família de pepsines d'aspartat proteases (*BACE1: beta-site cleavage enzym*), el qual produeix l'escissió en el lloc β de la proteïna APP (Vassar et al., 1999). El complex γ -secretasa es troba compost per quatre proteïnes: Presenilina 1 o 2 (PS1 i PS2), Nicastrina, Aph-1 (*anterior pharynx defective*) i Pen2 (*presenilin enhacer 2*). El lloc actiu de la γ -secretasa requereix activitat aspartil proteasa que es troba en la presenilina, mentre que Nicastrina, Pen-2 i Aph1 participen en la modulació de l'activitat de la γ -secretasa, dependent de la via proteolítica on actú o en resposta a estímuls fisiològics (Maccioni et al., 2001; Selkoe, 2001; Morishima-Kawashima & Ihara, 2002; Gassen & Annaert, 2003; Mattson, 2004; Perez et al., 2005)

L'escissió i el processament de l'APP pot ser dividit en via no-amiloidoigènica i via amiloidoigènica:

INTRODUCCIÓ

Via no-amiloidoigènica

En aquesta via és l' α -secretasa l'encarregada de l'escissió de la proteïna APP en la posició 83 de la part C-terminal, produint un gran ectodomini N-terminal (APPs α) el qual es secreta al medi extracel·lular. El fragment resultant del C-terminal (CTF 83: C-terminal fragment) és retingut en la membrana i subseqüentment és escindit per la γ -secretasa generant un fragment curt denominat p3. Cal destacar, que l'escissió per l' α -secretasa ocorre en la regió A β , excloent per tant la formació del pèptid A β (Figura 24) (Haass et al., 1993).

Via amiloidoigènica

La via amiloidoigènica és una via d'escissió de l'APP alternativa la qual condueix a la formació del pèptid d'A β . La proteòlisis inicial és deguda a l'acció de la β -secretasa a la posició de l'aminoàcid 99 del C-terminal. Aquesta ruptura resulta en l'alliberament a l'espai extracel·lular del fragment APPs β , i deixa el termini CTF ancorat a la membrana (C99), amb la generació novament del terminal N corresponent al primer aminoàcid del pèptid A β . Posteriorment aquest fragment es escindit per la γ -secretasa entre els residus 38-43, alliberant un pèptid A β . La gran majoria de pèptids que es formen són de 40 residus de longitud (A β ₄₀), mentre que una proporció més petita (aproximadament un 10%) està formada per 42 residus (A β ₄₂). La variant A β ₄₂ és més hidrofòbica i més propensa a la formació fibril·lar que l'A β ₄₀, i és aquesta variant més llarga també la isoforma predominant en les plaques senils (Jarrett et al., 1993; Maccioni et al., 2001; Selkoe, 2001).

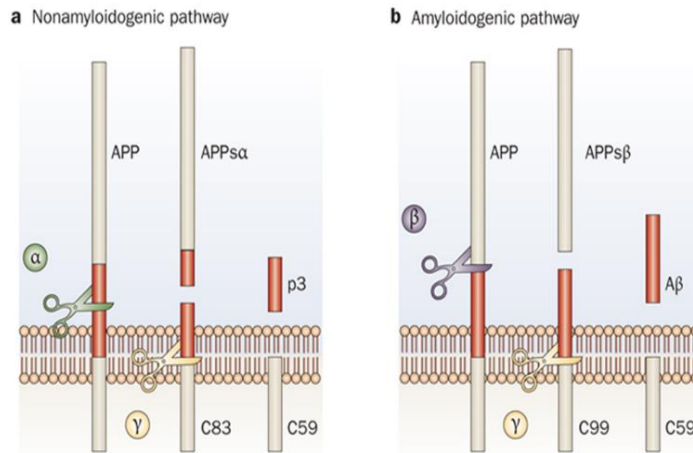


Figura 25. Processament de la proteïna APP per les secretases. a) Via no amiloidogènica, l'APP primerament és escindit per α -secretasa per la seqüència A β , el qual allibera l'ectodomini APPs α . El posterior processament per la γ -secretasa del terminal carboxil resultant dona lloc a l'alliberament del fragment P3. b) La via amiloidogènica s'inicia quan la β -secretasa escindeix la proteïna APP per la fracció amino terminal del pèptid A β i allibera l'ectodomini APPs β . El posterior processament per la γ -secretasa de terminal carboxil restant resulta amb la formació del pèptid A β (adaptat de de Strooper et al., 2010).

6.3 Efectes de l'MDMA en la malaltia d'Alzheimer

En l'actualitat no es disposa de cap estudi on els efectes de l'MDMA hagin estat testats directament en un model de la malaltia d'Alzheimer. Malgrat això, molts autors postulen que l'ús i abús d'aquest derivat amfetamínic podria ser un factor de risc per desenvolupar la malaltia a causa dels seus efectes a llarg termini, com la disminució de la concentració de 5-HT o del seu transportador o problemes de memòria, com alguns consumidors descriuen. Sí que es cert que l'MDMA es capaç de produir tota una sèrie d'alteracions en processos forçament relacionats amb la supervivència i l'estabilitat de la cèl·lula, com desequilibris en l'homeòstasi del calci, producció d'estrès oxidatiu, alteracions mitocondrials, tots ells descrits com a factors de risc per desenvolupar la malaltia d'Alzheimer.

En base a totes aquestes dades prèvies, en la present tesi doctoral ens vam plantejar els següents objectius

OBJECTIUS

The present thesis has been structured in three main chapters

1. Study of the effects of MDMA on plasticity and memory

In rats:

- To determine the effects of a chronic treatment of MDMA on spatial learning and memory.
- To investigate the impact of the consumption of MDMA on CA1 hippocampal pyramidal neurons.

In mouse:

- To evaluate the effects of an intermittent and prolonged treatment of MDMA on plasticity markers of the mice hippocampus.

2. Study of the effects of MDMA on an excitotoxicity model

- To determine whether a recreational treatment of the amphetamine derivative might favor an epileptic status
- To assess whether previous MDMA exposition might enhance the neurotoxicity of kainic acid, a model of excitotoxicity.

3. To investigate the effects of MDMA on the nigrostriatal pathway in a model of Alzheimer's Disease.

- To study whether an abusive consumption during adolescence may trigger or favor alterations in the nigrostriatal pathway in a model of Familial Alzheimer's Disease.
- To evaluate whether a prolonged exposition of MDMA during adolescence might potentiate or accelerate the appearance of A β plaques in the adulthood in this model of Alzheimer's Disease.

RESULTATS

3.1 Publicació 1

MDMA enhances hippocampal-dependent learning and memory under restrictive conditions, and modifies hippocampal spine density

Sònia Abad, Alberto Fole, Nuria del Olmo, David Pubill, Mercè Pallàs, Fèlix Junyent, Jorge Camarasa, Antonio Camins, Elena Escubedo (2014). *Psychopharmacology* 231:863-874

L'MDMA és una de les substàncies psicoactives més consumides pels joves adolescents. Està ben establert que el cervell és un òrgan dinàmic, i que l'adolescència es un període de remodelació on es produeixen els canvis necessaris per assolir la maduresa. D'altra banda, diversos estudis han descrit que les substàncies d'abús produeixen plasticitat estructural en algunes àrees del cervell.

L'objectiu de l'estudi va ser investigar l'efecte de l'exposició crònica de l'MDMA sobre les neurones piramidals de la CA1 de l'hipocamp de rata, i com aquesta exposició afectava la memòria i l'aprenentatge dependent de l'hipocamp.

Els animals van ser tractats amb un règim que imita l'exposició crònica a la substància. Una setmana després de l'última administració, els animals van ser sotmesos a diferents test de comportament per tal d'avaluar l'efecte d'aquest tractament en memòria i aprenentatge. A més a més, es van realitzar els test del camp obert, per valorar nivells d'ansietat i el test de la natació forçada, per determinar si el règim utilitzat podia provocar un comportament depressiu en els animals que interferís en els test posteriors.

Els animals exposat a l'MDMA no van mostrar un comportament que diferís del grup control en el test de la natació forçada. Quan els animals van ser sotmesos tant al test de reconeixement d'objectes com al test del laberint d'aigua, per tal d'avaluar aprenentatge i memòria, no es van observar diferències significatives entre grups. En canvi, quan els animals van realitzar un test del laberint d'aigua més restrictiu, el grup tractat prèviament amb el derivat amfetamínic va mostrar millors resultats, tan en el test de memòria com en la fase d'aprenentatge. A més, cal destacar que el grup exposat a l'MDMA va restar més temps

RESULTATS

en el centre en la prova del camp obert, mostrant un comportament ansiolític.

L'avaluació del factor neurotròfic BDNF va revelar un increment en tots els grups tractats amb MDMA. No obstant, les rates tractades amb el derivat amfetamínic van mostrar una disminució en la densitat d'espines dendrítiques en comparació amb el grup control, la qual va ser revertida per l'entrenament, mostrant així un increment en la densitat d'espines en els grups que havien realitzat el test del laberint d'aigua.

En *conclusió*, l'exposició a aquest tipus de tractament amb MDMA produeix una disminució en l'ansietat i una millora l'aprenentatge i la memòria dependent de l'hipocamp sota condicions restrictives, a més de produir un increment en els nivells de BDNF. Aquesta millora en l'aprenentatge és correlaciona amb un increment en la densitat d'espines dendrítiques.

MDMA enhances hippocampal-dependent learning and memory under restrictive conditions, and modifies hippocampal spine density

Sònia Abad · Alberto Fole · Nuria del Olmo ·
David Pubill · Mercè Pallàs · Fèlix Junyent ·
Jorge Camarasa · Antonio Camins · Elena Escubedo

Received: 18 June 2013 / Accepted: 23 September 2013 / Published online: 26 October 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract

Objectives Addictive drugs produce forms of structural plasticity in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. The aim of this study was to investigate the impact of chronic MDMA exposure on pyramidal neurons in the CA1 region of hippocampus and drug-related spatial learning and memory changes.

Methods and results Adolescent rats were exposed to saline or MDMA in a regime that mimicked chronic administration. One week later, when acquisition or reference memory was evaluated in a standard Morris water maze (MWM), no differences were obtained between groups. However, MDMA-exposed animals performed better when the MWM was implemented under more difficult conditions. Animals of MDMA group were less anxious and were more prepared to take risks, as in the open field test they ventured more frequently into the central area. We have demonstrated that MDMA caused an increase in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression. When spine density was evaluated, MDMA-treated rats presented a reduced density when compared with saline, but overall, training increased the total number of spines, concluding that in MDMA-group, training prevented a reduction in spine density or induced its recovery.

Conclusions This study provides support for the conclusion that binge administration of MDMA, known to be associated to neurotoxic damage of hippocampal serotonergic terminals, increases BDNF expression and stimulates synaptic plasticity when associated with training. In these conditions, adolescent rats perform better in a more difficult water maze task under restricted conditions of learning and memory. The effect on this task could be modulated by other behavioural changes provoked by MDMA.

Keywords Adolescent rats · Brain-derived neurotrophic factor · Hippocampus · Learning · MDMA · Spines

Introduction

MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine, or ecstasy) is a synthetic drug belonging to the amphetamine family and has both stimulant and hallucinogenic properties. Recently, Mithoefer et al. (2011, 2013) concluded that MDMA could represent as an aid to psychotherapy in the treatment of post-traumatic stress disorder, especially in patients who are resistant to other forms of treatment. It is an unusual situation indicating that MDMA, besides its rewarding properties, it may also represent a therapeutic tool. Nevertheless, amphetamine compounds are not uncommonly used for enhanced productivity and for study purposes. In fact, prescription stimulants are currently used by college students, many of whom obtain them for use as recreational drugs and study aids. Amphetamines abuse is often characterised by a repeated pattern of frequent drug administration (binge) followed by a period of abstinence.

Chronic exposure of rats to MDMA has been associated with degradation of serotonin projections to the hippocampus

S. Abad · D. Pubill · M. Pallàs · F. Junyent · J. Camarasa ·
A. Camins · E. Escubedo (✉)
Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry
(Pharmacology Section) and Institute of Biomedicine (IBUB),
University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, Barcelona 08028,
Spain
e-mail: eescubedo@ub.edu

A. Fole · N. del Olmo
Department of Pharmaceutical Sciences and Nutrition, School of
Pharmacy, University of CEU San Pablo, Madrid, Spain

and cortex (Pubill et al. 2003). The behavioural consequences of MDMA exposure have also been studied extensively. A number of research efforts have been focused on demonstrating the undesirable cognitive effects induced by MDMA (Able et al. 2006; Arias-Cavieres et al. 2010; Skelton et al. 2008; Sprague et al. 2003). Evidence to date has shown that developmental exposure to this substance results in adverse effects on the rat's developing brain and learning and memory impairments in adults (Broening et al. 2001). However, the relationship between these behavioural changes and possible drug-induced serotonergic damage is not yet clear. Roodsiri et al. (2011) provided evidence of long-term disruption of novel object discrimination following "binge-type" repeated MDMA administration, but they demonstrated that this impairment of recognition and working memory was not directly related to any neurotoxic loss of serotonin neurons.

However, some authors have described other effects of MDMA in the Morris water maze (MWM) test, which seem to depend on animal strain, sex, age, nutrition, stress, apparatus, training procedure (D'Hooge and De Deyn 2001) and also on drug treatment and MDMA abstinence period (Thompson et al. 2009; Skelton et al. 2012; Vorhees et al. 2009, 2011). Furthermore, contradictory results were obtained for MDMA effects on long-term potentiation (LTP), an indicator of synaptic plasticity linked to learning and memory (Arias-Cavieres et al. 2010; Morini et al. 2011).

Neuroanatomical and neurophysiological studies have provided direct support for the notion that the molecular and cellular mechanisms underlying the long-lasting behavioural plasticity associated with psychostimulant action may be similar to those implicated in learning and memory (Beninger and Gerdjikov 2004; Everitt and Robbins 2005; Preissmann et al. 2012). It has been suggested that part of the addictive potential of psychostimulant drugs of abuse may result from their ability to enhance memory for drug-related experiences through actions on memory consolidation (Leri et al. 2013; Simon and Setlow 2006; Wiig et al. 2009). This controversy leads us to consider that the effects of MDMA in cognitive processes are complex and both neurotoxicity and addiction-associate plasticity can contribute to them.

Dendritic spines, thought to serve as basic units of memory storage, are highly mobile and can undergo remodelling. Spine remodelling and the formation of new synapses provide a basis for memory formation (Kirov and Harris 1999). Some studies have reported correlations between the morphological and functional parameters of spines (Arellano et al. 2007). Over the past few years, several groups have reported that repeated exposure to a drug of abuse causes structural plasticity and changes in specific neuronal cell types that reflect a reorganisation of synaptic connectivity patterns, but the functional consequences of these changes are unknown (Fole et al. 2011; Robinson and Kolb 1997, 1999;). Importantly, these changes have been shown to persist for at least 1 month after

the last drug exposure and are hypothesised to represent the neural substrate for the near-permanent sensitisation in drug responsiveness seen in certain animal models of addiction. For MDMA, Ball et al. (2009) reported that a sensitising regimen induces increased spine density in limbic-cortico-striatal circuitry. Although the functional significance of such plasticity remains a subject of controversy, their integration within the existing hippocampal circuits might participate in certain forms of learning and memory (Leuner et al. 2003).

The aim of the present study was to determine whether treatment with MDMA, simulating a chronic schedule, could modulate hippocampal learning and memory in adolescent Sprague–Dawley rats in the MWM. Because the complexity of the task could have modulated any behavioural change provoked by the drug, we designed a more difficult MWM task. In addition, it was also considered of interest to determine whether the hippocampus of these animals presented structural and marker changes and if training in the MWM could modify the effect of MDMA on this structural plasticity. Recently (Hemmerle et al. 2012), it has been determined that in adult rats, MDMA increases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor *trkB* in the hippocampal CA1 region few hours after administration. We have analysed its expression in the hippocampus because it has been reported that under some conditions, application of BDNF is sufficient to induce protein synthesis-dependent spine enlargement (Tanaka et al. 2008).

An acute administration of 10–15 mg/kg of MDMA to rats creates similar plasma concentrations to those of a human who consumes a 150-mg tablet (Green et al. 2003). However, as we wanted to simulate chronic human abuse, it was necessary to maintain MDMA plasma levels for a significant period of time. This can be achieved by using an administration schedule such as that used in this study (Battaglia et al. 1988; Pubill et al. 2003).

In addition to the MWM, other behavioural tests were used to provide additional data and facilitate interpretation of the results. Forced swimming test (FST) is a common test for depression-related behaviour in animals, and the novel object recognition task (ORT) has become a benchmark task for assessing recognition memory, which seems to play an important role in the hippocampus (Broadbent et al. 2009). In the open field, rat permanence in the periphery is associated with anxiety-like behaviour, while time spent in the centre puts the animal at risk, thus is an indirect measure of risk-taking or impulsive behaviour (Colorado et al. 2006).

Materials and methods

Treatment groups

Experimental protocols for the use of animals in this study were approved by the Animal Ethics Committee of the University

of Barcelona under the supervision of the Autonomous Government of Catalonia, following the guidelines of the European Communities Council (86/609/EEC). Five-week-old male Sprague–Dawley rats (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) were used.

The animals received saline or a neurotoxic dosage regimen of MDMA that is thought to be equivalent to a chronic administration (Battaglia et al. 1988; Pubill et al. 2003) of 20 mg/kg (s.c.) bid for 4 days. Increased acute hyperthermic response and neurotoxicity occurs when MDMA is administered in a hot room environment compared to normal room temperature conditions (Sanchez et al. 2004). Consequently, animals were housed one per cage and allowed to acclimatise for 1 h to an environmental temperature of 26 ± 1 °C before receiving the first dose of MDMA and were kept under these conditions for 2 h after the final dose. Body temperature was measured using a lubricated and flexible rectal probe inserted at 2.5 cm into the rectum and attached to a digital thermometer (0331 PANLAB, SL, Barcelona, Spain) 1 h after the first daily injection of MDMA. Experiments are listed in Table 1. For each treatment group, a number of 8–12 animals were used.

Morris water maze

Standard method

Non-spatial (cued) and spatial learning and reference memory were assessed in a MWM 1 week after the end of treatment following the method described by Camarasa et al. (2008) (Table 1). Spatial learning sessions (acquisition) were conducted on four consecutive days (days 1–4), performing six trials per day with an acquisition–retrieval interval (ARI) of 10–12 min. During this interval, animals remained in their cages. In each trial, time taken to reach the hidden platform (escape latency) and the pathway length were recorded (Smart 3, Panlab SL, Barcelona, Spain). This procedure was repeated with each rat starting in each of the four quadrants. The average escape latency to find hidden platform of all trials in a day was calculated for each animal. The mean of all animals was obtained for every day.

The rats were subjected to a single-test session (probe test) on the fifth day (free swimming without platform) to assess their memory of the platform location for 1 min. The total time spent swimming in the target quadrant (where the platform should have been located) and the opposite quadrant was measured.

Spatial reversal

At the end of the probe test and to evaluate whether rats could reverse their spatial learning, the platform was reinserted into the pool in the quadrant opposite to its original position and the rats were guided to the platform with a flag in the first trial,

and left there for 30 s. Immediately after this trial, the time to find the platform without a flag in a second and a third trial was measured (reversal test lasting a maximum of 60 s). An ARI of 10 min was used.

Restrictive method

In a second treatment (Table 1), 1 week after the end of the first treatment, animals were submitted to the spatial learning test under more difficult conditions to hinder this learning. It is known that the latency in the retrieval trails of the water maze increases with the acquisition–retrieval interval (Brandeis et al. 1989). Therefore, a new experiment in the MWM was conducted using 3 days of acquisition with an ARI of 45–50 min. To counterbalance, eight trials were performed every day. Another similar treatment was performed 1 month after the end of MDMA exposure.

Novel object recognition task

One week after finishing treatment, the animal's performance was tested using ORT, following the method described by Camarasa et al. (2008) (Table 1). The test consists of a familiarisation session (two consecutive days) in which rats explored the arena during 10 min. Rats were trained (day 3, 10 min) with two identical objects, (two objects "A"). Novel object recognition was tested 1 h after the training session, when rats were exposed to the familiar object A and a novel object B for 3 min. The cumulative time spent by the rats at each of the objects was measured in seconds. The data are presented as percentage of time exploring novel and familiar object.

Open field behaviour

One week after the end of the animals' exposure to saline or MDMA, rats were monitored (Smart 3, Panlab SL, Barcelona, Spain) for 10 min during the first familiarisation trial described previously. The floor of the circular arena was divided virtually into two zones, centre of 70 cm and periphery of 100 cm in diameter, respectively. The time spent in these two defined zones was recorded. Results are expressed as the fraction of total exploratory time spent in the central or peripheral zone.

Forced swimming test

FST was performed in another group of animals 1 week after finishing the treatment (Table 1). Rats were individually forced to swim inside a Plexiglass cylinder (height 40 cm, diameter 18 cm and contained 22 cm of water, at 25 °C). After a pre-exposure to forced swimming for 15 min the day before

Table 1 Treatments carried out in order to perform behavioural tests and quantification of dendritic spines, BDNF and PSD-95. *MWM* Morris water maze, *FST* forced swimming test, *ORT* object recognition task. Tests were performed 1 week or 1 month after the end of treatment. #Other tests were performed after finishing the parallel behavioural test

Treatment	Group	Behavioural test	Other test [#]	Starting time of behavioural test
1	Saline	Standard MWM	Reversal MWM	1 week
	MDMA	Standard MWM	Reversal MWM	1 week
2	Saline	–	Spine density	1 week
	MDMA	–	Spine density	1 week
	Saline	Restrictive MWM	Spine density	1 week
	MDMA	Restrictive MWM	Spine density	1 week
3	Saline	–	BDNF, PSD-95	1 week
	MDMA	–	BDNF, PSD-95	1 week
	Saline	Restrictive MWM	BDNF, PSD-95	1 week
	MDMA	Restrictive MWM	BDNF, PSD-95	1 week
4	Saline	Restrictive MWM	–	1 month
	MDMA	Restrictive MWM	–	1 month
5	Saline	FST	–	1 week
	MDMA	FST	–	1 week
6	Saline	Open field	ORT	1 week
	MDMA	Open field	ORT	1 week

(Slattery and Cryan 2012), animals were again placed in the cylinder 24 h later and the total duration of immobility was measured during a 5-min test. The test is considered an index of despair in response to stress and this behavioural despair is not only sensitive to antidepressant treatments but also to stimulants like amphetamine and caffeine (Porsolt et al. 1978). Results are expressed as seconds of immobility.

Hippocampal spine density analysis

Twenty-four hours after the restrictive MWM (Table 1), rats were deeply anaesthetised by injection (i.p.) of pentobarbital (80 mg/kg) and perfused with 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). The hippocampi were removed. Golgi staining was performed as described by Fole et al. (2011). Finally, the sections were immersed in pure glycerol and mounted on glass slides with glass covers. Five Golgi-impregnated pyramidal neurons per animal, discernible from nearby impregnated cells, were selected. These neurons were located within the CA1 region of the hippocampal formation. Measurement was done at least 50 μm from the soma along consecutive 10 μm fragments on secondary branches starting 10 μm after branching from the primary dendrite. The neurons were located using lower (5–20) magnification lenses on an Eclipse 50i-Nikon equipped with a camera (DS-5 M). Spine density and type were evaluated using $\times 100$ magnification lens and $\times 300$ zoom using NIS-Elements software. Spine density was calculated by dividing the number of spines per segment by the length of the segment and was expressed as the number of spines per 10 μm of dendrite. Spine density was evaluated in some of the animals from each group.

Tissue sample preparation

Expression of BDNF and PSD-95 was determined in the four groups of animals (saline-treated trained or not, MDMA-treated, trained with restrictive MWM or not, see Table 1). Twenty-four hours after the last training day, the animals were decapitated. The hippocampus was quickly dissected out, frozen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. When required, tissue samples were thawed and homogenated at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 20 volumes of buffer (5 mM of Tris-HCl, 320 mM of sucrose, $4.5\text{ }\mu\text{g }\mu\text{l}^{-1}$ of aprotinin, 0.1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 mM of sodium orthovanadate) at pH 7.4, in a Polytron homogenizer. The homogenates were centrifuged at $500\times g$ for 5 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant was centrifuged again at $15,000\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pellets were resuspended and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

Quantification of BDNF and PSD-95 by western blot

A general western blotting and immunodetection protocol was used to determine BDNF levels as described (Garcia-Ratés et al. 2010). Primary rabbit polyclonal antibody against BDNF (Santa Cruz Biotechnology Inc., Europe), PSD-95 (Abcam, Cambridge, England) and peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody were used. Immunodetection of β -actin (mouse monoclonal antibody, Sigma, St. Louis, USA; dilution of 1:2, 500) served as a control of load uniformity for each lane and was used to normalise differences in BDNF and PSD-95 expressions due to protein content. The statistical analysis was performed.

Data analysis

Results are given as the mean±SEM. One-way ANOVA, followed by Tukey's test, was used to verify the significance between means. The p values less than 0.05 were considered as significant. Two-way ANOVA was used when two variables were studied jointly (software, InvivoStat). In this test, when the interaction effect was not significant, the statistic value was omitted in order to simplify reading text. Results from forced swimming test and object recognition task experiments were analysed using the independent and paired Student's t test, respectively. Linear regression was analysed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Effects of MDMA on rectal temperature and body weight

As expected, MDMA induced hyperthermia in rats (see Fig. 1a) measured 1 h after the first daily dose (two-way ANOVA, variable treatment ($F_{(1,54)}=87.32$, $p<0.001$)). This effect was maintained over all days of the treatment. Moreover, while saline-treated animals showed a significant increase in body weight during treatment days, the body weight of MDMA-treated animals fell (see Fig. 1b).

Effects of MDMA treatment on spatial and reversal learning in a standard MWM

At the end of the treatment with saline or MDMA, some animals were subjected to the MWM, starting 1 week after cessation of exposure. The swimming speed was calculated in each day and was not modified by the treatment (overall 26.24 ± 1.48 cm/s for saline-treated animals and 26.78 ± 1.49 cm/s for MDMA-treated rats); performance of this task was analysed in terms of escape latency rather than length of pathway.

Cued learning was evaluated on day 0 in the MWM, where the hidden platform was indicated by a flag. For this data analysis, trials were collapsed into three blocks of two consecutive trials. Two-way repeated measures ANOVA evidenced a significant effect of trials ($F_{(2,16)}=22.60$, $p<0.001$) but not of the treatment (51.42 ± 7.98 s saline; 46.43 ± 6.52 s MDMA).

In the acquisition phase, the average escape latency to find hidden platform of all trials in a day was calculated for each animal. The mean of all animals was obtained for every day. Two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of variable days of acquisition ($F_{(3,48)}=14.37$, $p<0.001$) and the interaction treatment×day ($F_{(3,48)}=5.31$, $p<0.01$), indicating that escape latency diminished as training

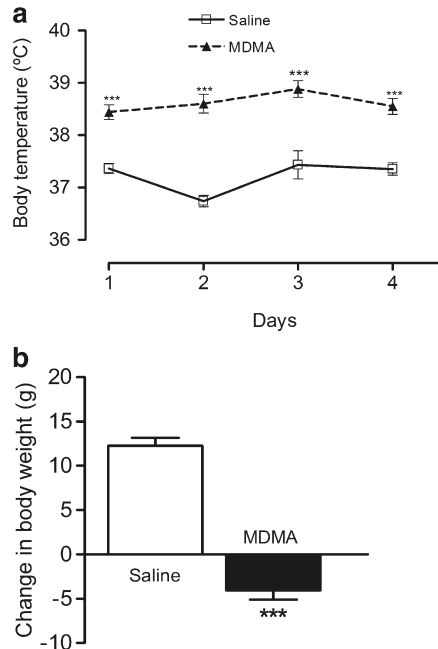


Fig. 1 **a** MDMA-induced hyperthermia. Rats were treated with saline or MDMA 20 mg/kg bid for four consecutive days. Data are expressed as mean body temperature±SEM. *** $p<0.001$ vs saline on the same day. **b** Effect of the same treatment on body weight MDMA-treated animals showed a significant decrease in body weight measured on the first and the last day of treatment. *** $p<0.001$ vs saline

proceeded (see Fig. 2a). MDMA-treated animals showed a decrease in escape latency that was significant on the second day ($p=0.01$) and on the fourth day ($p=0.05$) (Fig. 2a).

Reference memory was evaluated on day 5. The rats were subjected to a probe test for 60 s in which the platform had been removed. Two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of quadrant ($F_{(1,16)}=32.64$, $p<0.001$) but a non-significant effect of treatment ($F_{(1,16)}=0.22$, n.s.). Saline- and MDMA-treated animals exhibited quadrant preference during this test, spending 50 and 53 % of all time (respectively) in the quadrant where the platform should have been (Fig. 2b).

Reversal learning

Immediately following the probe test, rats were submitted to a reversed learning session, with the escape platform positioned in the quadrant opposite to the training one. Since there is the possibility that MDMA leads to learning modification of the MWM that only appears sporadically in initial novel training trials, we performed statistical test analyses for each trial to explore this possible effect. In these experiments, two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of trials ($F_{(2,24)}=4.92$, $p=0.01$) but a marginal effect of

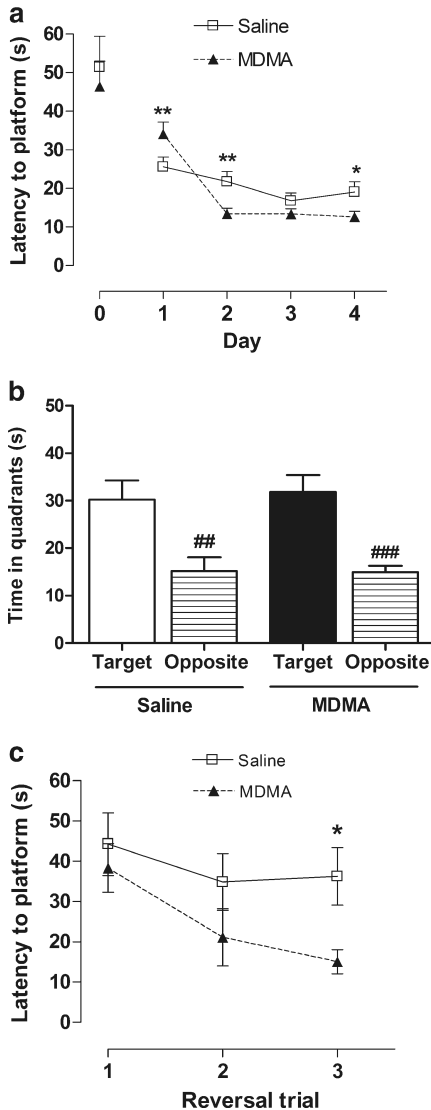


Fig. 2 **a** Evaluation of spatial learning in a standard Morris water maze (MWM) in adolescent Sprague–Dawley rats treated a week earlier with saline or MDMA. Rats were given six trials per day with an ARI of 10–12 min. Data represent the mean±SEM ($n=8$ –12 per group) of day 0 (cued learning) and days 1–4 (acquisition phase). Two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of variable treatment and variable days of acquisition. * $p<0.05$; ** $p<0.01$ vs saline on the same day. **b** Time in target and opposite quadrant of the MWM in the test performed on day 5. Data represent the mean±SEM. ### $p<0.001$ vs target in the same group. **c** Improvement in reversal learning by MDMA. Data represent the mean±SEM ($n=6$ –8 per group) of escape latency time to find the hidden platform positioned in the quadrant opposite to the training one for each trial. * $p<0.05$ vs saline

treatment ($F_{(1,12)}=3.77$, $p=0.076$). MDMA-treated rats showed lower latencies than saline-treated ones. Post hoc

analysis revealed a significant effect of MDMA in the last trial ($p=0.05$) (Fig. 2c).

Effects of MDMA on spatial learning in the restrictive MWM

One week after treatment

One week after the drug schedule, both saline- and MDMA-treated groups were divided into two groups, one of which was subjected to training in the MWM (trained groups, T) and the other remained as controls (not trained groups, NT). The spatial learning test was carried out under more restrictive conditions to hinder this learning. For data analysis of cued learning results, trials were collapsed into four blocks of two consecutive trials. Two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of treatment ($F_{(1,18)}=17.96$, $p<0.001$) and block of trials ($F_{(3,50)}=23.12$, $p<0.001$), indicating a better performance of the MDMA group in this task when the inter-trial interval was extended (60.04 ± 4.90 s saline; 26.22 ± 4.05 s MDMA).

Under these conditions, spatial learning of MDMA-treated rats during the acquisition phase improved significantly vs the saline-treated group (Fig. 3a). Two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of treatment ($F_{(1,17)}=6.86$, $p<0.05$) and training days ($F_{(2,34)}=22.24$, $p<0.001$). In both groups, latency on the third day was significantly lower than on the first day (saline $p<0.01$; MDMA $p<0.001$).

When a probe test was performed on day 4 with the escape platform removed from the pool, two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of quadrant ($F_{(1,16)}=16.83$, $p<0.001$) and treatment ($F_{(1,16)}=4.49$, $p<0.05$). The MDMA group showed better memory ($p<0.05$ vs saline), as animals in this group swam in the target quadrant for 52.5 % of total time while saline-treated rats did so for 35.6 % of the time (see Fig. 3b).

One month after treatment

Another treatment was performed and an experiment in the MWM under restrictive conditions was carried out 1 month after the end of MDMA exposure. Cued learning showed a significant effect of block of trials ($F_{(3,33)}=10.12$, $p<0.001$) but not treatment ($F_{(1,11)}=0.56$, $p=0.471$). Consequently, under restricted conditions the effect of MDMA on cued learning disappears 1 month after treatment (37.68 ± 5.87 s saline; 31.17 ± 5.89 s MDMA).

There were no differences in acquisition between the saline- and MDMA-treated groups (Fig. 4a) ($F_{(1,11)}=0.23$, n.s.). Two-way ANOVA of the probe test results for the fourth day showed no difference in the time in target quadrant between the two groups. However, when considering the relationship target quadrant vs the opposite quadrant, animals in the saline group did not prefer the target quadrant

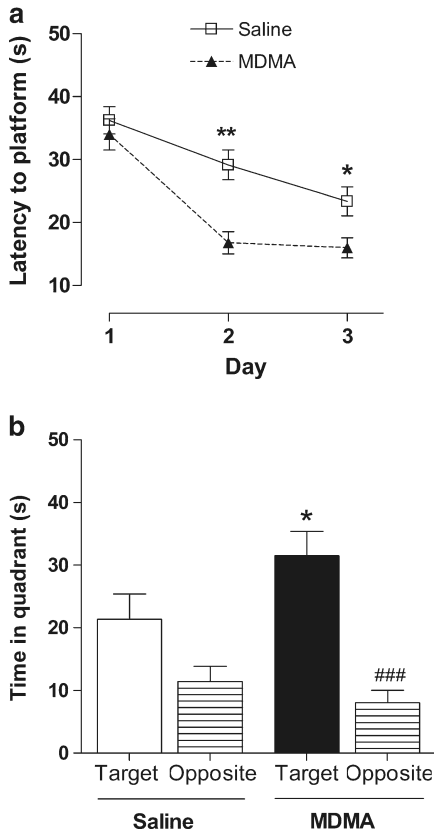


Fig. 3 **a** Assessment of spatial learning in restrictive MWM in adolescent Sprague–Dawley rats treated 1 week earlier with saline or MDMA. Rats were given eight trials per day with an ARI of 45–50 min. Data represent the mean±SEM ($n=8-12$ per group) of escape latency time to find the hidden platform (days 1–3). Two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of variable treatment and variable training days. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs saline on the same day. **b** Time in target and opposite quadrant of the MWM in the test performed on day 4. Data represent the mean±SEM. * $p<0.05$ vs target quadrant of saline group, ### $p<0.001$ vs target in the same group

over the opposite one, whereas the MDMA group did (target quadrant_{MDMA} vs opposite quadrant_{MDMA} $p<0.05$) (Fig. 4b).

Effects of MDMA on the novel object recognition task and open field

In a new treatment, animals were subjected to an object recognition task 1 week after MDMA exposure to determine its effect on recognition memory. Rats spent a similar period of time exploring the two identical objects in the first trial (familiarisation, day 3). Statistical analysis showed no significant differences in the exploration time of the identical objects (A1 and A2) during this phase in any treatment group

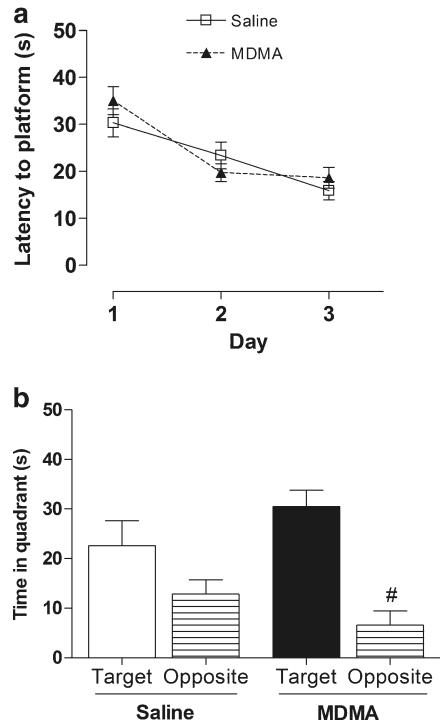


Fig. 4 **a** Assessment of spatial learning in restrictive MWM in adolescent Sprague–Dawley rats treated 1 month earlier with saline or MDMA. Rats were given eight trials per day with an ARI of 45–50 min. Data represent the mean±SEM ($n=6-7$ per group) of the acquisition phase (days 1–3). Two-way repeated measures ANOVA showed a non-significant effect of treatment. **b** Time in target and opposite quadrant of the MWM in the test performed on day 4. Data represent the mean±SEM. Two-way repeated measures ANOVA showed a non-significant effect of treatment. When considering the relationship target quadrant vs opposite quadrant, animals in the saline group did not prefer the target quadrant over the opposite but rats in the MDMA group did. # $p<0.05$ vs target in the same group

(saline, 50.58 ± 1.55 % A1 and 49.42 ± 1.54 % A2; MDMA, 49.41 ± 4.14 % A1 and 50.59 ± 4.14 % A2). When exploration time was registered in the testing trial, all rats preferentially explored the novel object. Preference index (time spent exploring novel vs familiar object) was significantly above chance for both saline ($p<0.05$) and MDMA ($p<0.01$) groups (Fig. 5a). Two-way ANOVA showed a non-significant effect of treatment ($F_{(1,17)}=3.38$, n.s.).

Prior to submitting the animals to the object recognition task, behavioural exploration was recorded individually in the open field for 10 min. Two-way repeated measures ANOVA showed a significant effect of zone ($F_{(1,17)}=1064.15$, $p<0.001$) and the interaction zone×treatment ($F_{(1,17)}=44.23$, $p<0.001$). Animals exposed to MDMA spent significantly more time in the central area (centre vs periphery, 5.31 % in saline group, 26 % in MDMA group, see Fig. 5b).

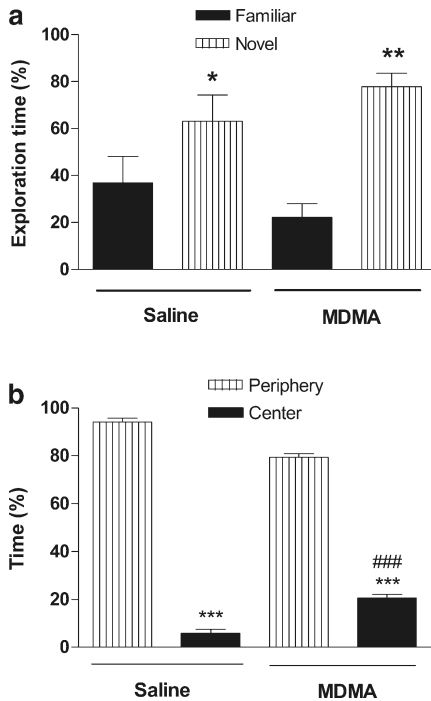


Fig. 5 **a** Comparison of the exploration time (in percentage) obtained in the object recognition task. Data represent the mean±SEM ($n=7-9$ per group) of the time spent by rats exploring the old and the new objects in the testing trial. Values $*p<0.05$ and $**p<0.01$ indicate the significant difference between the familiar and the novel object. **b** Comparison of exploratory behaviour in the open field of saline- and MDMA-treated rats. Data represent the mean±SEM ($n=7-9$ per group) of the percentage of time spent by animals in the periphery or in the centre of the arena. Values $*p<0.05$ and $**p<0.01$ indicate the significant difference between centre and periphery for each treatment group. $###p<0.001$ vs centre of saline group

Effects of MDMA on the FST

In another experiment, animals treated with saline or MDMA were submitted to FST 1 week after treatment in order to investigate whether a depressive effect could modify the results in other behavioural tests. We compared the behaviour of saline-treated animals with that of MDMA-treated ones in this task. Total floating time was recorded. No difference between the groups was found (61.14 ± 19.93 s saline; 42.41 ± 15.06 s MDMA).

Effects of MDMA on spine density in the hippocampus

It is known that repeated psychostimulant exposure increases the number of dendritic branch points and spines in the NAcc and striatum and of pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex; this phenomenon is related to behavioural sensitisation to these drugs (Robinson and Kolb 1999). As MDMA-treated

rats showed a better performance in the MWM, the next objective was to study whether treatment with MDMA could also modify spine morphology in the hippocampus, which could be correlated with the observed learning improvement.

Figure 6b shows some representative images of those used to quantify dendritic spine density in the CA1 region of the hippocampus of saline- and MDMA-exposed rats, trained (T) or not trained (NT) in the MWM. MDMA-NT rats presented a significant decrease in spine density vs saline NT ($p<0.01$). Training in the MWM increased the total number of spines in this area. Two-way ANOVA showed a significant effect of this variable ($F_{(1,16)}=16.12$, $p<0.001$) and the interaction training×treatment ($F_{(1,16)}=24.56$, $p<0.05$) (Fig. 6a). These results indicate that a short training period has a positive effect on the density of dendritic spines in the CA1 region in MDMA-treated animals.

Effects of MDMA on BDNF and PSD-95 expressions

Levels of BDNF protein were determined in all groups (Table 1). Two-way ANOVA showed a significant effect of treatment ($F_{(1,36)}=8.74$, $p<0.01$) on BDNF expression, but overall, those levels were non-dependent on training (Fig. 7a, b).

PSD-95 has important functions at the synapses, such as organisation of ionotropic glutamate receptors and, in general, regulation of synaptic transmission and plasticity (reviewed in Kim and Sheng 2004). In this sense we analysed the expression of this protein in the hippocampus of treated animals (Table 1). Restrictive training in the MWM increased the immunoreactivity to this scaffolding protein. Two-way ANOVA showed a significant effect of training ($F_{(1,16)}=14.17$, $p<0.01$), but not of treatment (saline-NT, 99.97 ± 0.36 , saline-T, 122.34 ± 6.06 ; MDMA-NT, 108.57 ± 0.41 ; MDMA-T, 126.24 ± 6.1). These results indicate that a short training period has a positive effect on the hippocampal expression of PSD-95.

Discussion

The recent work of Preissmann et al. (2012) provides direct support for the notion that the molecular and cellular mechanisms underlying the long-lasting behavioural plasticity associated with psychostimulant action may be similar to those implicated in learning and memory. The effect of amphetamines, specifically MDMA, in memory tasks have been extensively analysed (see “Introduction”). The most common finding is the improvement of this task, but some papers describe contradictory MDMA effects in the MWM test, which seem to depend on animal strain, sex, age, nutrition, stress, apparatus, training procedure (D’Hooge and De Deyn 2001) and also on drug treatment and MDMA abstinent

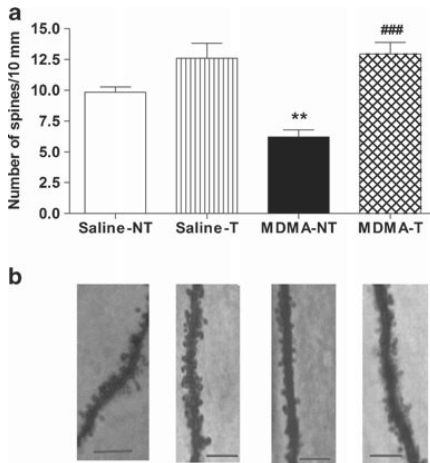


Fig. 6 **a** Spine numerical density in CA1 pyramidal neurons of saline- or MDMA-treated rats, trained (T) or not trained (NT) in the MWM 1 week after finishing treatment. Exposure to MDMA (NT) revealed a significant decrease in spine density vs saline (NT) (** $p < 0.01$). Training in the MWM caused an enhancement of the total number of spines in this area ($F_{(1,16)} = 1,612, p < 0.001$). #### $p < 0.001$ vs MDMA-NT. **b** Representative photomicrograph of dendritic spines of a pyramidal neuron from the hippocampal CA1 field of treated rats, trained (T) or not (NT), as an example of those analysed in the present study. Spine density was calculated by dividing the number of spines per segment by the length of the segment and was expressed as the number of spines per 10 μ m of dendrite. Scale bar, 10 μ m

period (Able et al. 2006; Camarasa et al. 2008; Cohen et al. 2005; Sprague et al. 2003; Vorhees et al. 2009).

MDMA is classified as a psychostimulant by promoting the release the dopamine and specially serotonin at neuronal synapses. The period of adolescence is characterised by extensive remodelling along with the overexpression and subsequent reduction in the number of monoaminergic receptors and related signalling proteins throughout the brain (Andersen and Navalta 2004; Brenhouse and Andersen 2011). Thus, the effects of stimulants may differ when experienced in adolescence, as opposed to adult or childhood (Moenk and Matuszewich 2012). A growing literature has begun to demonstrate that the dopamine systems differ across developmental periods in humans and rats and therefore, the behavioural effects of stimulants may differ as well (Kolta et al. 1990; Doremus-Fitzwater and Spear 2010; Tirelli et al. 2003).

The present study examined the effects of MDMA on memory and learning in adolescent rats, as assessed using the MWM and ORT. The effect of this amphetamine derivative on these tasks has been correlated with the density of dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the hippocampi of rats and with the expression of BDNF and PSD-95. The main finding was that MDMA induced a slight improvement of spatial learning in the MWM but a notable enhancement of both learning and reference memory processes when tasks were performed under restricted conditions. This improvement correlated with an increase in BDNF expression and coexisted with a rise in the number of spines only when animals were water maze-trained.

The dosage schedule employed in the present study was chosen in accordance with the literature and is thought to be equivalent to chronic administration (Battaglia et al. 1988; Pubill et al. 2003). It induces a neurotoxic effect on serotonergic terminals in the cortex, striatum and hippocampus of rats 3 days post-treatment, which is partially reversed 4 days later in the striatum and hippocampus (Camarasa et al. 2008). This lesion is not accompanied by intense and permanent microglial activation (Pubill et al. 2003).

Consistent with the appetite suppressant effect of amphetamines, the MDMA-treated animals in this study suffered a body weight loss of about 4 %, whereas body weight in the saline-treated controls increased by 14 %. For substituted amphetamines to induce neurotoxic damage, a combination of acute hyperthermia and increased neurotransmitter mobilisation is required. Induction of only one of these effects is not sufficient to cause serotonergic nerve terminal degradation (O’Loinsigh et al. 2001). Accordingly, in the present study, the treatment of animals was carried out at a high ambient temperature, and a hyperthermic effect of MDMA was observed every treatment day.

One week after treatment, rats were subjected individually to FST and to an open field test. In the FST, the total floating time was not significant different between groups. This result

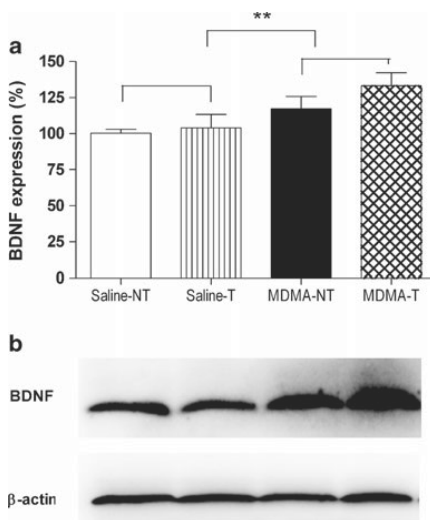


Fig. 7 **a** Quantification of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels from all the western blots performed. β -actin expression was used as a gel load control and to normalise the results as the ratio BDNF/ β -actin expression. T trained in the MWM, NT not trained in the MWM. Two-way ANOVA showed a significant effect of treatment ($p < 0.01$) on BDNF expression. **b** Representative western blots showing individual BDNF expression in the four groups of animals in the same order as in a

allows us to rule out that 1 week after drug exposure, rats exhibit a depressive behaviour that can modify their performance in other test. The behaviour in the open field is a measure of anxiety and also of risk-taking or impulsive behaviour because rats normally prefer to stay close to a wall where no predators can attack from behind (McMillen et al. 1998; Mehan et al. 2002). Under these conditions, the MDMA group ventured more frequently into the central area, a behaviour that can be associated with faster adaptation to a novel environment. Similarly, Mehan et al. (2002) concluded that MDMA-treated rats explored more, were less “anxious” and were more prepared to take risks 80 days after a neurotoxic dosage of the drug, supported by studies in the open field and elevated plus maze. The increase in the impulsivity component and the reduction in anxious attitude lead to a high exploration behaviour that could explain, in part, why MDMA-treated rats can cope better with new situations and perform better in some paradigms. This could contribute to the rationalisation of MDMA use in anxiety disorders (Johansen and Krebs 2009).

One week after the drug schedule, animals were initiated to training in the MWM. When this test was carried out under standard learning conditions, escape latency shortened significantly in both groups as the trials progressed, indicating that there was appropriate task learning. The MDMA group showed better spatial learning on days 2 and 4 of acquisition. A few trials of reversal learning were performed in order to examine the animals’ flexibility in their ability to learn across phases of new learning. As the trials evolved, the MDMA group performed better significant difference being observed in the third trial. Additionally, MDMA did not modify reference memory when analysed in the probe test or recognition memory when assessed in the novel object recognition task.

In the second experiment, water maze test was carried out under more restrictive learning conditions, increasing the acquisition–retrieval interval and shortening the acquisition days. In these conditions, saline-treated animals showed inadequate learning. However, MDMA-treated animals obtained a better score in cued learning, acquisition and final probe tests. These effects disappeared when the test was performed 1 month later.

Changes in behaviour and psychological function that occur as a function of experience, such as those associated with learning and memory, are thought to be due to the reorganisation of synaptic connections (structural plasticity). Potentially addictive drugs, including amphetamines, produce forms of structural plasticity evidenced in the nucleus accumbens and prefrontal cortex, which reflects a reorganisation of patterns of synaptic connectivity (Robinson and Kolb 2004). MDMA has been associated with stable adaptations in the dendritic structures of cortico-striatal neurons based on a large increase in the spine density in both areas (Ball et al. 2009). So far, no studies have been performed with MDMA in the

hippocampus. In our study, MDMA induced a decrease in spine density in the CA1 region of the hippocampus. This decrease is probably associated with the degenerative effect of the drug on serotonergic terminals in the hippocampus.

The number of dendritic spines in hippocampal CA1 pyramidal neurons increases when rats experience an environment that promotes spatial learning for several days (Hongpaisan and Alkon 2007; Hongpaisan et al. 2013; Moser et al. 1994). In our study, when rats were trained in the MWM, the density of hippocampal dendritic spines increased. Upon comparison of animals treated with MDMA, a very significant difference was obtained between trained and untrained group. Additionally, protein levels of PSD-95, a major scaffolding protein used as a synaptic marker, were also increased with training. These results indicate that a short training period has a positive effect on the density of dendritic spines in the CA1 region in MDMA group, recovering their initial reduction.

Some hypotheses can be suggested to explain the synaptic plasticity of MDMA-exposed rats when learning and memory training. Together with the strong synaptic increase in catecholamines and serotonin, MDMA induces a dose-related release of acetylcholine (Nair and Gudelsky 2006) and glutamate in the hippocampus (Anneken and Gudelsky 2012). Additionally, Hongpaisan et al. (2013) carried out experiments in aged rats which exhibited a deficit in mushroom spines synapses and found that PKC activation during memory training restores mushroom spine synapses in these animals. In this sense, it is described that MDMA, through the stimulation of serotonin receptors after this neurotransmitter release, activates this calcium- and diacylglycerol-dependent kinase (Chipana et al. 2006; Kramer et al. 1997).

Furthermore, in previous studies our group has described a partial agonist effect of MDMA on neuronal nicotinic $\alpha 7$ receptor subtype that implies a sustained increase in cytosolic calcium (Garcia-Ratés et al. 2010). Selective activation of this receptor has effects upon the BDNF–TrkB pathway (Serres and Carney 2006), and Tanaka et al. (2008) demonstrated that the application of BDNF is sufficient to induce protein synthesis-dependent spine enlargement. In our study, animals treated with MDMA experienced a significant increase in BDNF expression that further increased (although not significantly) with training. When animals were not trained, treatment with MDMA resulted in a reduction of dendritic spines, despite increased BDNF expression. However, if these animals were subjected to the MWM, the combined effect of training and increased BDNF correlated with the appearance of a higher number of dendritic spines. Closely related to these findings, Hemmerle et al. (2012) found that MDMA increases early expression of BDNF in the rat hippocampus, probably due to the increase in dopamine release. In addition, ecstasy-addicted human subjects show increased serum levels of this neurotrophic factor (Angelucci et al. 2010).

Overall, the evidence summarised in this paper demonstrates that following binge administration, adolescent Sprague–Dawley rats performed better in some behavioural tests only under restricted conditions of learning and memory. This improvement correlates with a rise in the number of spines. This synaptic plasticity could be the measurable consequence of the cooperativity of learning/memory training and MDMA effects on the brain-derived trophic factor, PKC and neurotransmitters. BDNF may provide a key to the behavioural findings, though further work is required to identify the mechanisms by which BDNF, being a trophic factor with multiple effects, could lead to improved cognitive performance. It cannot be ruled out that the effect of MDMA on learning could also be due to the action of this substance in decreasing feelings of fear, reducing anxiety and increasing impulsivity, which can accelerate adaptation to the novel environment of a water maze.

Acknowledgments The authors acknowledge the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising the language of the manuscript. S. Abad is a fellow of Institut de Biomedicina (IBUB, University of Barcelona). This work was supported by grants from Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-15948, SAF2011-23631 and SAF2012-39852-C02-01) and from the Generalitat de Catalunya (SGR0977).

Conflict of Interest The authors have no financial or non-financial competing interests in relation to the work described here.

References

- Able JA, Gudelsky GA, Vorhees CV, Williams MT (2006) 3,4-Methylenedioxyamphetamine in adult rats produces deficits in path integration and spatial reference memory. *Biol Psychiatry* 59:1219–1226
- Andersen SL, Navalta CP (2004) Altering the course of neurodevelopment: a framework for understanding the enduring effects of psychotropic drugs. *Int J Dev Neurosci* 22:423–440
- Angelucci F, Ricci V, Martinotti G, Palladino I, Spalletta G, Caltagirone C, Bria P (2010) Ecstasy (MDMA)-addicted subjects show increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor, independently from a rise of drug-induced psychotic symptoms. *Addict Biol* 15:365–367
- Anneken JH, Gudelsky GA (2012) MDMA produces a delayed and sustained increase in the extracellular concentration of glutamate in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 63:1022–1027
- Arellano JI, Benavides-Piccione R, De Felipe J, Yuste R (2007) Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci* 1:131–143
- Arias-Cavieres A, Rozas C, Reyes-Parada M, Barrera N, Pancetti F, Loyola S et al (2010) MDMA (“ecstasy”) impairs learning in the Morris Water Maze and reduces hippocampal LTP in young rats. *Neurosci Lett* 469:375–379
- Ball KT, Wellman CL, Fortenberry, Rebec GV (2009) Sensitizing regimens of (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy) elicit enduring and differential structural alterations in the brain motive circuit of the rat. *Neuroscience* 160:264–274
- Battaglia G, Yeh SY, De Souza EB (1988) MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol Biochem Behav* 29:269–274
- Beninger RJ, Gerdjikov T (2004) The role of signaling molecules in reward-related incentive learning. *Neurotox Res* 6:91–104
- Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S (1989) The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci* 48:29–69
- Brenhouse HC, Andersen SL (2011) Developmental trajectories during adolescence in males and females: a cross-species understanding of underlying brain changes. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1687–1703
- Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE (2009) Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 17:5–11
- Broening HW, Morford LL, Inman-Wood SL, Fukumura M, Vorhees CV (2001) 3,4-Methylenedioxyamphetamine (ecstasy)-induced learning and memory impairments depend on the age of exposure during early development. *J Neurosci* 21:3228–3235
- Camarasa J, Marimón JM, Rodrigo T, Escubedo E, Pubill D (2008) Memantine prevents the cognitive impairment induced by 3,4-methylenedioxyamphetamine in rats. *Eur J Pharmacol* 589:132–139
- Chipana C, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E (2006) Protection against MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in mice by methyllycaconitine: involvement of nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 51:885–895
- Cohen MA, Skelton MR, Schaefer TL, Gudelsky GA, Vorhees CV, Williams MT (2005) Learning and memory after neonatal exposure to 3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy) in rats: interaction with exposure in adulthood. *Synapse* 57:148–159
- Colorado RA, Shumake J, Conejo NM, Gonzalez-Pardo H, Gonzalez-Lima F (2006) Effects of maternal separation, early handling, and standard facility rearing on orienting and impulsive behavior of adolescent rat. *Behav Process* 71:1–58
- D’Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 36:60–90
- Doremus-Fitzwater TL, Spear LP (2010) Age-related differences in amphetamine sensitization: effects of prior drug or stress history on stimulant sensitization in juvenile and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 9:198–205
- Everitt BJ, Robbins TW (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 11:1481–1489
- Fole A, González-Martín C, Huarte C, Alguacil LF, Ambrosio E, Del Olmo N (2011) Effects of chronic cocaine administration on spatial learning and hippocampal spine density in two genetically different strains of rats. *Neurobiol Learn Mem* 95:491–497
- García-Ratés S, Camarasa J, Sánchez-García AI, Gandía L, Escubedo E, Pubill D (2010) The effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) on nicotinic receptors: intracellular calcium increase, calpain/caspase 3 activation, and functional upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 244:344–353
- Green AR, Mechan AO, Elliott JM, O’Shea E, Colado MI (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, “ecstasy”). *Pharmacol Rev* 55:463–508
- Hemmerle AM, Dickerson JW, Herring NR, Schaefer TL, Vorhees CV, Williams MT et al (2012) (±)3,4-Methylenedioxyamphetamine (“ecstasy”) treatment modulates expression of neurotrophins and their receptors in multiple regions of adult rat brain. *J Comp Neurol* 520:2459–2474
- Hongpaisan J, Alkon DL (2007) A structural basis for enhancement of long-term associative memory in single dendritic spines regulated by PKC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19571–19576
- Hongpaisan J, Xu C, Sen A, Nelson TJ, Alkon DL (2013) PKC activation during training restores mushroom spine synapses and memory in the aged rat. *Neurobiol Dis* 55:44–62
- Johansen PØ, Krebs TS (2009) How could MDMA (ecstasy) help anxiety disorders? A neurobiological rationale. *J Psychopharmacol* 23:389–391
- Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5:771–781

- Kirov SA, Harris KM (1999) Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated. *Nat Neurosci* 2:878–883
- Kolta MG, Scalzo FM, Ali SF, Holson RR (1990) Ontogeny of the enhanced behavioral response to amphetamine in amphetamine-pretreated rat. *Psychopharmacology (Berlin)* 3:377–382
- Kramer HK, Poblete JC, Azmitia EC (1997) Activation of protein kinase C (PKC) by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) occurs through the stimulation of serotonin receptors and transporter. *Neuropsychopharmacology* 17:117–129
- Leri F, Nahas E, Henderson K, Limebeer CL, Parker LA, White NM (2013) Effects of post-training heroin and d-amphetamine on consolidation of win-stay learning and fear conditioning. *J Psychopharmacol* 2:292–301
- Leuner B, Falduto J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23:659–665
- McMillen BA, Means LW, Matthews JN (1998) Comparison of the alcohol-preferring P rat to the Wistar rat in behavioral tests of impulsivity and anxiety. *Physiol Behav* 63:371–375
- Mechan AO, Moran PM, Elliott M, Young AJ, Joseph MH, Green R (2002) A study of the effect of a single neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; “ecstasy”) on the subsequent long-term behavior of rats in the plus maze and open field. *Psychopharmacology (Berlin)* 159:167–175
- Mithoefer MC, Wagner MT, Mithoefer AT, Jerome L, Doblin R (2011) The safety and efficacy of \pm 3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant posttraumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study. *J Psychopharmacol* 25:439–452
- Mithoefer MC, Wagner MT, Mithoefer AT, Jerome L, Martin SF, Yazarklosinski B et al (2013) Durability of improvement in post-traumatic stress disorder symptoms and absence of harmful effects or drug dependency after 3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy: a prospective long-term follow-up study. *J Psychopharmacol* 27:28–39
- Moenk MD, Matuszewich L (2012) Juvenile but not adult methamphetamine exposure improves performance in the Morris Water Maze in male rats. *Int J Dev Neurosci* 30:325–331
- Morini R, Mlinar B, Baccini G, Corradetti R (2011) Enhanced hippocampal long-term potentiation following repeated MDMA treatment in Dark-Agouti rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:80–91
- Moser MB, Trommald M, Andersen P (1994) An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12673–12675
- Nair SG, Gudelsky GA (2006) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine enhances the release of acetylcholine in the prefrontal cortex and dorsal hippocampus of the rat. *Psychopharmacology (Berlin)* 184:182–189
- O’Loinsigh ED, Boland G, Kelly JP, O’Boyle KM (2001) Behavioral, hyperthermic and neurotoxic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine analogues in the Wistar rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 25:621–638
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1978) “Behavioral despair” in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51:291–294
- Preissmann D, Leuba G, Savary C, Vernay A, Kraftsik R, Riederer IM et al (2012) Increased postsynaptic density protein-95 expression in the frontal cortex of aged cognitively impaired rats. *Exp Biol Med* 237:1331–1340
- Pubill D, Canudas AM, Pallas M, Camins A, Camarasa J, Escubedo E (2003) Different glial response to methamphetamine- and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 367:490–499
- Robinson TE, Kolb B (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17:8491–8497
- Robinson TE, Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11:1598–1604
- Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47:33–46
- Rodsiri R, Spicer C, Green AR, Marsden CA, Fone KC (2011) Acute concomitant effects of MDMA binge dosing on extracellular 5-HT, locomotion and body temperature and the long-term effect on novel object discrimination in rats. *Psychopharmacology (Berlin)* 213:365–376
- Sanchez V, O’Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI, Green AR (2004) Effect of repeated (“binge”) dosing of MDMA to rats housed at normal and high temperature on neurotoxic damage to cerebral 5-HT and dopamine neurons. *J Psychopharmacol* 18:412–416
- Serres F, Carney SL (2006) Nicotine regulates SH-SY5Y neuroblastoma cell proliferation through the release of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res* 1101:36–42
- Simon NW, Setlow B (2006) Post-training amphetamine administration enhances memory consolidation in appetitive Pavlovian conditioning: implications for drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* 86:305–310
- Skelton MR, Able JA, Grace CE, Herring NR, Schaefer TL, Gudelsky GA et al (2008) (+)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine treatment in adult rats impairs path integration learning: a comparison of single vs once per week treatment for 5 weeks. *Neuropharmacology* 55:1121–1130
- Skelton MR, Graham DL, Schaefer TL, Grace CE, Braun AA, Burns LN et al (2012) Distinct periods of developmental sensitivity to the effects of 3,4-(\pm)-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on behaviour and monoamines in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 15:811–824
- Slattery DA, Cryan JF (2012) Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 7:1009–1014
- Sprague JE, Preston AS, Leifheit M, Woodside B (2003) Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): effects on spatial learning. *Physiol Behav* 79:281–287
- Tanaka J, Horiike Y, Matsuzaki M, Miyazaki T, Ellis-Davies GC, Kasai H (2008) Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science* 319:1683–1687
- Thompson VB, Heiman J, Chambers JB, Benoit SC, Buesing WR, Norman MK et al (2009) Long-term behavioral consequences of prenatal MDMA exposure. *Physiol Behav* 96:593–601
- Tirelli E, Laviola G, Adriani W (2003) Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 27:163–178
- Vorhees CV, Schaefer TL, Skelton MR, Grace CE, Herring NR, Williams MT (2009) (+)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) dose-dependently impairs spatial learning in the Morris water maze after exposure of rats to different five-day intervals from birth to postnatal day twenty. *Dev Neurosci* 31:107–120
- Vorhees CV, He E, Skelton MR, Graham DL, Schaefer TL, Grace CE et al (2011) Comparison of (+)-methamphetamine, \pm -methylenedioxymethamphetamine, (+)-amphetamine and \pm -fenfluramine in rats on egocentric learning in the Cincinnati water maze. *Synapse* 65:368–378
- Wiig KA, Whitlock JR, Epstein MH, Carpenter RL, Bear MF (2009) The levo enantiomer of amphetamine increases memory consolidation and gene expression in the hippocampus without producing locomotor stimulation. *Neurobiol Learn Mem* 92:106–113

3.2 Publicació 2

Adaptive plasticity in the hippocampus of young mice intermittently exposed to MDMA could be the origin of memory deficits

Sònia Abad, Jorge Camarasa, Antonio Camins, Elena Escubedo (2015). *Molecular Neurobiology* [Epub ahead of print] DOI 10.1007/s12035-015-9618-z

Es ben conegut que l'MDMA presenta una farmacologia espècie-dependent. En rata, humans i primats actua com a neurotoxina serotoninèrgica, mentre que en ratolins, es presenta com a neurotoxina dopaminèrgica, sense afectar els terminals serotoninèrgics de l'hipocamp.

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser examinar si un tractament intermitent i perllongat amb el derivat amfetamínic en ratolins adolescents, podia afectar la memòria i l'expressió de diferents marcadors de plasticitat en hipocamp.

Per dur a terme aquest estudi, els animals van ser tractats durant vuit setmanes amb dosis creixents de la droga una vegada per setmana. Els animals van ser sacrificats en dos períodes de temps diferents: quinze dies després de l'última administració de l'MDMA (2w – adults-joves) o tres mesos després (3m adults-madurs). Una setmana abans del sacrifici els animals van ser sotmesos al test de reconeixement d'objectes.

El tractament no va modificar l'expressió de l'enzim triptòfan hidroxilasa 2 en hipocamp, un marcador de toxicitat serotoninèrgica, però en canvi va produir una disminució de neurones dopaminèrgiques en substància nigra, a les 2w que va romandre estable tres mesos després. Paral·lelament, a les 2w l'MDMA va provocar una disminució

RESULTATS

dels nivells de dopamina en estriat, els quals van tornar als nivells basals tres mesos després. En el test de memòria tan els animals joves com madurs administrats previs amb el derivat amfetamínic van demostrar pèrdua de memòria a llarg termini. Dos setmanes després del tractament els animals tractats van mostrar un increment en la forma fosforilada de CREB i en l'expressió de c-FOS, efecte que va ser transitori ja que tres mesos després no es van observar canvis. Tant el BDNF com l'Arc van exhibir una sobreexpressió sostinguda i duradora. Els nivells dels receptors NMDA2B i la PSD-95 no es van veure afectats.

En *conclusió*, un tractament intermitent amb MDMA provoca dèficit de memòria que és estable en el temps. Aquest dèficit podria ser la causa d'un procés de plasticitat maladaptativa en l'hipocamp.

Adaptive Plasticity in the Hippocampus of Young Mice Intermittently Exposed to MDMA Could Be the Origin of Memory Deficits

S. Abad¹ · J. Camarasa¹ · D. Pubill¹ · A. Camins^{1,2} · E. Escubedo¹ 

Received: 12 August 2015 / Accepted: 7 December 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract (\pm)3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is a relatively selective dopaminergic neurotoxin in mice. This study was designed to evaluate whether MDMA exposure affects their recognition memory and hippocampal expression of plasticity markers. Mice were administered with increasing doses of MDMA once per week for 8 weeks (three times in 1 day, every 3 h) and killed 2 weeks (2w) or 3 months (3m) later. The treatment did not modify hippocampal tryptophan hydroxylase 2, a serotonergic indicator, but induced an initial reduction in dopaminergic markers in substantia nigra, which remained stable for at least 3 months. In parallel, MDMA produced a decrease in dopamine (DA) levels in the striatum at 2w, which were restored 3 months later, suggesting dopaminergic terminal regeneration (sprouting phenomenon). Moreover, recognition memory was assessed using the object recognition test. Young (2w) and mature (3m) adult mice exhibited impaired memory after 24-h but not after just 1-h retention interval. Two weeks after the treatment, animals showed constant levels of CREB but an increase in its phosphorylated form and in c-Fos expression. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and especially *Arc* overexpression was sustained and long-lasting. We cannot rule out the absence of MDMA injury in the hippocampus being due to the generation of BDNF. The levels of NMDAR2B, PSD-95, and synaptophysin were unaffected.

In conclusion, the young mice exposed to MDMA showed increased expression of early key markers of plasticity, which sometimes remained for 3 months, and suggests hippocampal maladaptive plasticity that could explain memory deficits evidenced here.

Keywords MDMA · Mice · Recognition memory · BDNF · ARC · Synaptic plasticity

Highlights

- Intermittent repeated MDMA exposure reduces mouse TH immunoreactivity in the SN.
- MDMA treatment induces a transient decrease in the striatal DA levels.
- Mice exhibit a delay-dependent memory impairment that lasts for 3 months.
- The animals show a significant increase in p-CREB, c-Fos, BDNF, and *Arc* expression.
- We suggest that hippocampal maladaptive plasticity explains the memory deficits.

Introduction

(\pm)3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) is one of the most popular recreational psychoactive substances. Repeated MDMA administration at doses that are not thought to have any persistent effect on the dopaminergic system [1] produces long-term deficits in neurochemical indices of serotonergic function in the rat brain [2]. Conversely, it is generally agreed that in mice, high doses of MDMA induce a relatively selective dopaminergic terminal injury in the

✉ E. Escubedo
eescubedo@ub.edu

¹ Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry (Pharmacology Section), Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n., Barcelona 08028, Spain

² Networking Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

striatum [3, 4] and only transiently disrupts serotonin (5-HT) neurochemistry in the frontal cortex [3, 5], depending on the administration schedule and dose [6, 7].

Several studies in rats report acute effects of MDMA on learning and spatial memory functions [8–10]. Moreover, impaired memory has been reported 3 months after MDMA administration in rats [11]. Studies focusing on long-term consequences of MDMA in mouse memory are sparse, probably due to the fact that only a few studies have focused on the mouse hippocampus as a potential target for the effects induced by MDMA [12–14]. Moreover, none of those studies focuses on plasticity markers and memory with either a short or a long delay after MDMA exposition.

The importance of such research comes from the fact that MDMA is considered an addictive substance. Addictive drugs, including amphetamines, produce forms of structural plasticity that can be observed in the nucleus accumbens and prefrontal cortex. This plasticity reflects reorganization of patterns of synaptic connectivity [15], involving stable changes in the brain that are responsible for addiction, a life-long condition. In addition to the mesolimbic dopamine (DA) pathway, the plasticity may affect structures that mediate learned or conditioned responses, such as the amygdala, the hippocampus, and the cerebral cortex [16]. MDMA in particular has been associated with stable adaptations in the dendritic structures of cortico-striatal neurons, based on a large increase in the spine density in both areas [17].

Alterations in intracellular messenger pathways, transcription factors, and immediate early genes seem to be of fundamental importance for the development of plasticity, which is associated with addiction and cognition. Moreover, it is known that phospho-CREB (p-CREB) regulates the transcription of genes that contain a cAMP response element (CRE) site within their regulatory regions. This upregulation initiates some of the long-term changes in neuronal circuit functions that in turn promote the transcription of many genes, among them *Arc*, *c-Fos*, and expression of the NMDA receptor NR1 subunits *NR1* and *NR2*. *c-Fos* is an immediate-early gene (IEG). Its expression by individual neurons can be used as a marker of cell activation. *Arc* (the activity-regulated cytoskeleton-associated gene) is also an IEG which is translated to a cytosolic protein involved in the mechanism of synaptic plasticity associated with long-term potentiation (LTP) and learning [18]. Expression of *Arc* messenger RNA (mRNA) and/or protein is increased by neuronal excitation induced by electrical stimulation or by activation of glutamatergic, dopaminergic, or serotonergic receptors [19–21].

Another DA-dependent change, strongly associated with drug-induced neuroplasticity, is activation of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression. BDNF belongs to the class of psychostimulant-regulated IEGs [22]. It is well known that BDNF promotes forms of excitatory

synaptic plasticity, such as early- and late-phase LTP, and also promotes dendritic spine formation [23]. Until now, there were no studies of the impact of MDMA on the expression of this neurotrophin in the hippocampus of mice, which could provide useful information regarding the plasticity developed by the amphetamine derivative.

The effects of MDMA on learning and memory depend on the drug schedule and on the age at which the drug is administered [24]. Although a great deal of research has been devoted to elucidating the molecular mechanisms responsible for the cognitive deficits induced by MDMA, to date not a single molecule or pathway has been identified. In the present paper, we focus on MDMA exposure in young mice and its consequences for the young and mature adult brain. We attempt to simulate the pattern of human recreational consumption of MDMA through the dosage schedule we apply. We use mice, not rats, because this treatment schedule seems more likely to produce behavioral deficits in mice without inducing hippocampal toxicity.

Therefore, this study was designed to evaluate whether repetitive and intermittent MDMA exposure affects recognition memory and the expression of markers related with this cognitive process in a short period after ecstasy exposure. We also aimed to determine whether any such changes remain and become chronic, and to identify the type and nature of the factors that are mainly responsible for the impact of MDMA on recognition memory.

Materials and Methods

Animals

Adolescent male C57BL/6 mice (4–5 weeks old at the beginning of the experiment; Charles River Laboratories, France) were kept under controlled temperature, humidity, and light conditions with food and water provided ad libitum. They were treated according to European Community Council Directive 86/609EEC and the procedure registered at the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya.

Drug Treatment

To model recreational MDMA use, we considered appropriate to simulate the widespread practice of “boosting” (taking supplemental doses over time in order to maintain the drug’s effect) [25], MDMA was administered three times in a day, every 3 h, once a week for 8 weeks. The treatment schedule started with a standard dose of MDMA (5 mg/kg) or saline (5 ml/kg) [26], and drug increased over the treatment period (up to 10 mg/kg) imitating the classic consumption of a reinforcing compound. Accordingly, the doses were 5 mg/kg

(2 weeks), 7.5 mg/kg (the following 3 weeks), and 10 mg/kg (the last 3 weeks). Taking into account that the neurotoxic dose in mice is 25 mg/kg, three times in a day, every 3 h [6], the highest dose selected was 10 mg/kg. Exposition was at high ambient temperature (26 °C) as described elsewhere [27]. After the end of the treatment (ATET), mice were killed at two different time points: 2 weeks ATET (3.5 months old, $n=31$) and 3 months ATET (6 months old, $n=36$). At 3–6 months of age, mice have completed their development but are not affected by senescence yet; we referred to them as young (3.5 months old) and mature (6 months old) adults.

Therefore, in the present study, four groups were considered:

- Saline-treated mice, killed 2 weeks ATET: Saline 2w
- MDMA-treated mice, killed 2 weeks ATET: MDMA 2w
- Saline-treated mice, killed 3 months ATET: Saline 3m
- MDMA-treated mice, killed 3 months ATET: MDMA 3m

Object Recognition Test

One week before death, the recognition memory of the animals was tested using the object recognition test (ORT). The test consisted of a familiarization session (three consecutive days) in which mice explored an arena (a circular area measuring 40 cm in diameter) without objects for 10 min. During the first familiarization session, the animals were monitored to assess locomotor activity (Smart 3; Panlab SL, Barcelona, Spain). On the fourth day, the mice were trained with two identical objects (two objects “A”; 10 min). Novel object recognition was tested 1 and 24 h after the training session, when mice were exposed to the familiar object A and a novel object B (1 h) or C (24 h) for 10 min. The time spent by the mice at each of the objects was measured in seconds. Exploration of the objects was defined as sniffing, touching, and having moving vibrissae while directing the nose toward the object at a distance of less than 1 cm. The data were expressed as measures of discrimination between the new and familiar object, thus correcting the difference in the exploratory time of each object by the total exploration time.

Tyrosine Hydroxylase–Positive Neurons in Substantia Nigra

Mice were anaesthetized by i.p. injection of ketamine (100 mg/kg) plus xylazine (10 mg/kg) and were perfused with 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, after which the brains were removed. Coronal sections of 30 μm were obtained. Free-floating sections were rinsed in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, and preincubated in a blocking solution (10 % fetal bovine serum (FBS), 0.2 mol/l of glycine, Triton X-100 0.2 % in 0.2 % PBS-gelatin). Then, the sections were

incubated for 48 h at 4 °C with mouse anti-tyrosine hydroxylase antibody (1:200 BD Biosciences). After that, the sections were incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse secondary antibody (1:200; Sigma-Aldrich) for 2 h at room temperature. Finally, the slices were mounted on glass slides using Fluoromount (EMS). To quantify the total number of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons in the substantia nigra (SN), unbiased counting frame was positioned on each photomicrograph taken at a magnification of $\times 10$, according to the atlas of [28]. TH neurons were counted in both hemispheres using the ImageJ software, and the density (cells/area) was calculated in relation to the area delimited by the frame.

Measurement of Neurotransmitters

For analysis of neurotransmitter levels, the mice were killed by cervical dislocation and decapitation, the brains rapidly removed, and the striatum dissected out on ice. Samples were prepared by sonication in 10 volumes of 0.1 M perchloric acid, centrifuged for 30 min at $12,000\times g$ after which 40 μl of filtered supernatant was injected into HPLC system equipped with a Waters 2465 electrochemical detector set to a potential +0.70 V, and a column Nova Pack C18 4 μm 3.90 \times 150 mm (Waters, Milford, MA). The mobile phase consisted of purified water with 10 % methanol, 1.92 mM 1-octanesulfonic acid, 0.1 mM EDTA, and 10 mM phosphoric acid. Column temperature was set at 37 °C and a flow rate of 1 ml/min. The retention times for norepinephrine (NE), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), DA, homovanillic acid (HVA), and serotonin (5-HT) were 2.74, 4.46, 6.95, 8.13, 11.24, and 20.66 min, respectively.

Hippocampal Lysate Preparation

The hippocampus was quickly dissected out, frozen, and stored at -80 °C until use. When required, tissue samples were thawed and homogenated at 4 °C in lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, Nonidet P40 1 %, EDTA 2 mM, 4.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of aprotinin, 0.1 mM of phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM of sodium orthovanadate, and phosphatase inhibitor cocktail 1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)); lysated samples were mixed in an orbital for 2 h at 4 °C. The protein samples were then centrifuged at $15,000\times g$ for 30 min. The supernatant was recovered and protein content was determined using the Bio-Rad Protein Reagent.

Western Blotting and Immunodetection

Western blotting (WB) and immunodetection protocol was used to determine the proteins levels as described [29]. Primary antibodies are detailed in supplementary material. All

results are normalized to GAPDH or Actine, unless stated otherwise.

RNA Extraction and Quantification

Total RNA was isolated from the hippocampus of mice, using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, according to manufacturer's protocol (Qiagen). RNA pellet was reconstituted in RNase-free water, with the RNA integrity determined by Agilent 2100 Bioanalyzer.

Quantitative RT-PCR

First-strand complementary DNA (cDNA) was reverse transcribed from 1 μ g of total RNA from the hippocampus, using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit, according to manufacturer's protocol (Applied Biosystems). Equal amounts of cDNA of each individual animal were subsequently used for qRT-PCR, and each sample was analyzed in duplicate for each gene. The PCR reaction contained 15 ng of reverse-transcribed RNA, 2 \times IQTM 2SYBRGreen Supermix (BioRad, Barcelona, Spain), and 100 nM of each primer. The PCR assays were performed on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) and normalized to the average transcription levels of actin, using the delta-delta Ct method [30]. Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used to design the primers (supplementary material).

Statistical Analysis

Unless otherwise indicated, we used Student's *t* test for comparing the means of two treatments (saline or MDMA). All data are presented as mean \pm SEM, and the *P* values less than 0.05 were considered as significant.

Results

Object Recognition Test

On the first day of the familiarization of the ORT, locomotor activity was registered. Student's *t* test for distance travelled and locomotor speed showed a significant effect of treatment when assayed short time after finishing drug exposure (2w) (distance, 3081.3 \pm 160.5 cm saline vs 2604.0 \pm 132.9 cm MDMA, $p < 0.05$; speed, 5.14 \pm 0.24 cm/s saline vs 4.45 \pm 0.23 cm/s MDMA, $p < 0.05$; $n = 26$). This effect disappeared 3 months after finishing exposure.

Memory results were analyzed using two-way ANOVA and post hoc comparisons by Tukey's procedure, as we wanted to assess the effect of two variables: treatment and delay time. Both young and mature adult mice previously

exposed to MDMA exhibited impaired object recognition memory, measured as reduced novel preference, after a retention interval of 24 h but not after just 1 h. Statistical analysis revealed a significant effect of delay time (2w, $F_{1,24} = 83.78$, $p < 0.001$, $n = 26$; 3 m, $F_{1,21} = 33.23$, $p < 0.001$, $n = 23$) and of the interaction treatment \times delay time (2w, $F_{1,24} = 4.27$, $p < 0.05$, $n = 26$; 3 m, $F_{1,21} = 60.95$, $p < 0.001$, $n = 23$; see Fig. 1a, b). These results indicate a delay-dependent deleterious effect of the drug on memory.

As glucocorticoids impair performance of spatial memory (Bodnoff et al. 1995), we determined the effect of our chronic MDMA regimen on this receptor protein in this area. Neither the 2w group nor the 3 m group showed any effect of MDMA exposure (2w, 100 \pm 7.90 % saline vs 91.88 \pm 9.46 % MDMA, $n = 7$, not significant (n.s.); 3 m, 100 \pm 11.76 % saline vs 120.96 \pm 15.47 % MDMA, $n = 7$, n.s.)

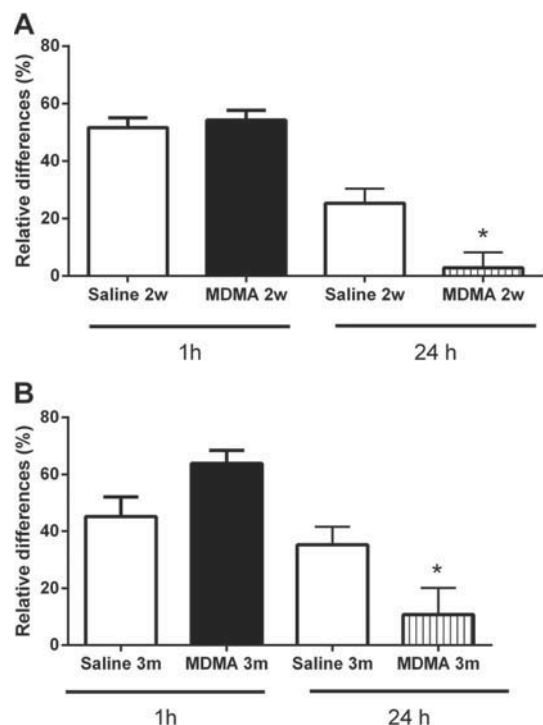


Fig. 1 Assessment of recognition memory in animals exposed to saline or MDMA and tested 1 week (**a**, $n = 26$) or 3 months (**b**, $n = 23$) after the end of the treatment. The time spent exploring new object was registered 1 and 24 h after the familiarization session and expressed as measures of discrimination between the new and familiar object. Data are presented as mean \pm SEM. Two-way ANOVA revealed a significant effect of delay time (2w, $F_{1,24} = 83.78$, $p < 0.001$; 3 m, $F_{1,21} = 33.23$, $p < 0.001$) and of the interaction treatment \times delay time (2w, $F_{1,24} = 4.27$, $p < 0.05$; 3 m, $F_{1,21} = 60.95$, $p < 0.001$). Post hoc comparisons by Tukey's procedure yielded the significances that are displayed in the graph. * $p < 0.05$ versus time-matched saline

Effects of MDMA on Neuronal Injury Markers

To assess the neurotoxicity, we measured neurotransmitter levels in striatum, also counting TH-positive cells in SN. To confirm that the treatment did not damage serotonergic terminals in the hippocampus, we also evaluated tryptophan-hydroxylase 2 (TPH2), a marker of 5-HT terminals.

Two weeks after the treatment, MDMA exposure caused a significant decrease of striatal DA levels (42.1 ± 4.1 nmol/g wet tissue (wt) saline vs 24.8 ± 4.7 nmol/g wt MDMA, $n=8$, $p=0.057$) and its main metabolite, DOPAC (14.3 ± 1.0 nmol/g wt saline vs 9.31 ± 0.98 nmol/g wt MDMA, $n=8$, $p<0.05$), without changing norepinephrine (0.66 ± 0.07 nmol/g wt saline vs 0.67 ± 0.19 nmol/g wt MDMA, $n=8$) or 5-HT levels (1.78 ± 0.37 nmol/g wt saline vs 1.77 ± 0.33 nmol/g wt MDMA, $n=8$). In parallel, we found a slight MDMA-induced decrease in the number of TH-positive neurons in SN (0.26 ± 0.02 positive cells/area saline vs 0.20 ± 0.01 positive cells/area MDMA, $n=12$, $p<0.05$; Fig. 2). However, no changes were observed for TPH2 expression in the hippocampus (100 ± 9.67 % saline, 102.54 ± 7.98 % MDMA, $n=7$).

When the same parameters were evaluated 3 months ATET, the levels of DA (37.20 ± 2.65 saline vs 37.70 ± 6.96 MDMA, $n=15$) and DOPAC (14.48 ± 1.16 saline vs 12.83 ± 1.34 MDMA, $n=15$) were restored in mice exposed to

MDMA. As expected, the MDMA effect on TH-positive cells in the SN was maintained (0.23 ± 0.01 positive cells/area saline vs 0.18 ± 0.01 positive cells/area MDMA, $n=8$, $p<0.05$; Fig. 3), and no changes in TPH2 expression in hippocampus were found (100 ± 13.54 % saline, 92.18 ± 8.90 % MDMA, $n=8$).

Effects of MDMA on Plasticity Markers (p-CREB/CREB) in the Hippocampus

Two weeks after the chronic administration of MDMA, no changes in the total level of CREB protein were detected (100 ± 21.37 % saline, 97.35 ± 8.57 % MDMA, $n=9$), but an increase in its phosphorylated form was observed (100 ± 21.37 % saline, 165.8 ± 14.62 % MDMA; $p<0.05$). As expected, this increase disappeared 3 months after the last dose of the drug (100 ± 13.95 % saline, 89.95 ± 15.72 % MDMA, n.s., $n=8$; Fig. 4).

Early Genes/Proteins

We performed PCR and WB assays to determine changes in genes or proteins strongly associated with neuroplasticity [22]. Of the CREB-regulated genes, we chose *Arc* and *c-Fos*.

Results showed that both *c-Fos* mRNA and c-FOS protein in the hippocampus were significantly induced by

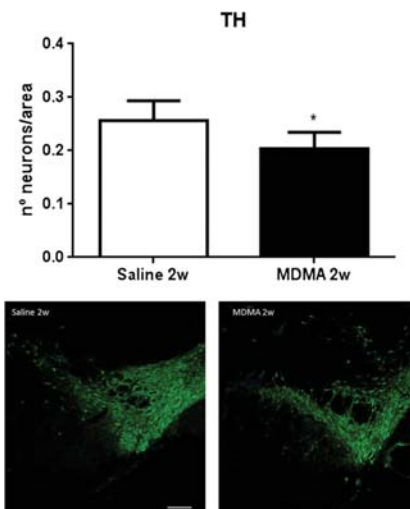


Fig. 2 Exposure to MDMA significantly decreased the TH-positive neurons in the SN. Bar graph shows the number of TH-positive neurons in SN, 2 weeks after the last exposure to the drug. Data represent the mean \pm SEM. Post hoc Turkey test: $*p<0.05$ versus saline. Shown are representative photomicrographs of the effects of Saline or MDMA on TH immunofluorescence in the SN, after 2 weeks of withdrawal. Scale bar: 50 μ M

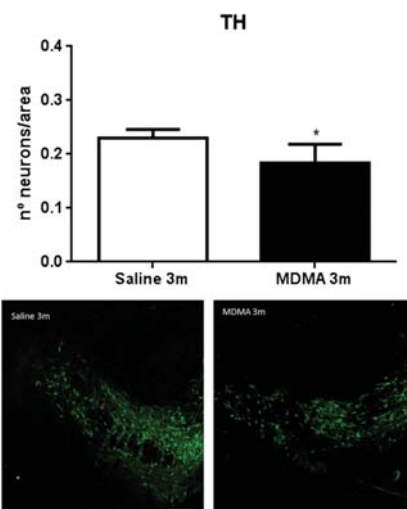
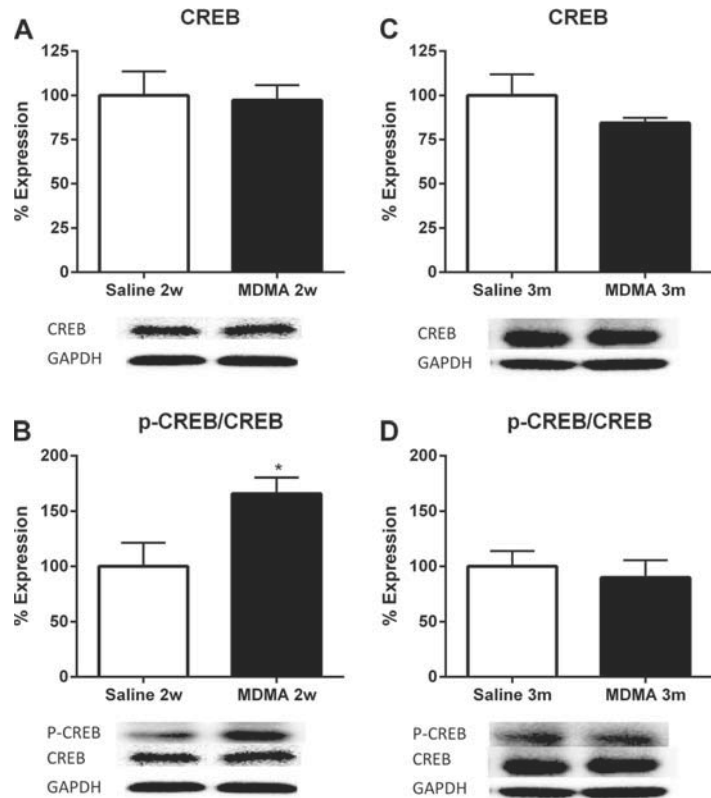


Fig. 3 Long-lasting effect of exposure to MDMA on TH-positive neurons in the SN. Bar graph shows the number of TH-positive neurons in SN, 3 months after the last exposure to the drug. Data represent the mean \pm SEM. Post hoc Turkey test: $*p<0.05$ versus saline. Shown are representative photomicrographs of the effects of MDMA on TH immunofluorescence in the SN, after 3 months of withdrawal. Scale bar: 50 μ M

Fig. 4 Effect of MDMA exposure on the expression of mouse hippocampal proteins CREB (a, c) and p-CREB (b, d). This was assessed 2 weeks (2w, a, b) or 3 months (3 m, c, d) after the end of the treatment. Data are presented as mean \pm SEM; * p < 0.05 versus saline



MDMA shortly ATET (mRNA, 100 ± 23.77 % saline, $n=4$, 391.1 ± 46.8 % MDMA, $n=9$, $p < 0.01$; protein, 100 ± 7.92 % saline, 144.0 ± 8.7 % MDMA, $n=8$, $p < 0.01$) but returned to basal values when assayed 3 months ATET (Fig. 5; mRNA, 100 ± 12.24 % saline, 117.1 ± 17.17 % MDMA, n.s., $n=9$; protein, 100 ± 16.68 % saline, 96.74 ± 16.68 % MDMA, n.s., $n=9$). The overexpression of *c-Fos* mRNA and c-FOS protein that lasts 2 weeks indicates a very strong signal during drug exposure.

Regarding ARC, repeated administration of MDMA to C57BL/6 mice induced significant expression of *Arc* mRNA (100 ± 11.72 % saline, 190.2 ± 22.47 % MDMA, $p < 0.05$, $n=9$) and ARC protein (100 ± 5.96 % saline, 126 ± 4.61 % MDMA, $p < 0.05$, $n=8$) when assayed 2 weeks ATET (Fig. 6a, b). Surprisingly, the overexpression of this gene was sustained and long-lasting (100 ± 11.17 % saline, 163.7 ± 20.67 % MDMA, $p < 0.05$, $n=9$), as shown in MDMA-treated mice, 3 months ATET. Nevertheless, no changes were found in ARC protein levels (100 ± 4.43 % saline, 114.0 ± 11.32 % MDMA, n.s., $n=7$) in mature adult mice (Fig. 6c, d).

BDNF

Despite of in the present study MDMA did not modify 5-HT parameters in hippocampus, we sought to measure its effect on the expression of BDNF, as our group reported increased hippocampal BDNF levels depending on cognitive training in rats exposed to MDMA [27].

Figure 7 summarizes the effects of MDMA on BDNF levels. A significant increase in *BDNF* mRNA transcript expression was found shortly after drug withdrawal (100 ± 8.01 % saline, 133.6 ± 7.07 % MDMA, $p < 0.05$, $n=10$). Likewise, MDMA-treated animals showed a slight increase in BDNF protein levels, although it did not reach statistical significance (100 ± 10.06 % saline, 126.8 ± 10.19 % MDMA, n.s., $n=8$)

In mature adult mice (3 months ATET), a delayed expression of BDNF protein was observed in MDMA-treated animals (100 ± 5.57 % saline, 138.35 ± 11.08 % MDMA, $p < 0.05$, $n=9$), although mRNA showed non-significant changes (100 ± 11.61 % saline, 124.2 ± 11.08 % MDMA, n.s., $n=10$). The changes in BDNF expression related with the amphetamine

Fig. 5 Effect of MDMA exposure on the expression of mouse hippocampal *c-Fos* mRNA transcript (a, c) and protein (b, d) tested 2 weeks (2w) or 3 months (3 m) after the end of the treatment (a, b; and c, d, respectively). Data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ versus saline

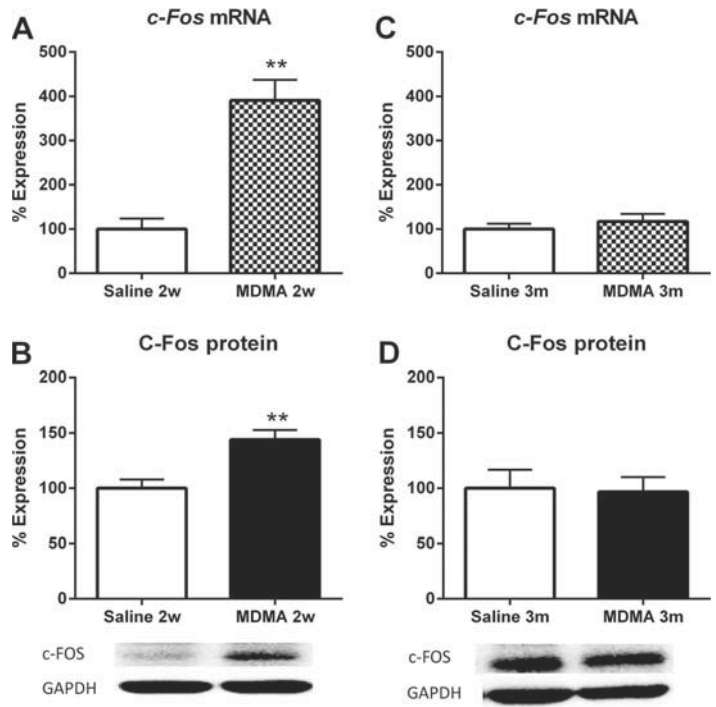


Fig. 6 Consequences of repeated and intermittent MDMA exposure for mouse hippocampal *Arc* mRNA transcript (a, c) and protein expression (b, d) assessed 2 weeks (2w, a, b) or 3 months (3 m, c, d) after the end of the treatment. Data are presented as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus saline

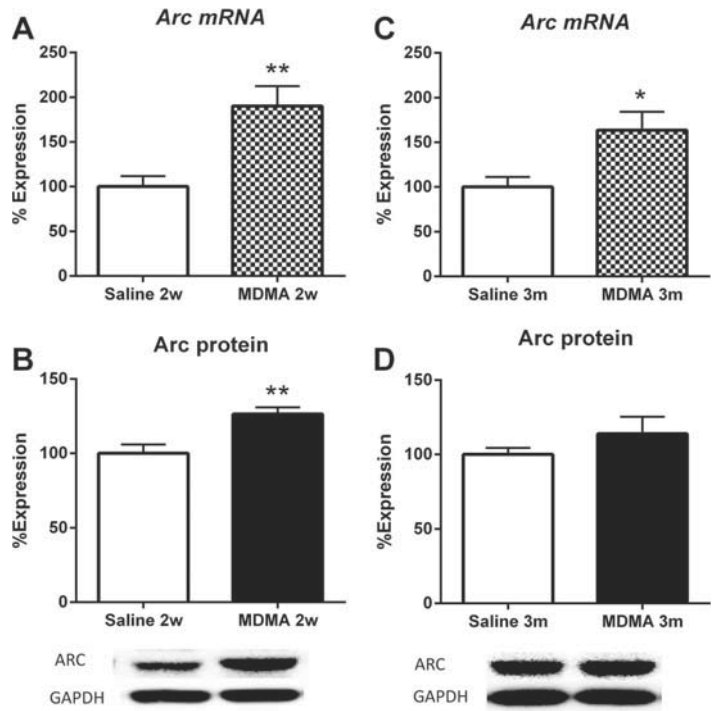
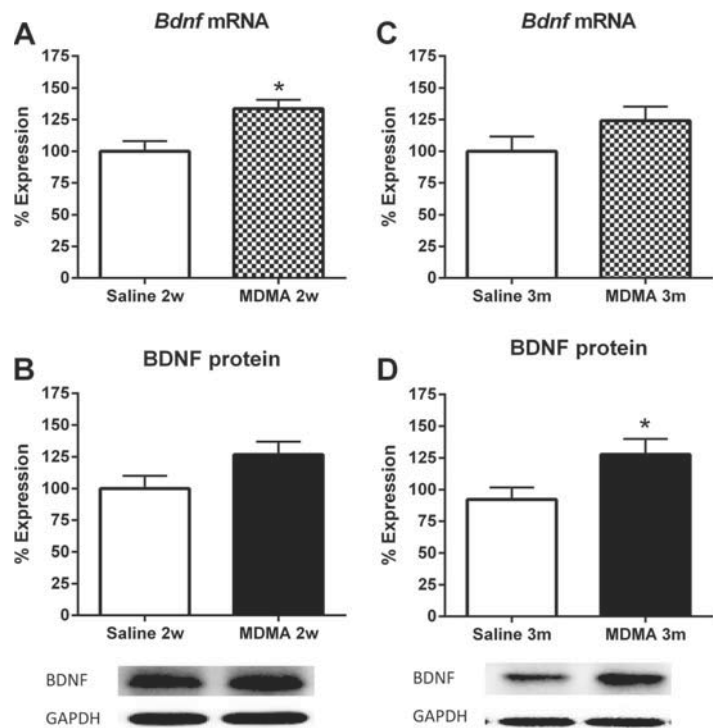


Fig. 7 Effect of MDMA exposure on mouse hippocampal *BDNF* mRNA transcript (a, c) and protein expression (b, d) tested 2 weeks (2w) or 3 months (3 m) after the end of the treatment (a, b; and c, d, respectively). Data are presented as mean \pm SEM; * p < 0.05 versus saline



derivative exposure are thus independent of the impact of MDMA on hippocampal 5-HT neurochemistry, absent from our study.

Regulation of Synaptic Plasticity-Related Proteins

Finally, other CREB-regulated genes are those encoding glutamate receptors. Synaptic plasticity associated with addiction and cognition relies on the normal integration of glutamate receptors at the post-synaptic density (PSD). Therefore, we studied the effects of MDMA exposure in the levels of four synaptic proteins: PSD-95, NR1, NR2B, and synaptophysin (2w, $n=7-9$; 3 m, $n=8-11$).

The effects of the assayed MDMA schedule on these proteins are shown in Fig. 8 and are presented as relative protein expression. Although an apparent decrease was observed for NR1 expression in both young and mature adults, statistical significance was not reached (2w, 100 ± 24.18 % saline, 71.91 ± 8.52 % MDMA, n.s., $n=7$; 3 m, 100 ± 27.83 % saline, 62.55 ± 12.70 % MDMA, $p=0.2835$, $n=10$; Fig. 8a, e). Moreover, MDMA failed to induce any change in NR2B expression (Fig. 8b, f).

Studies have shown that interactions between the PSD-95 protein and NMDA receptors located at the spine tip may also regulate dendritic spine morphology. Thus, we analyzed the

expression of this protein in the hippocampus of the treated animals. According to our results with NR2B, MDMA did not significantly modify the levels of this scaffolding protein (Fig. 8c, g; 2w, 100 ± 15.24 % saline, 71.28 ± 6.11 % MDMA, n.s., $n=8$; 3 m, 100 ± 5.58 % saline, 86.52 ± 6.42 % MDMA, n.s., $n=9$).

Finally, to explore the relationship between the cognitive changes observed in MDMA-treated mice and synaptic modifications, we studied the effect of a recent or a long earlier exposure in synaptophysin. Once again, our results revealed no relationship in this sense (Fig. 8d, h; 2w, 100 ± 14.67 % saline, 96.45 ± 16.62 % MDMA, n.s., $n=9$; 3 m, 100 ± 4.79 % saline, 108.67 ± 14.34 % MDMA, n.s., $n=8$).

Discussion

MDMA is an amphetamine derivative that acts as a psychostimulant by increasing catecholamine concentration in synapses. In comparison with methamphetamine, MDMA has enhanced potency for 5-HT release and reduced potency for DA release [31]. It also acts as an agonist of 5-HT_{2A} receptors [32] and, at high doses, as a 5-HT or DA neurotoxin in non-human primates, rats, and mice, often associated with depletion of 5-HT or DA terminal markers [2].

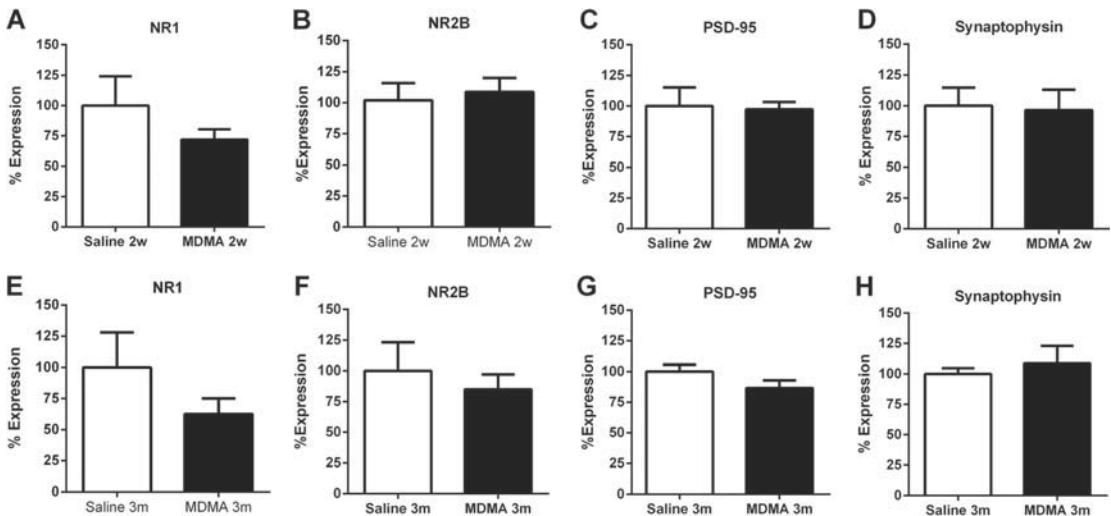


Fig. 8 Lack of specific regulation of synaptic plasticity-related proteins by repeated and intermittent MDMA treatment, in mouse hippocampus. Expression of the NR1 (a, e), NR2 (b, f), PSD-95 (c, g), and

synaptophysin (d, h) proteins was evaluated 2 weeks (2w, a, b, c, d) or 3 months (3 m, e, f, g, h) after the end of the treatment. Data are presented as mean \pm SEM

It is well established that MDMA has a different pharmacology in mouse compared to rat. In contrast to its selective 5-HT neurotoxicity in rats, after a binge schedule in mice (20–30 mg/kg, t.i.d, 3-h intervals), it is a relatively selective DA neurotoxin without long-lasting effects on the 5-HT content. Long-term studies in rats demonstrated that after MDMA-induced neurotoxicity, significant (even complete) recovery may occur from 8 weeks to a whole year [34]. Nevertheless, other studies have shown incomplete recovery in certain brain areas or in particular animals after 12–18 months post-treatment [35, 36]. Another important finding from those time course studies in rats was the late appearance of a serotonergic hyperinnervation of certain subcortical brain areas, a phenomenon thought to reflect axonal/terminal sprouting following synaptic loss.

In the present study, we applied a dosage schedule that imitated classic weekend recreational use of MDMA. The highest dose used was notably lower than the dose established as toxic in binge regimens [6], but we used a more extended treatment. Costa et al. [37] also used a prolonged and intermittent exposure (10 mg/kg two times in a day, twice per week during 9 weeks); nevertheless, we thought that once per week and administering increasing doses simulates better the pattern of consumption in adolescents. This treatment produced an initial reduction in TH immunoreactivity in the SN, which agreed with the results of Costa et al. There were no previous reports of longer-term effects of MDMA on mice, but our results here indicate an irreversible effect on dopaminergic neurons in SN or, alternatively, suggest that recovery from dopaminergic damage in mice takes more than 3 months.

In the striatum, neurotransmitter analysis revealed initial major decrements in DA levels, which recovered 3 months later. This suggests an increase in catecholamine synthesis or a compensatory DA axonal sprouting and branching after synaptic loss, or both. Acute activation of striatal dopamine synthesis after MDMA could be a compensatory response to the carrier-mediated efflux of transmitter [38]. Regarding dopaminergic terminal regeneration (sprouting), it was reported in mice 30 days after MDMA exposure [39] and involves plasticity events such as reactive synaptogenesis and rerouting of axons to unusual locations. In parallel, MDMA-exposed mice significantly reduced the distance travelled and speed when assayed shortly after finishing the treatment. These results agree with the reduction of DA neurons in SN and with DA depletion in the striatum, and this depressant effect disappeared 3 months later, correlating with the restoration of striatal DA levels.

In contrast, analysis of the hippocampus collected in 2w and 3m groups yielded no changes in the serotonergic marker (TPH2). In the same groups, prior to killing, recognition memory was tested using the ORT. When this task was tested after a short retention interval (1 h), the MDMA-treated mice performed similarly to control animals. However, when memory was tested after a long retention interval (24 h), for which a key role of the hippocampus has been reported, the MDMA group showed a very significant deficit, which was maintained for a prolonged time ATET. We ruled out changes in the glucocorticoid receptor as the origin of these deficits. These results indicate a delay-dependent deleterious effect of the drug on recognition memory and that the hippocampus is the

structure mainly responsible. The hippocampus is involved in object recognition memory regardless of retention interval, but parahippocampal structures (e.g., perirhinal cortex) are sufficient to support object recognition memory over short retention intervals [40].

On the other hand, it has been suggested that structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse reflects a reorganization of the patterns of synaptic connectivity which contributes to some of the persistent effects associated with drug use, including addiction. Exposure to amphetamine, cocaine, nicotine, or morphine produces persistent changes in the structure of dendrites and dendritic spines on neurons in some brain regions, such as those associated with incentive motivation, reward, and judgment [15]. Furthermore, persistent changes, such as those associated with learning and memory, are thought to be due to the reorganization of synaptic connections in brain circuits. Therefore MDMA, which induces anomalous neuroplasticity as a consequence of its addictive properties [41], could affect memory processes. This only could be possible if the plasticity changes are present in brain structures related to memory, such as hippocampus. Following rat developmental MDMA exposure, Williams et al. [42] found neuronal cytoarchitectural changes, which are long-lasting and are in regions consistent with the learning and memory deficits observed in such animals. Eight weeks after chronic administration of MDMA to rats, van Nieuwenhuijzen et al. [43] reported residual changes in hippocampal proteins implicated in learning-related neuroplasticity, and our group reported increased hippocampal BDNF levels and an effect on spine density depending on cognitive training [27]. However, previously, there were no data on the effects on mice, where the consequences of MDMA are known to be different.

The cAMP response element-binding protein binds to CRE sites as a dimer and only activates transcription when both subunits are phosphorylated at their Ser133 residue (p-CREB). As CREB can be phosphorylated at Ser133 by protein kinase A (PKA), p-CREB can be detected after DA type1 receptor stimulation by classical psychostimulants. p-CREB may initiate some long-term changes in neuronal circuit functions, thereby promoting the transcription of many genes, among them *Arc*, *c-Fos*, *NR1*, and *NR2B*. Therefore, CREB may be a universal modulator of processes required for memory formation [44]. Mice exposed to the assayed MDMA schedule showed constant levels of CREB but an increase in its phosphorylated form. It is worth stressing that these results were obtained in animals whose MDMA exposure finished 2 weeks previously, indicating an important phosphorylation stimulus. This was confirmed by measuring c-Fos, a marker of cell activation that behaves similarly to p-CREB, which increased shortly after treatment but had then reverted 3 months ATET.

Activity-regulated gene 3.1 (*Arg3.1*), also known as *Arc*, is an IEG that is regulated by BDNF- and CREB-dependent signaling [45, 46]. Arc protein acts as a stabilization factor for filamentous-actin, which results in the regulation of dendritic spine morphology [47, 48]. Arc could be considered a key regulator of protein synthesis-dependent forms of synaptic plasticity, which are thought to underlie memory storage [49]. In rats, single or repeated cocaine treatment, as well as long-term abstinence (48 days) following drug administration, increases Arc expression [50–52], although it is associated, at the same time, with alterations in the finely tuned mechanisms that regulate Arc degradation [52]. In our experiments, MDMA increased *Arc* transcript and protein expression after 2 weeks of withdrawal, which was also evident, although reduced, after 3 months of withdrawal. These results indicate an intense effect of MDMA on synaptic plasticity particularly intense in the early stages of withdrawal which fades with time.

In the same way, we assayed the effects of MDMA on BDNF. The mRNAs related to BDNF gene and to that of *Arc* are induced by cellular activity and transported into dendrites, thereby promoting plasticity [22]. The changes in BDNF accumulate and rise with increasing periods of abstinence [53]. Martínez-Turrillas et al. [54] studied the effects of an acute administration of MDMA to rats. They found that after MDMA, BDNF mRNA levels were increased in frontal cortex but reduced in hippocampus after 48 h, in spite of the marked increase at this time point in the levels of the transcription factor pCREB. Those authors attributed this variation to the high vulnerability of the rat hippocampus to the neurotoxic effects of the amphetamine. However, because hippocampus serotonergic neurotransmission is not affected by MDMA in mice, the consequences for BDNF levels are probably different. In neurons, the expression of BDNF mRNA is enhanced when the AMPA-type glutamate receptor is activated [55, 56], and requires an increase in intracellular calcium concentrations [57, 58]. We found [59] that treatment with MDMA significantly disrupted calcium homeostasis, favoring glutamate release in the hippocampus. These results allowed us to speculate about a possible effect of MDMA on BDNF expression. Indeed, in this area, we observed that few days after treatment, BDNF mRNA levels were increased with no significant effects at protein levels. Conversely, BDNF mRNA levels were not affected 3 months after exposure, while it significantly increased protein levels. This suggests that prolonged exposure to MDMA differently affects BDNF transcription and translation. It is known [60] that after an appropriate stimulus, a homogenous increase of BDNF mRNAs is carried out in the cell body, and it can be selectively targeted to the active synapse or non-selectively translocated to dendrites, but trapped by an active spine, where it would be quickly translated to BDNF protein. Therefore, BDNF mRNA and BDNF protein may be non-simultaneously stored in different

locations inside the neurons [61], which would explain the discrepancy between mRNA and protein levels found in the present study. We cannot dismiss the idea that in our model, the absence of injury in the hippocampus is due to the generation of BDNF in this area [62].

In addition to being involved in learning plasticity and neural cell death [63], the glutamate/glutamatergic system is involved in addiction to several drugs of abuse [64]; but knowledge of glutamate receptor regulation following MDMA administration is limited. Kindlundh-Högberg et al. [65] investigated in adolescent rats the immediate effects of repeated intermittent MDMA administration upon gene transcript levels of glutamatergic receptors. In contrast to other brain areas, they did not find changes in hippocampal NR1 or NR2B expression, 10 h after the last injection. In our study, the evaluation of NR2B, PSD-95, and synaptophysin also yielded constant levels, with only NR1 showing a tendency to decrease, which was not statistically significant.

Drugs of abuse, such as psychostimulants, usurp the normal basic reward function, essentially hijacking molecular and cellular processes, such as those involved in addiction, leading to persistent adaptive behavioral responses [64]. It is not completely understood to what extent these maladaptive changes in the reward circuit expand and affect other brain areas. In the present study, young mice exposed to intermittent and repeated doses of MDMA showed increased expression of key early markers of plasticity, which sometimes persisted for 3 months. Considering that the neuronal injury was detected in the SN but not in the hippocampus, we suggest that hippocampal maladaptive plasticity could explain the memory deficits evidenced here.

Conclusions

Mice exposed to an intermittent and repetitive schedule of MDMA for 8 weeks initially showed lower locomotor activity, concordant with the reduction of DA neurons in the SN and the depletion of DA in the striatum. Consistent with what happens with DA in the striatum, 3 months after treatment, this hypolocomotor effect disappeared. Mice also exhibited deficits in recognition memory that persisted at least 3 months ATET. However, in the hippocampus, MDMA administration did not cause any changes in 5-HT terminals or in NMDA subunits, indicating that other mechanisms underlie MDMA-elicited memory deficits. These behavioral changes correlate with significant overexpression of hippocampal plasticity markers downstream of CREB phosphorylation, which could be the result of DA D1 receptor stimulation. It is especially worth stressing the long-lasting increase in BDNF protein after drug exposure.

Acknowledgments The authors thank J.A. Paulsen-Medalen for technical assistance, and they also acknowledge the Language Advisory Service of the University of Barcelona for editing the language of the manuscript. Sonia Abad received a fellowship from the Institut de Biomedicina (IBUB, University of Barcelona). Funding for this study was provided by the Plan Nacional sobre Drogas (20121102) and the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 2013-46135-P) and by the Generalitat de Catalunya (2014SGR525). AC belongs to 2014SGR525, and JC, DP, and EE to 2014SGR1081.

References

1. Pubill D, Canudas AM, Pallàs M, Camins A, Camarasa J, Escubedo E (2003) Different glial response to methamphetamine- and methylenedioxyamphetamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Biomed* 367:490–499
2. Green AR, Mehan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI (2003) The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *Pharmacol Rev* 55:463–508
3. Logan BJ, Laverty R, Sanderson WD, Yee YB (1988) Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxyamphetamine) neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 152:227–234
4. Chipana C, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E (2006) Protection against MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in mice by methyllycaconitine: involvement of nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 51:885–895. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.05.032
5. O'Callaghan JP, Miller DB (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 270:741–751
6. Colado MI, Camarero J, Mehan AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, Green AR (2001) A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol* 134:1711–1723
7. O'Shea E, Esteban B, Camarero J, Green AR, Colado MI (2001) Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ("ecstasy") on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacology* 40:65–74
8. Able JA, Gudelsky GA, Vorhees CV, Williams MT (2006) 3,4-Methylenedioxyamphetamine in adult rats produces deficits in path integration and spatial reference memory. *Biol Psychiatry* 59:1219–1226
9. Sprague JE, Preston AS, Leifheite M, Woodside B (2003) Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): effects on spatial learning. *Physiol Behav* 79:281–287
10. Vorhees CV, Reed TM, Skelton MR, Williams MT (2004) Exposure to 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) on postnatal days 11–20 induces reference but not working memory deficits in the Morris water maze in rats: implications of prior learning. *Int J Dev Neurosci* 22:247–259
11. Morley KC, Gallate JE, Hunt GE, Mallet PE, McGregor IS (2001) Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4-methylenedioxyamphetamine ("ecstasy"). *Eur J Pharmacol* 433:91–99
12. Salzmann J, Marie-claire C, Guen SL, Roques BP, Noble F (2003) Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br J Pharmacol* 140:831–838
13. Tamburini I, Blandini F, Gesi M, Frenzilli G, Nigro M, Giusiani M, Paparelli A, Fomai F (2006) MDMA induces caspase-3 activation

- in the limbic system but not in striatum. *Ann N Y Acad Sci* 1074: 377–381
14. Busceti CL, Biagioni F, Rizzo B, Battaglia G, Storto M, Cinque C, Molinaro G, Gradini R et al (2008) Enhanced tau phosphorylation in the hippocampus of mice treated with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”). *J Neurosci* 28: 3234–3245
 15. Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47(Supplement 1):33–46
 16. Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119–128
 17. Ball KT, Wellman CL, Fortenberry E, Rebec GV (2009) Sensitizing regimens of (+/-)3, 4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) elicit enduring and differential structural alterations in the brain motive circuit of the rat. *Neuroscience* 160:264–274
 18. Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes C (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20:3993–4001
 19. Kodama M, Akiyama K, Ujike H, Shimizu Y, Tanaka Y, Kuroda S (1998) A robust increase in expression of arc gene, an effector immediate early gene, in the rat brain after acute and chronic methamphetamine administration. *Brain Res* 796:273–283
 20. Pei Q, Lewis L, Sprakes ME, Jones EJ, Grahame-Smith DG, Zetterstrom TS (2000) Serotonergic regulation of mRNA expression of Arc, an immediate early gene selectively localized at neuronal dendrites. *Neuropharmacology* 39:463–470
 21. Steward O, Worley PF (2001) Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30:227–240
 22. Kalivas PW, O'Brien C (2007) Drug Addiction as a Pathology of Staged Neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33:166–180
 23. Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76:99–125. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.06.003
 24. Broening HW, Morford LL, Inman-Wood SL, Fukumura M, Vorhees CV (2001) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)-induced learning and memory impairments depend on the age of exposure during early development. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:3228–3235
 25. Hammersley R, Ditton J, Smith I, Short E (1999) Patterns of ecstasy use by drug users. *Br J Criminol* 39:625–647
 26. 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
 27. Abad S, Fole A, del Olmo N, Pubill D, Pallàs M, Junyent F, Camarasa J, Camins A et al (2014) MDMA enhances hippocampal-dependent learning and memory under restrictive conditions, and modifies hippocampal spine density. *Psychopharmacology (Berlin)* 231:863–874
 28. Paxinos G, Franklin KBJ (2001) Mouse brain in stereotaxic coordinates
 29. Pedrós I, Petrov D, Allgaier M, Sureda F, Barroso E, Beas-Zarate C, Auladell C, Pallàs M et al (2014) Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APP^{swe}/PS1^{ΔE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:1556–1566
 30. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods San Diego Calif* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
 31. Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 15:61–69
 32. Rothman RB, Baumann MH (2003) Monoamine transporters and psychostimulant drugs. *Eur J Pharmacol* 479:23–40
 33. Nash JF, Roth BL, Brodtkin JD, Nichols DE, Gudelsky GA (1994) Effect of the R(-) and S(+) isomers of MDA and MDMA on phosphatidylinositol turnover in cultured cells expressing 5-HT_{2A} or 5-HT_{2C} receptors. *Neurosci Lett* 177:111–115
 34. Battaglia G, Yeh SY, De Souza EB (1988) MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol Biochem Behav* 29:269–274
 35. Scanzello CR, Hatzidimitriou G, Martello AL, Katz JL, Ricaurte GA (1993) Serotonergic recovery after (+/-)3,4-(methylenedioxy)methamphetamine injury: observations in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264:1484–1491
 36. Fischer C, Hatzidimitriou G, Wlos J, Katz J, Ricaurte G (1995) Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”). *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 15:5476–5485
 37. Costa G, Frau L, Wardas J, Pinna A, Plumitalo A, Morelli M (2013) MPTP-induced dopamine neuron degeneration and glia activation is potentiated in MDMA-pretreated mice. *Mov Disord* 28: 1957–1965
 38. Schmidt CJ, Abbate GM, Black CK, Taylor VL (1990) Selective 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 255:478–483
 39. Granado N, O'Shea E, Bove J, Vila M, Colado MI, Moratalla R (2008) Persistent MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the striatum and substantia nigra of mice. *J Neurochem* 107: 1102–1112
 40. Hammond RS, Tull LE, Stackman RW (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82:26–34
 41. Schenk S (2011) MDMA (“ecstasy”) abuse as an example of dopamine neuroplasticity. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1203–1218
 42. Williams MT, Skelton MR, Longacre ID, Huggins KN, Maple AM, Vorhees CV, Brown RW (2014) Neuronal reorganization in adult rats neonatally exposed to (±)-3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Toxicol Rep* 1:699–706
 43. van Nieuwenhuijzen PS, Kashem MA, Matsumoto I, Hunt GE, McGregor IS (2010) A long hangover from party drugs: residual proteomic changes in the hippocampus of rats 8 weeks after γ -hydroxybutyrate (GHB), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) or their combination. *Neurochem Int* 56:871–877
 44. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:127–148. doi:10.1146/annurev.neuro.21.1.127
 45. Ying S-W, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR (2002) Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Long-Term Potentiation in Intact Adult Hippocampus: Requirement for ERK Activation Coupled to CREB and Upregulation of Arc Synthesis. *J Neurosci* 22:1532–1540
 46. Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, Panja D, Schubert M et al (2009) The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200:125–140
 47. Huang F, Chotiner JK, Steward O (2007) Actin polymerization and ERK phosphorylation are required for Arc/Arg3.1 mRNA targeting to activated synaptic sites on dendrites. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27:9054–9067. doi:10.1523/JNEUROSCI.2410-07.2007
 48. Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dayte G, da Silva B, Bramham CR (2007) Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 27: 10445–10455

49. Farris S, Lewandowski G, Cox CD, Steward O (2014) Selective localization of arc mRNA in dendrites involves activity- and translation-dependent mRNA degradation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34:4481–4493
50. Fosnaugh JS, Bhat RV, Yamagata K, Yamagata K, Worley PF, Baraban JM (1995) Activation of arc, a putative “effector” immediate early gene, by cocaine in rat brain. *J Neurochem* 64:2377–2380
51. Freeman WM, Brebner K, Lynch WJ, Patel KM, Robertson DJ, Roberts DC, Vrana KE (2002) Changes in rat frontal cortex gene expression following chronic cocaine. *Brain Res Mol Brain Res* 104:11–20
52. Caffino L, Giannotti G, Malpighi C, Racagni G, Filip M, Fumagalli F (2014) Long-term abstinence from developmental cocaine exposure alters Arc/Arg3.1 modulation in the rat medial prefrontal cortex. *Neurotox Res* 26:299–306
53. Huang CC, Yeh CM, Wu MY, Chang AY, Chan JY, Chan SH, Hsu KS (2011) Cocaine withdrawal impairs metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 31:4194–4203
54. Martínez-Turrillas R, Moyano S, Del Río J, Frechilla D (2006) Differential effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* 402:126–130
55. Lindefors N, Ballarin M, Ernfors P, Falkenberg T, Persson H (1992) Stimulation of glutamate receptors increases expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 648:296–299
56. Lauterborn JC, Lynch G, Vanderklisch P, Arai A, Gall CM (2000) Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 20:8–21
57. Zafra F, Lindholm D, Castren E, Hartikka J, Thoenen H (1992) Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 12:4793–4799
58. Sano K, Nanba H, Tabuchi A, Tsuchiya T, Tsuda M (1996) BDNF gene can be activated by Ca²⁺ signals without involvement of de novo AP-1 synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 229:788–793. doi:10.1006/bbrc.1996.1881
59. Abad S, Junyent F, Auladell C, Pubill D, Pallàs M, Camarasa J, Escubedo E, Camins A (2014) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine enhances kainic acid convulsive susceptibility. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 54:231–242. doi:10.1016/j.pnpbp.2014.06.007
60. Steward O, Schuman EM (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* 24:299–325. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.299
61. Fumagalli F, Moro F, Caffino L, Orrù A, Cassina C, Giannotti G, Di Clemente A, Racagni G et al (2013) Region-specific effects on BDNF expression after contingent or non-contingent cocaine i.v. self-administration in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 16:913–918. doi:10.1017/S146114571200096X
62. Adori C, Andó RD, Ferrington L, Szekeres M, Vas S, Kelly PA, Hunyady L, Bagdy G (2010) Elevated BDNF protein level in cortex but not in hippocampus of MDMA-treated Dark Agouti rats: a potential link to the long-term recovery of serotonergic axons. *Neurosci Lett* 478:56–60. doi:10.1016/j.neulet.2010.04.061
63. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581–618
64. Kalivas PW (2009) The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci* 10:561–572. doi:10.1038/nrn2515
65. Kindlundh-Högberg AMS, Blomqvist A, Malki R, Schiöth HB (2008) Extensive neuroadaptive changes in cortical gene-transcript expressions of the glutamate system in response to repeated intermittent MDMA administration in adolescent rats. *BMC Neurosci* 9:39

3.3 Publicació 3

3,4-Methylenedioxyamphetamine enhances kainic acid convulsive susceptibility

Sònia Abad, Fèlix Junyent, Carme Auladell, David Pubill, Mercè Pallàs, Jorge Camarasa, Elena Escubedo, Antonio Camins. (2014) *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 54:231-242

L'àcid kainic (KA) causa convulsions i mort neuronal en l'hipocamp probablement mitjançant excitotoxicitat. En el procés d'excitotoxicitat tant el glutamat com la disrupció de la homeòstasis del Ca^{2+} hi juguen un paper important. Recentment, ha estat publicat que l'MDMA pot alliberar glutamat en l'hipocamp, a més de produir un increment del Ca^{2+} intracel·lular.

L'objectiu principal d'aquest estudi va ser determinar si un tractament recreacional amb MDMA afavoria el desenvolupament de les convulsions ocasionades pel KA i potenciava la neurotoxicitat induïda per aquesta neurotoxina.

El tractament recreacional consisteix en imitar el patró de consum dels joves adolescents, un cop per setmana, varies preses al dia, durant 4 setmanes. Vint-i-quatre hores després de l'última administració d'MDMA, els ratolins van ser injectats amb KA. Es van avaluar les convulsions, la mort neuronal, l'activació glial i l'expressió de diferents proteïnes d'unió al Ca^{2+} (CaBP). El tractament previ amb el derivat amfetamínic va afavorir les convulsions induïdes per KA, i va potenciar la mort neuronal en l'àrea CA1 de l'hipocamp i l'activació glial tant en la CA1 com en el gir dentat. A més, l'MDMA també va exacerbar la disminució de l'expressió de la proteïna parvalbumina (PV) produïda per KA. L'MDMA, *per se*, va provocar una disminució transitòria de

RESULTATS

les proteïnes calretinina (Cr) i calbindina (Cb), a més d'una disminució persistent de la proteïna PV. En cultius de cèl·lules corticals, el tractament amb el derivat amfetamínic a dosis de 10 μ M i 50 μ M va provocar un increment sostingut de la basal de Ca²⁺ intracel·lular, mentre que la basal de Na⁺ va disminuir, potenciant d'aquesta manera la resposta al KA.

En *conclusió*, el tractament previ amb MDMA predisposa a les convulsions induïdes per KA i potencia la neurodegeneració. El mecanisme proposat és mitjançant canvis en l'homeòstasi iònica de la cèl·lula i/o a un efecte indirecte a través dels receptors glutamatèrgics.



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pnp

3,4-Methylenedioxymethamphetamine enhances kainic acid convulsive susceptibility



Sónia Abad^a, Fèlix Junyent^a, Carme Auladell^{b,c}, David Pubill^a, Mercè Pallàs^{a,c}, Jorge Camarasa^a, Elena Escubedo^{a,*}, Antonio Camins^{a,c,1}

^a Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry (Pharmacology Section), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Department of Cellular Biology, Institute of Biomedicine (IBUB), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^c Networking Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Instituto de Salud Carlos III, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2014

Received in revised form 27 May 2014

Accepted 11 June 2014

Available online 28 June 2014

Keywords:

Calbindin
Calretinin
Kainic acid
MDMA
Parvalbumin
Seizures

ABSTRACT

Kainic acid (KA) causes seizures and neuronal loss in the hippocampus. The present study investigated whether a recreational schedule of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) favours the development of a seizure state in a model of KA-induced epilepsy and potentiates the toxicity profile of KA (20 or 30 mg/kg). Adolescent male C57BL/6 mice received saline or MDMA t.i.d. (s.c. every 3 h), on 1 day a week, for 4 consecutive weeks. Twenty-four hours after the last MDMA exposure, the animals were injected with saline or KA (20 or 30 mg/kg). After this injection, we evaluated seizures, hippocampal neuronal cell death, microgliosis, astrogliosis, and calcium binding proteins. MDMA pretreatment, by itself, did not induce neuronal damage but increased seizure susceptibility in all KA treatments and potentiated the presence of Fluoro-Jade-positive cells in CA1. Furthermore, MDMA, like KA, significantly decreased parvalbumin levels in CA1 and dentate gyrus, where it potentiated the effects of KA. The amphetamine derivative also promoted a transient decrease in calbindin and calretinin levels, indicative of an abnormal neuronal discharge. In addition, treatment of cortical neurons with MDMA (10–50 μ M) for 6 or 48 h significantly increased basal Ca^{2+} , reduced basal Na^+ levels and potentiated kainate response. These results indicate that MDMA potentiates KA-induced neurodegeneration and also increases KA seizure susceptibility. The mechanism proposed includes changes in Calcium Binding Proteins expression, probably due to the disruption of intracellular ionic homeostasis, or/and an indirect effect through glutamate release.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

A substantial number of studies have been performed on the neuropharmacological mechanisms involved in the adverse effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”) in laboratory animals, in which it has been shown to be neurotoxic to dopamine (DA) and serotonin (5-HT) terminals (Chipana et al., 2006; Cuyas et al., 2014; Esteban et al., 2001; O’Shea et al., 2006; Sanchez et al., 2004). It is well known that these neurotoxic effects are species-dependent (Logan et al., 1988). In mice, it is generally agreed that MDMA, at high doses (three doses of 25–30 mg/kg at 3 h intervals), induces dopaminergic terminal injury in the striatum (Chipana et al., 2006) and disrupts 5-HT neurochemistry in the hippocampus,

depending on schedule dose used. In contrast, administration of a neurotoxic regimen of this amphetamine derivative to rats results in a selective reduction in cerebral tissue concentrations of 5-HT and also in 5-HT uptake sites in cortex and hippocampus, pointing to a selective injury of serotonergic terminals (Green et al., 2003; Pubill et al., 2003).

Likewise recent reports documented the finding that repeated exposure of rats to MDMA increases glutamate release in the hippocampus (Anneken and Gudelsky, 2012). Sustained increases in extracellular glutamate have the potential to promote excitotoxicity and could be involved in the neurotoxic effects of MDMA in the brain (Capela et al., 2006).

Collectively all these data provide support to the suggestion that the consequences of chronic exposure to MDMA are not limited to specific neuron terminals, but that other elements are also susceptible to damage. In this sense, changes in the EEG records have been described in long-term MDMA users and epileptic seizures associated with these altered records are one of the most frequent disturbances in ecstasy abusers (Zagnoni and Albano, 2002). Giorgi et al. (2005) reported, for the first time, that MDMA lowered the threshold for kainate-induced seizures. These data are important because MDMA might predispose

Abbreviations: MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; KA, Kainic acid; CaBP, calcium binding proteins; PV, parvalbumin; CB, calbindin; CR, calretinin.

* Corresponding author at: Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n. Barcelona 08028, Spain. Tel.: +34 934024531; fax: +34 934035982.

E-mail address: eescubedo@ub.edu (E. Escubedo).

¹ E.E. and A.C. contributed equally to this work.

to seizures due to alterations in brain excitability (Brown et al., 2011; Zagnoni and Albano, 2002) or increasing basal calcium levels (Garcia-Ratés et al., 2010). However there have been few studies evaluating the proconvulsant effect of MDMA in experimental models of epilepsy (Giorgi et al., 2005) and they use a different schedule of MDMA administration than that of the present study.

Kainic acid (KA) has been widely used for its ability to replicate many of the phenomenological features of human temporal lobe epilepsy (Ben-Ari and Cossart, 2000; Leite et al., 2002). Seizures cause extensive brain damage concomitant with an increase in reactivity of the glia, as well as failure of the cellular homeostasis (Cavazos et al., 2004; Junyent et al., 2011a, 2011b; Kondratyev and Gale, 2004; Niquet et al., 1994; Represa et al., 1995). KA has direct excitatory effects on neurons but its potent neurotoxic action involves also the activation of presynaptic receptors on glutamatergic terminals, thereby releasing Asp and Glu. Endogenous glutamate, by activating NMDA, AMPA or mGluR1 receptors, may contribute to the brain damage occurring acutely after *status epilepticus* (Meldrum, 2000).

The aim of the present study was to evaluate whether MDMA favours the development of a seizure state in adolescent mice treated with the neurotoxin KA. We used a regimen of MDMA that differed from the classic neurotoxic exposure, trying to simulate classical adolescent weekend binge use of this substance. We observed a decrease in time to first seizure and an increase in seizure activity induced by KA. We also investigated whether hippocampal neurotoxicity after two different doses of KA is potentiated by MDMA. We also investigated by immunohistochemistry the effects of these treatments on the expression of calcium binding proteins (CaBP), which are crucial for calcium homeostasis in neurons, as well as the impact on Ca^{2+} levels in cortical neuron cultures.

Our data indicate that MDMA potentiates KA-induced neurodegeneration and also increases KA seizure susceptibility.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Adolescent male C57/BL6 mice (4–5 weeks old) (Charles River Laboratories, France) were kept under controlled temperature, humidity and light conditions with food and water provided *ad libitum*. They were treated according to European Community Council Directive 86/609/EEC and the procedure registered at the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.2. Drug treatments and sample preparation

To model recreational MDMA use, we used adolescent mice. It could also be considered appropriate to simulate the widespread practice of "boosting" (taking supplemental doses over time in order to maintain the drug's effect) (Hammersley et al., 1999; Meyer et al., 2008). To select the appropriate MDMA dose we took into account that the dose regimen used in neurotoxic experiments with mice is 25 mg/kg three times per day (tid) every 3 h (Colado et al., 2001) or 20 mg/kg every 2 h for a total of four injections (O'Callaghan and Miller, 1994). Consequently, a maximal dose of 10 mg/kg tid was chosen. Treatment schedule started with a standard psychostimulant dose of MDMA (5 mg/kg) (Spanos and Yamamoto, 1989) that increased over the treatment, imitating the classic consumption of a reinforcing compound. In order to simulate its recreational use, MDMA was administered once a week during all the periadolescent period (from week 4–8 of age) (Smith, 2003). Drug administration was carried out at high environmental temperature, thus simulating the hot environments in which this substance tends to be consumed (clubs, raves).

Initially, the animals were randomly assigned to the following treatment groups: saline + saline (saline), MDMA + saline (M),

saline + Kainate 20 mg/kg (KA20), MDMA + Kainate 20 mg/kg (M + KA20), saline + Kainate 30 mg/kg (KA30), MDMA + Kainate 30 mg/kg (M + KA30).

The animals ($n = 7-10$) for every treatment group in each experiment received a chronic dosage regimen of saline (5 ml/kg) or MDMA t.i.d. (s.c. every 3 h) on 1 day a week (the same day every week), for 4 consecutive weeks. MDMA and KA doses and the treatment schedule were as illustrated in Fig. 1. On the day of treatment, the environmental temperature was maintained at 26 ± 1 °C until 2 h after the last dose. Thereafter, the animals were returned to normal housing conditions (22 ± 1 °C). One hour after the second daily dose of saline or MDMA, rectal temperature was measured using a lubricated, flexible rectal probe inserted into the rectum and attached to a digital thermometer (0331 Panlab SL, Barcelona, Spain). The dose of MDMA increased every week. Accordingly, the doses were: 5 mg/kg, 7.5 mg/kg (for 2 consecutive weeks) and 10 mg/kg. Twenty-four hours after the last dose of MDMA or saline, the animals were exposed to low/moderate (20 mg/kg) or high (30 mg/kg) epileptogenic KA i.p. doses (Santos and Schauwecker, 2003; Sonn et al., 2010).

After the KA injection, the animals were put in individual plexiglas cages and observed for a period of 4 h to evaluate the occurrence and intensity of seizures. Seizures were assessed according to an adaptation of the Racine's scale (Racine, 1972) consisting of seven stages (0–6), which correspond to the successive developmental stages of motor seizures: (0) normal non-epileptic activity; (1) Still and crouched in a corner, staring; (2) Stretches body out, tail becomes straight and rigid, ears laid back, bulging eyes; (3) Repetitive head bobbing, rears into a sitting position with forepaws resting on belly (4) Rearing and falling tonic clonic seizures broken by periods of total stillness, jumping clonus, running clonus; (5) Continuous Level 4 seizures and (6) Body in clonus, no longer using limbs to maintain posture, usually a precursor to death.

The animals were killed 24 h or 72 h later. All mice were anaesthetized by i.p. injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and were perfused with paraformaldehyde 4% in phosphate buffer 0.1 M, after which the brains were removed. These were subsequently rinsed in paraformaldehyde 4% with 30% sucrose for 24 h and then frozen. Coronal sections of 30 μ m were obtained. Brains from mice killed after 24 h of KA treatment were used for microgliosis immunohistochemistry, and brains from mice killed after 3 days of KA treatment were used for GFAP immunohistochemistry. Fluoro-Jade B staining, calbindin-D28k, calretinin and parvalbumin immunohistochemistry were performed either at 24 or 72 h.

2.3. Fluoro-Jade B staining

Slides were defatted by dehydration in ethanol before being rehydrated, rinsed in phosphate-buffered saline (PBS), and incubated with 5 nmol/l of Hoechst 33342 for 10 min in the dark. After two washes in distilled water, the slides were immersed in 0.06 g/l of potassium permanganate ($KMnO_4$) for 15 min in the dark. After two washes, the slides were transferred to the staining solution containing 0.1 ml/l of acetic acid and 4 μ l/l Fluoro-Jade B for 30 min, in the dark. The slides were rinsed in distilled water, dried, and then submerged directly in xylene and mounted in DPX medium. They were analysed with an epifluorescence microscope (Olympus BX61).

2.4. Immunohistochemistry

Free-floating coronal sections were rinsed in 0.1 mol/l PB, pH 7.2, and then treated with 5 ml/l H_2O_2 and 100 ml/l methanol in PBS for 15 minutes. After that, they were preincubated in a blocking solution (10% fetal bovine serum (FBS), 0.2 mol/l of glycine, Triton X-100 0.2% in 0.2% PBS-gelatin). Then, the sections were incubated overnight at 4 °C with different primary antibodies: rabbit anticalbindin-D28k, rabbit anticalretinin and rabbit antiparvalbumin (1:1,000; Swant, Belinzona, Switzerland), rabbit antiiba-1 (Wako Chemicals, Japan

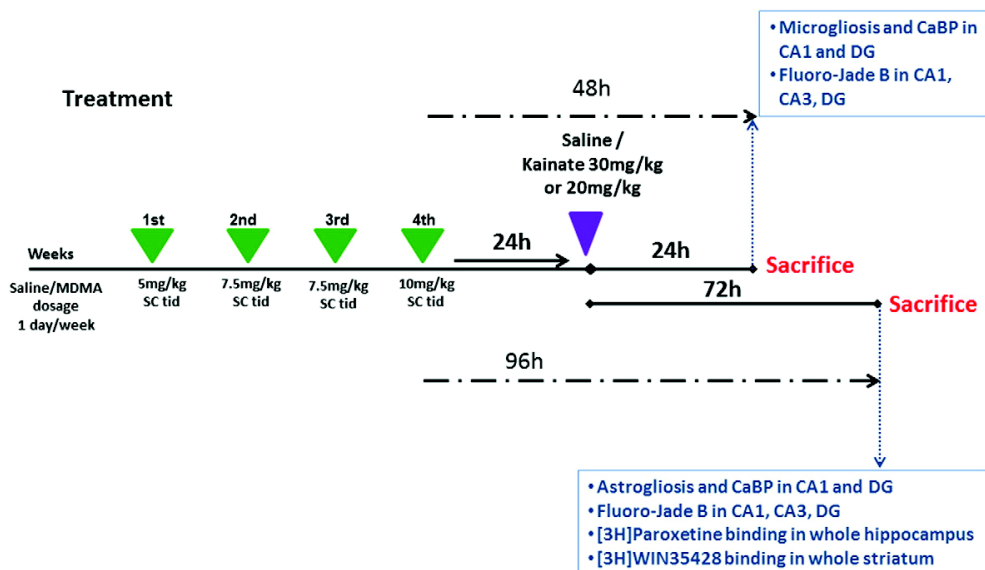


Fig. 1. Treatment schedule. The animals were randomly assigned to the following treatment groups: saline + saline, MDMA + saline (M), saline + kainate 20 mg/kg (KA20), MDMA + kainate 20 mg/kg (M + KA20), saline + kainate 30 mg/kg (KA30), MDMA + kainate 30 mg/kg (M + KA30). The animals ($n = 7-10$ for each treatment group in each experiment) received a chronic dosage regimen of saline (5 ml/kg) or MDMA t.i.d. (s.c, every 3 h) on 1 day a week, for 4 consecutive weeks. On the day of treatment, the environmental temperature was 26 ± 1 °C and this was maintained until 2 h after the last dose. Twenty-four hours after the last dose of MDMA or saline, the mice were exposed to KA ip. 20 or 30 mg/kg. Latency and presence of seizures were recorded immediately after KA administration. The animals were killed 24 h or 72 h later.

1:1000) and rabbit anti-gliofibrillary acidic protein (GFAP; 1:1,000; Dako, Denmark). After that, the sections were incubated with biotinylated secondary antibodies (1:200; Sigma-Aldrich) for 2 h at room temperature and then incubated with the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC; 1:200; Vector, Burlingame, CA). The peroxidase reaction was developed with 0.5 g/l diaminobenzidine in 0.1 mol/l PB and 0.1 ml/l H_2O_2 , and immunoreacted sections were mounted on gelatinized slides. The stained sections were examined under a light microscope (Olympus BX61).

Since the shape and marking profile of PV-positive cells was well defined and they were not very numerous, they were counted manually by an experimenter blinded to the experimental conditions. Cell counts were carried out with Photoshop 5.0 software after acquiring digitized images with the microscope (Olympus BX61, 25 × objective) equipped with a digital camera. GFAP, calbindin and calretinin immunostaining density in brain sections were determined using the ImageJ software (National Institute of Health), via which the regions of interest were defined and the corresponding intensity calculated. To quantify microglia in the hippocampus an unbiased counting frame was positioned on each photomicrograph taken at a magnification of 10x. The cells in the dentate gyrus and CA1 areas were counted manually and the density (cells/area) was calculated in relation to the area delimited by the frame. Microglial activation was assessed by manually delineating 10–15 cells in each area, followed by quantification of their staining density by means of Image-J software. The total microglial activation for each area was estimated by multiplying the staining density by the number of cells.

2.5. Quantification of dopaminergic and serotonergic terminals

2.5.1. Tissue sample preparation

For dopamine and serotonin transporter quantification, the fresh brains of animals killed 96 h post MDMA administration were used. Crude membrane preparations from the hippocampus and striatum were prepared as described elsewhere (Escubedo et al., 2005). Samples were homogenized at 4 °C in 20 volumes of buffer consisting of

5 mM Tris-HCl, 320 mM sucrose, and protease inhibitors (aprotinin 4.5 µg/µl, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM sodium orthovanadate), pH 7.4. The homogenates were centrifuged at $15,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The pellets were resuspended and centrifuged at $15,000 \times g$ for 30 min at 4 °C two more times. The final pellets (crude membrane preparation) were resuspended in the appropriate buffer and stored at -80 °C until use in radioligand binding experiments. Protein content was determined using the Bio-Rad Protein Reagent, according to the manufacturer's instructions.

2.5.2. DA and 5-HT transporter density

The density of DA transporter in mice striatal membranes was measured using [3H]WIN35428 binding assays. Membranes were resuspended in phosphate-buffered 0.32 M sucrose, pH 7.9 at 4 °C to a concentration of 1 µg/µl. Striatal membrane assays were performed in glass tubes containing 250 µl of [3H]WIN 35428 (final radioligand concentration, 5 nM) and 50 µg of membranes. The tubes were incubated for 2 h at 4 °C and non-specific binding was determined in the presence of 30 µM bupropion.

The density of 5-HT transporter in the hippocampal membranes was quantified by measuring the specific binding of 0.05 nM [3H]paroxetine after incubation with 150 µg of protein at 25 °C for 2 h in a Tris-HCl buffer (50 mM, pH 7.4), containing 120 mM NaCl and 5 mM KCl to a final volume of 1.6 ml. Clomipramine (100 µM) was used to determine non-specific binding.

All incubations were finished by rapid filtration under vacuum through Whatman GF/B glass fibre filters (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, U.K.). The radioactivity in the filters was measured by liquid scintillation spectrometry.

2.6. Neuronal cell cultures

Primary neuronal cultures of cerebral cortex were obtained from mice embryos (E-16–18) as described by Crespo-Biel et al. (2010) with minor modifications adapted to cortical cells.

Cell viability was assessed using two different methods, calcein and of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), because these two assays use a different endpoint to assess cell viability (intracellular esterase activity and mitochondrial dehydrogenase, respectively).

2.6.1. Calcium and sodium fluorimetry

Increases in intracellular Ca^{2+} and Na^{+} levels were monitored as described by Garcia-Ratés et al. (2010) using Ca^{2+} -sensitive dye Fluo-4 AM (3 μM) and Na^{+} -sensitive dye Corona-Green (3 μM). The fluorescence measurements were continued for a further 60 s or 300 s. To normalize Fluo-4 or Corona-Green signals, the responses from each well were calibrated by determining the maximum and minimum fluorescence values. This was done by adding 2 μM ionomycin (Fmax) followed by 10 mM EGTA (Fmin) in calcium experiments, and 1 mM gramicidin (Fmax) or tyrode without sodium (Fmin) in sodium experiments. Peak fluorescence responses in each well were calculated as a percentage of (Fmax – Fmin). The incubation times with MDMA were selected to determine the short-time effect of this substance on cellular homeostasis (6 h) and to mimic the schedule of the in vivo treatment because kainate was administered 48 h after the last dose of MDMA.

2.7. Data analysis

One-way or two-way ANOVA were used (InvivoStat). When the statistical value (F) was not significant, it was omitted. In all cases, post-hoc Turkey's pairwise comparisons were performed. All data are presented as mean \pm SEM, and differences are considered significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. The incidence of convulsions was evaluated by the Fisher's exact test.

3. Results

All weekly MDMA doses induced a significant increase in body temperature. Mild hyperthermia was apparent after MDMA 5 mg/kg (36.58 \pm 0.35 °C MDMA; saline: 36.02 \pm 0.44 °C; $p < 0.05$), MDMA 7.5 mg/kg (37.56 \pm 0.39 °C MDMA; saline: 36.44 \pm 0.51 °C; $p < 0.001$ second week; 37.91 \pm 0.13 °C MDMA; saline: 36.70 \pm 0.44 °C; $p < 0.001$ third week) and 10 mg/kg (37.83 \pm 0.69 °C MDMA; saline: 36.39 \pm 0.52 °C; $p < 0.001$).

We investigated whether this recreational MDMA exposure could provoke a neurotoxic effect on neuronal terminals. In the hippocampus of animals killed 4 days post-treatment, we detected a non-significant decrease in the density of [^3H]paroxetine binding sites, corresponding to serotonergic terminals (100 \pm 4.8% saline, 84.33 \pm 5.35% MDMA, $p = 0.10$). Similarly, when assessing the dopaminergic terminal injury in striatum by labeling the dopamine transporter with [^3H]WIN35428, we found no significant change in density (100 \pm 8.69% saline, 99.85 \pm 8.63% MDMA, $p = 0.99$).

Table 1
Effects of treatment on motor seizures measured as number of animals with tonic-clonic convulsions, time delay to show them immediately after KA administration and seizure intensity (according to scale of severity explained in materials and methods).

Treatment group	Animals with seizures n/N ^a	Latency (min)	Seizure intensity	Mortality
MDMA + saline (M)	0/8	0	0	0/8
Saline + Kainate 20 mg/kg (KA20)	1/16	58.00	1.8 \pm 0.2	0/16
MDMA + Kainate 20 mg/kg (M + KA20)	9/14***	30.00 \pm 4.87***	3.6 \pm 0.2***	0/14
Saline + Kainate 30 mg/kg (KA30)	7/8	51.14 \pm 6.36	4.6 \pm 0.3	0/8
MDMA + Kainate 30 mg/kg (M + KA30)	8/8	24.37 \pm 7.52***	5.2 \pm 0.3	2/8

^a n/N: Number of animals that showed seizure episodes (4th stage)/number of animals per group. *** $p < 0.001$ versus the corresponding saline + kainate group.

3.1. MDMA decreases seizure threshold and increases kainic acid neurotoxicity in mouse hippocampus

The administration of MDMA plus KA sensitized mice to a seizure state (Table 1). We treated mice with saline plus KA 20 mg/kg and found that this dose convulsed only 6.25% of the animals (1/16) with a time lag of 58 minutes and seizure intensity of 1.8. However, previous treatment with MDMA favoured the seizure state; 64.3% mice that had undergone pre-treatment showed seizures (4th stage) when KA was administered (9/14), the latency time was reduced by half, while seizure intensity was potentiated (3.6).

As shown in Table 1, mice treated with saline plus KA 30 mg/kg showed a more severe convulsive state (7/8, 87.5%) with a latency of 1 hour and seizure intensity of 4.6. Interestingly, those mice that had previously been treated with MDMA all convulsed, with a latency reduced by half. However, although the mean value of intensity obtained was higher (5.2) it did not reach statistical significance. Only the group M + KA30 experienced fatalities after KA administration (25%).

To evaluate neurodegeneration, Fluoro-Jade B staining was performed at 24 h or 72 h after KA administration. No labeled cells were seen in hippocampus of saline or M groups. In Fig. 2 we show that pre-treatment with MDMA significantly enhanced the presence of degenerating neurons due to KA 30 mg/kg in the hippocampal area CA1 at 24 h. However, KA neurotoxicity was not modified in other hippocampal areas such as CA3 and the dentate gyrus (DG). Similar results were obtained 72 h post KA dosage. The administration of KA 20 mg/kg did not give rise to Fluoro-Jade B-positive staining, and MDMA pretreatment did not modify staining (data not shown). Thus, the combined data demonstrate that this MDMA treatment specifically potentiates KA 30 mg/kg neuronal toxicity, which implies the involvement of the CA1 hippocampal area.

3.2. Glial and microglial activation in mouse hippocampus

Despite the presence of some inconsistencies in the literature, there is considerable evidence that MDMA doses that produce substantial, long-lasting reductions in 5-HT and other serotonergic markers do not reliably provoke astroglial or microglial responses. No microglial activation is noticeable at either 3 or 7 days after MDMA exposure to a neurotoxic schedule (Pubill et al., 2003), but after just 3–24 h Orio et al. (2004) found an increase in a specific microglial marker. For this reason, in the present study microgliosis was evaluated 24 h after KA treatment, using a specific marker of these non-neuronal cells, namely IBA-1. Our data demonstrated that there was mild hippocampal microglial activation in groups M, K20 or M + K20, which did not reach significance. In contrast, mice treated with KA 30 mg/kg showed activation, which was not enhanced by the recreational MDMA pretreatment ($F_{3,11} = 40.757$, $p < 0.001$, CA1; $F_{3,11} = 82.331$, $p < 0.001$, DG) (See Fig. 3).

It is well known that KA favours hippocampal glial activation in rodents after an excitotoxic treatment. GFAP was evaluated 3 days after KA treatment as this is the time when its maximal immunoreactivity is detected (Pernot et al., 2011). Recreational MDMA pretreatment

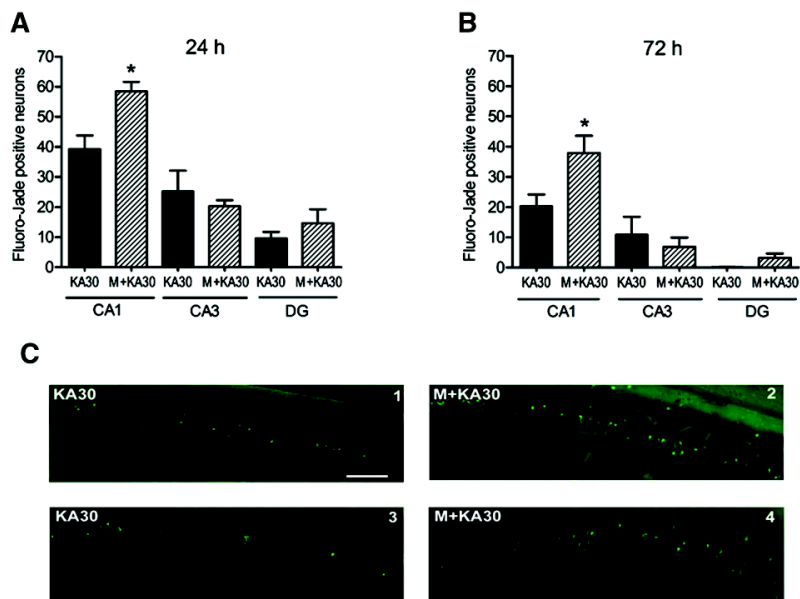


Fig. 2. Pretreatment with MDMA significantly enhanced the presence of degenerating neurons due to KA 30 mg/kg in hippocampal area CA1. Panels A and B show the number of Fluoro-Jade-positive neurons, in different hippocampal areas (CA1, CA3 and DG), 24 h and 72 h post KA30 mg/kg administration, respectively. C: Representative horizontal sections of hippocampal subfield CA1 (C1–C2 24 h and C3–C4 72 h post KA administration). * $p < 0.05$ versus KA30 in the same area.

enhances astrogliosis (measured using a specific antibody GFAP) in mice treated with 30 mg/kg KA (CA1: $F_{3,33} = 9.540$, $p < 0.001$, DG: $F_{3,33} = 21.971$ $p < 0.001$, see Fig. 4). Additionally, given the lack of

degenerative neurons in the hippocampus of mice treated with KA 20 mg/kg, no astroglial activation was observed at this dose, in either saline- or MDMA-pretreated animals.

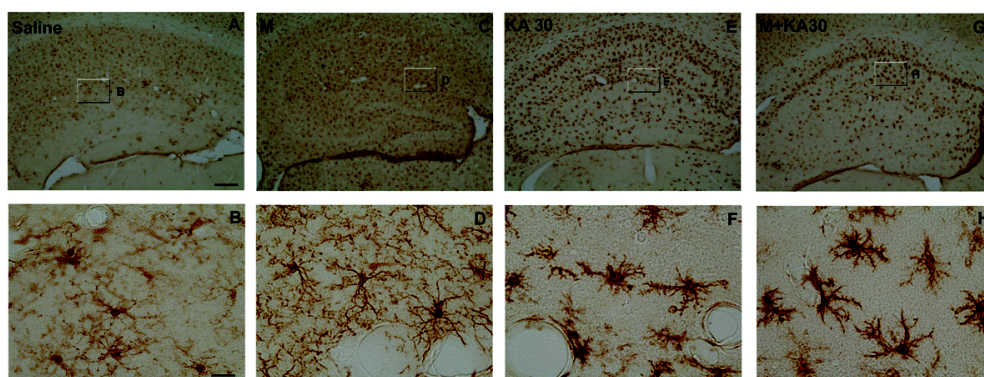
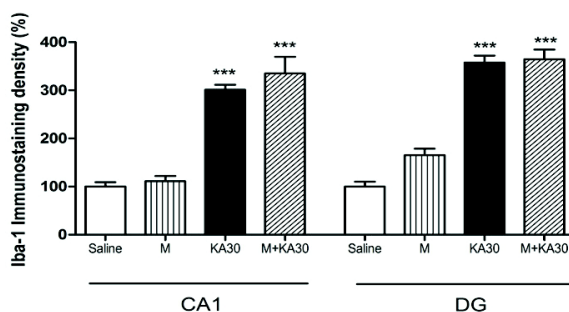


Fig. 3. 24 h post KA administration mice were killed for histological analysis of microgliosis using Iba-1. Upper panel shows the quantification of Iba-1 immunostaining density in CA1 and DG areas of hippocampus. *** $p < 0.001$ versus saline in the same area. Lower panels show representative immunohistochemistry for Iba-1 expression in horizontal sections of hippocampus from animals treated with saline + saline (A,B), MDMA + saline (C,D), saline + KA 30 mg/kg (E,F) or MDMA + KA 30 mg/kg (G,H). Scale bars: 200 μm in the upper panels, 20 μm in the lower panels. Recreational MDMA pretreatment did not enhance the effect of KA.

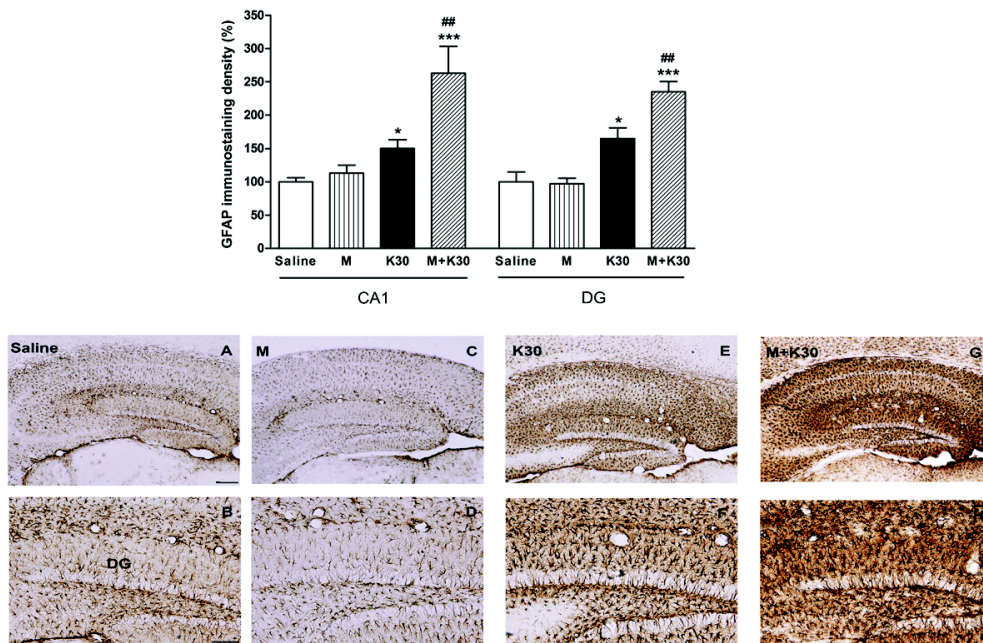


Fig. 4. 3 days post KA administration the mice were killed for histological analysis of astrogliosis using GFAP. Upper panel shows the quantification of GFAP immunostaining density in CA1 and DG areas of hippocampus. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ versus saline; ## $p < 0.01$ versus K30 in the same area. Lower panels show representative immunohistochemistry for GFAP expression in horizontal sections of hippocampus from animals treated with saline + saline (A,B) MDMA + saline (C,D), saline + KA 30 mg/kg (E,F) or MDMA + KA 30 mg/kg (G,H). Scale bars: 200 μ m in the upper panels, 20 μ m in the lower panels. Recreational MDMA pretreatment enhanced KA-induced astrogliosis.

3.3. Evaluation of the calcium binding proteins: parvalbumin, calbindin and calretinin

CaBP afford neuroprotection by buffering the sustained increase of intracellular calcium. The effects of treatments on the expression of these proteins in the hippocampus were determined using parvalbumin (PV), calbindin (CB) and calretinin (CR) immunostaining. It is known that the immunoreactivity to these CaBP was reduced as a consequence of KA treatment (Junyent et al., 2011a, 2011b).

In our experiments, exposure to MDMA plus saline resulted in a significant reduction in PV-positive GABA neurons that became more apparent 72 h after saline administration in the DG (Figs. 5 and 6 and supplementary information A and B) ($F_{2,17} = 3.61$, $p < 0.05$ CA1; $F_{2,17} = 13.938$, $p < 0.001$ DG). MDMA induced a reduction in this neuron type, compared to control animals, of about 68% in the DG and 48% in CA1. Mice treated with kainate also exhibited a decrease of PV-positive neurons. Two-way ANOVA evidenced a significant effect of treatment ($F_{2,14} = 5.27$, $p < 0.05$ CA1; $F_{2,14} = 45.41$, $p < 0.001$ DG). These animals exhibited a more significant reduction in DG immunostaining than in CA1. Moreover, immunohistochemistry results show a decrease of this protein in the DG of mice treated with the combination M + KA20 (24 h: 10.52 ± 1.06 KA20, 6.35 ± 1.44 M + KA20, $p = 0.05$).

With regard to calbindin (CB), the immunohistochemistry results at 24 h show a significant decrease of this protein in the CA1 area (78.05%) ($F_{2,17} = 15.739$, $p < 0.001$ CA1) and also in the DG granular zone (37.3%) ($F_{2,17} = 13.475$, $p < 0.001$) after treatment with MDMA. In the kainate groups, two-way ANOVA evidenced a significant effect of the variable treatment on the density of CB-immunoreactive neurons ($F_{2,32} = 6.88$, $p < 0.01$ CA1; $F_{2,32} = 21.00$, $p < 0.001$ DG), of the variable time ($F_{1,32} = 25.07$, $p < 0.001$ CA1; $F_{1,32} = 19.18$, $p < 0.001$ DG) and the interaction treatment X time ($F_{2,32} = 12.57$, $p < 0.001$ CA1, $F_{2,32} = 18.86$, $p < 0.001$ DG). Therefore, the initial decline evidenced in MDMA-exposed animals was also apparent in the animals treated

with KA 30 mg/kg (70.4% CA1; 70% DG). The animals exposed to MDMA plus KA 20 mg/kg or KA 30 mg/kg did not show any enhancing effect versus kainate alone (Figs. 5 and 6, Supplementary information C). The parallelism between the two substances, MDMA and KA 30 mg/kg, was also evident in the results obtained at later times. Thus in all groups, after 72 h, calbindin levels exceeded and immunostaining values returned to control values.

It is well known that CR is expressed in the population of GABAergic neurons known as interneuron-specific cells (Gulyás et al., 1996). In our study, the density of CR-immunoreactive neurons was significantly reduced 24 h after exposure to MDMA ($F_{2,24} = 43.982$, $p < 0.001$ CA1; $F_{2,24} = 17.943$, $p < 0.001$ DG) or KA30 (two-way ANOVA variable treatment $F_{2,48} = 38.14$, $p < 0.001$ CA1; $F_{2,48} = 6.47$, $p < 0.01$ DG; interaction treatment X time $F_{2,48} = 10.93$, $p < 0.001$ CA1; $F_{2,48} = 3.28$, $p < 0.05$ DG) and this decrease was more apparent in CA1 (98.4% MDMA, 72.2% KA30) than in the DG (25.6% MDMA, 18.9% KA30) (Figs. 5 and 6, supplementary information D). Similarly to calbindin, 72 h after kainate administration all values recovered so they did not differ from those saline-treated mice. Animals exposed to MDMA plus KA 20 mg/kg or KA 30 mg/kg did not show any enhancing effect.

However, there are also a small number of CR immunoreactive granule cells, mainly in the infragranular zone of the granular layer of the DG. It has been reported that kainate causes the proliferation of these cells (Domínguez et al., 2003). Our results indicate that when animals were exposed to MDMA, concomitantly with the loss of CR-immunostaining in the hippocampus molecular layer, there was a substantial increase of it in small cells in the infragranular zone (saline: $100 \pm 4.61\%$; MDMA 48 h: $134.65 \pm 10.08\%$; MDMA 96 h: $133.45 \pm 8.71\%$, $p < 0.01$), as also occurred in response to kainate.

3.4. Evaluation of intracellular calcium in cortical neuronal cultures

The entry of calcium into neurons is strongly associated with seizures (McNamara, 1992; Meyer, 1989) and the sustained entry induces

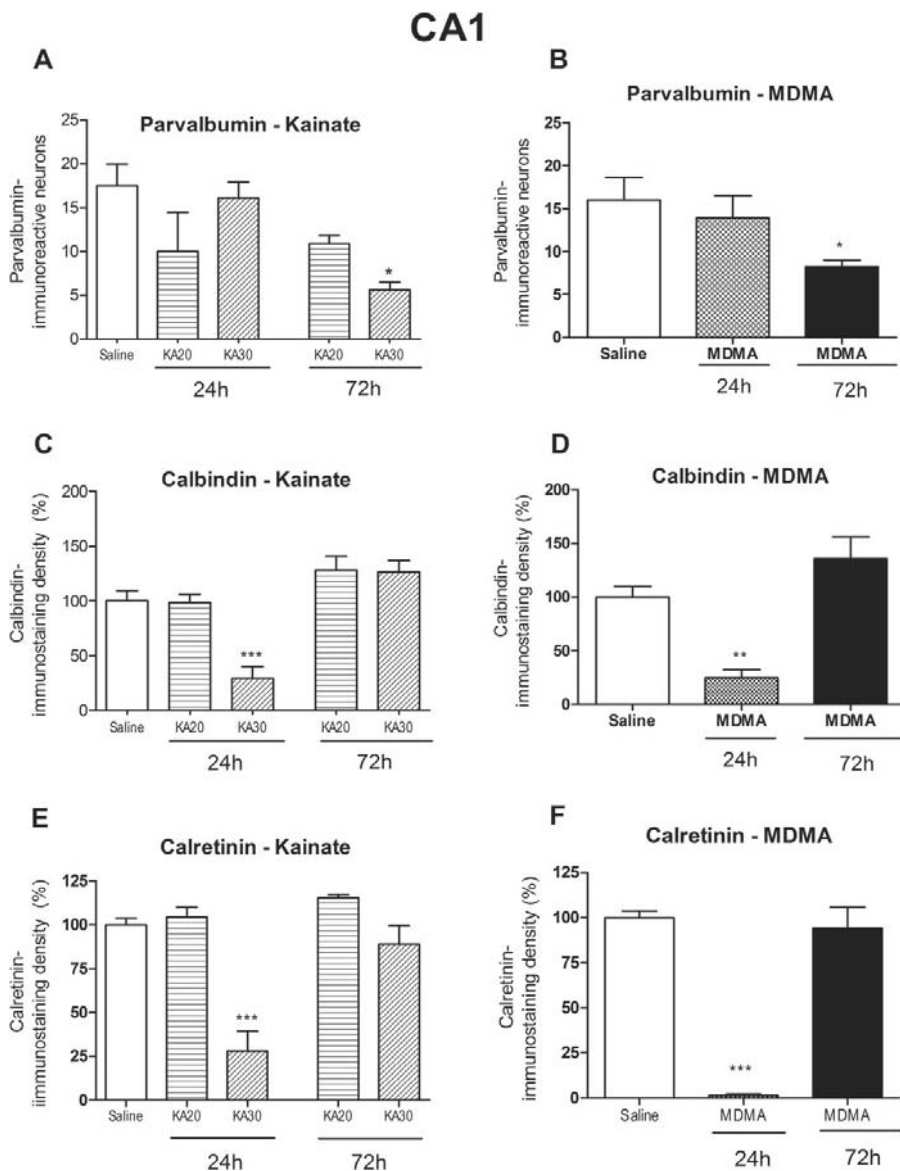


Fig. 5. Effect of treatment on hippocampal parvalbumin (A,B), calbindin (C,D) and calretinin (E,F) immunoreactivity in CA1 of mouse groups: saline, saline + KA 20 mg/kg (K20), saline + KA 30 mg/kg (K30) and MDMA + saline (MDMA). Left panel: kainate effects; right panel: MDMA effects. Temporal bars under figures display the time elapsed between the last kainate or saline administration and sacrifice. Two-way ANOVA was used to study two variables jointly, kainate concentration and time. One-way ANOVA was used to study the effect of MDMA exposure. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus saline.

excitotoxicity, leading to alterations of mitochondria and subsequent cell death (Cano-Abad et al., 2001). CaBP are crucial for calcium homeostasis in neurons (Baimbridge et al., 1992). When changes in CaBP levels are detected, this precludes fluctuations in intracellular calcium levels.

Since *in vivo* results demonstrate that MDMA induces changes in CaBP, the next series of experiments were carried out to determine whether MDMA increases cytosolic calcium in cultures of cortical cells or potentiates the calcium influx induced by the glutamatergic agonist. As KA induced a very low entry of calcium in these cultures, we used NMDA (N-methyl-D-aspartate), the agonist of NMDA receptors. Endogenous glutamate (released by activation of kainate presynaptic receptor) activates those highly Ca^{2+} permeable ionotropic receptors.

Prior to the experiments on calcium levels, we confirmed that the MDMA concentrations used (10–100 μ M) have no effect on cortical cell viability (calcein assay 48 h: saline $100.00 \pm 2.61\%$, MDMA 100 μ M $107.98 \pm 3.79\%$, n.s.; MTT assay 48 h: saline $100.00 \pm 1.75\%$, MDMA 100 μ M $102.92 \pm 2.21\%$, n.s.).

Fig. 7A shows that pre-treatment of cultured cortical neurons (6 h and 48 h) with different concentrations of MDMA (10, 50 μ M) significantly increased basal cytosolic free Ca^{2+} . Two-way ANOVA evidenced a significant effect of treatment ($F_{2,54} = 1525.21$, $p < 0.001$), time of incubation ($F_{1,54} = 2248.97$, $p < 0.001$) and the interaction treatment X time ($F_{2,54} = 615.58$, $p < 0.001$). It can be concluded that MDMA exhibited an inverse concentration- and time-dependent effect (MDMA 10 or

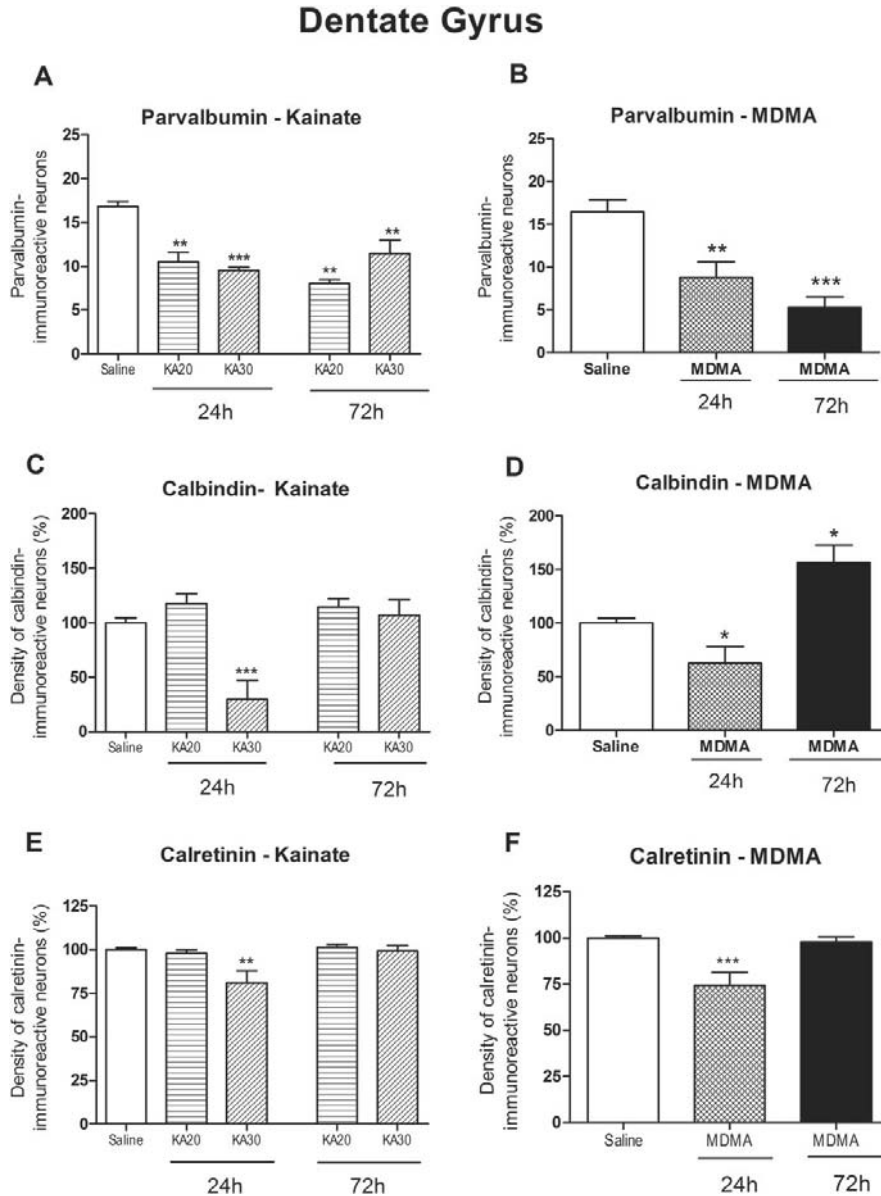


Fig. 6. Effect of treatment on hippocampal parvalbumin (A,B), calbindin (C,D) and calretinin (E,F) immunoreactivity in dentate gyrus of mouse groups: saline, saline + KA 20 mg/kg (K20), saline + KA 30 mg/kg (K30), MDMA + saline (MDMA). Left panel: kainate effects, right panel: MDMA effects. Temporal bars under the figures display the time elapsed between the last kainate or saline administration and sacrifice. Two-way ANOVA was used to study two variables jointly, kainate concentration and time. One-way ANOVA was used to study the effect of MDMA exposure. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus saline.

50 μ M higher increases at 6 h than 48 h). According to these results, MDMA sensitizes cortical neurons to maintain elevated intracellular levels of calcium and this effect is more apparent at low doses and shorter times of MDMA exposure. Likewise, after this pre-incubation we treated cortical neurons with 20 μ M NMDA. This glutamatergic agonist induced a rapid increase in fluorescence that was maintained for more than 5 min (results not shown). Values of calcium concentration were averaged out between 20–30 s after NMDA addition, and results were evaluated using two-way ANOVA. We found a higher calcium

increase when preincubation with the amphetamine derivative was carried out ($F_{2,72} = 625.73, p < 0.001$). This potentiation was more apparent when using a short period of preincubation ($F_{1,72} = 553.34, p < 0.001$) and low MDMA concentrations ($F_{2,72} = 401.06, p < 0.001$) (see Fig. 7B and C).

In parallel with these changes in calcium homeostasis, basal levels of intracellular sodium were decreased in cells incubated with MDMA ($F_{2,54} = 382.79, p < 0.001$) (Fig. 8A). When cells were challenged with 500 μ M Kainate, the Na^+ influx was higher in those pre-treated with

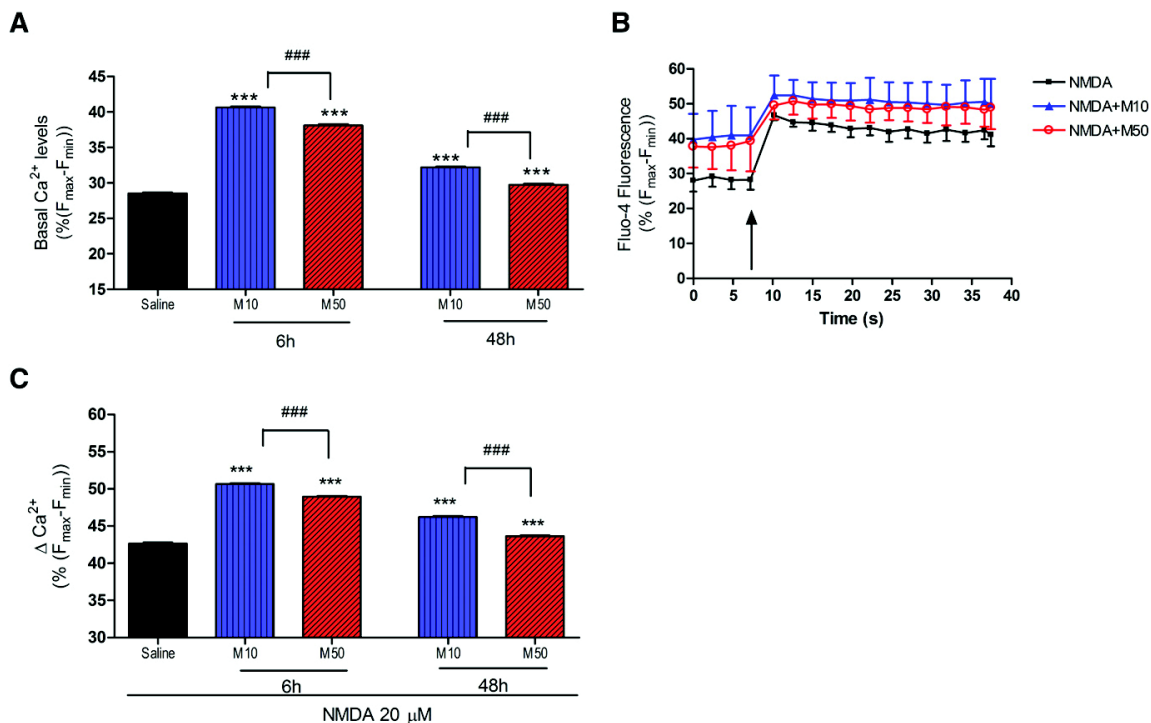


Fig. 7. Assays in cultured cortical cells. Effect of 6 h or 48 h preincubation with MDMA 10 (M10) or 50 μ M (M50) on intracellular calcium levels. Panel A: basal intracellular calcium levels. Panel B: time-course of the increases in Fluo-4 fluorescence after the addition of NMDA 20 μ M (at the arrow), in cells pre-treated for 6 h with saline or MDMA 10 or 50 μ M. Panel C: increase in cytosolic calcium induced by NMDA 20 μ M (values of Fluo-4 were averaged between 20–30 s after NMDA addition). Two-way ANOVA was used to study two variables jointly, MDMA concentration and preincubation time. *** $p < 0.001$ versus saline; ### $p < 0.001$ versus time-matched MDMA 50 μ M.

10 μ M MDMA ($F_{2,61} = 7.53$, $p < 0.001$), reaching the same maximal sodium level than cell treated with kainate alone, even though they started from lower basal Na^+ levels (Fig. 8B,C).

4. Discussion

The recreational consumption of amphetamines may be responsible for a significant proportion of drug-induced seizures. Thus it has been reported that MDMA induces seizures as a consequence of its brain neurotoxicity (Holmes et al., 1999), but other hypotheses have been proposed in order to explain the proconvulsant mechanism of MDMA. Seizures could be attributed to the metabolic effects of MDMA, mainly acute hyponatraemia combined with the hyperthermia that usually affects MDMA users. Clinical studies also suggest that the effects of MDMA modulation of the brain monoamine systems, specifically serotonin and norepinephrine, could be responsible for lowering the seizure threshold. Other authors (Giorgi et al., 2006) reported the lack of mossy fiber sprouting at short time intervals following MDMA (2 weeks) as a possible explanation to this adverse effect, and recent data (Anneken and Gudelsky, 2012) lead to the conclusion that glutamate release could be involved in the development of seizures. Few experimental studies have analysed the last hypothesis.

In the present study we investigated the effect of a recreational schedule of MDMA on neurotoxicity and seizures induced by KA. Systemic KA is a potent means of inducing limbic seizures with a primary action in the hippocampus between other areas (Lothman et al., 1981). When administered at high doses (30 mg/kg), KA can also induce neurotoxic injuries in the “resistant” strain C57BL/6 (Benkovic et al., 2006).

One of the most important results of the present study is that MDMA potentiated KA neurotoxicity in the hippocampus and altered calcium homeostasis. These alterations combined with a depletion of CaBP, markers of specific GABAergic subpopulations, can explain the increased susceptibility to KA-induced seizures. Our results are consistent with a role of MDMA in altering mouse brain excitability and unveiling proconvulsant activity in the presence of glutamate release. Giorgi and colleagues (Giorgi et al., 2005) also found evidence of this phenomenon, although they used different MDMA exposure. In our study, the increased susceptibility to seizures was specifically observed in response to low doses of KA (20 mg/kg), such that MDMA decreased the latency and increased the seizure intensity and the number of mice with seizures with respect to KA alone.

As mentioned above, one of the most interesting results of the present study is the increased neuronal cell death in hippocampal neurons in area CA1 in the treatment group M + K30. Other hippocampal areas (the CA3 and the DG) were not affected by MDMA pretreatment. We also analysed microglial and astroglial responses as characteristics of KA-induced neurodegeneration. Interestingly, MDMA pretreatment, by itself, was not able to trigger hippocampal astro- or microglial responses. However, 30 mg/kg but not 20 mg/kg KA induced hippocampal injury, astroglial and microglial activation, which is generally believed to contribute to neuroinflammation and neurodegeneration (Penkowa et al., 2001; Ravizza et al., 2005). The absence of these glial responses in MDMA group was reasonable, since the recreational regimen applied was not sufficient to produce a great degree of neuronal damage (non Fluoro-Jade B immunoreactive neurons, non-significant loss of serotonergic and dopaminergic terminals) (Colado et al., 2001; O’Callaghan and Miller, 1994).

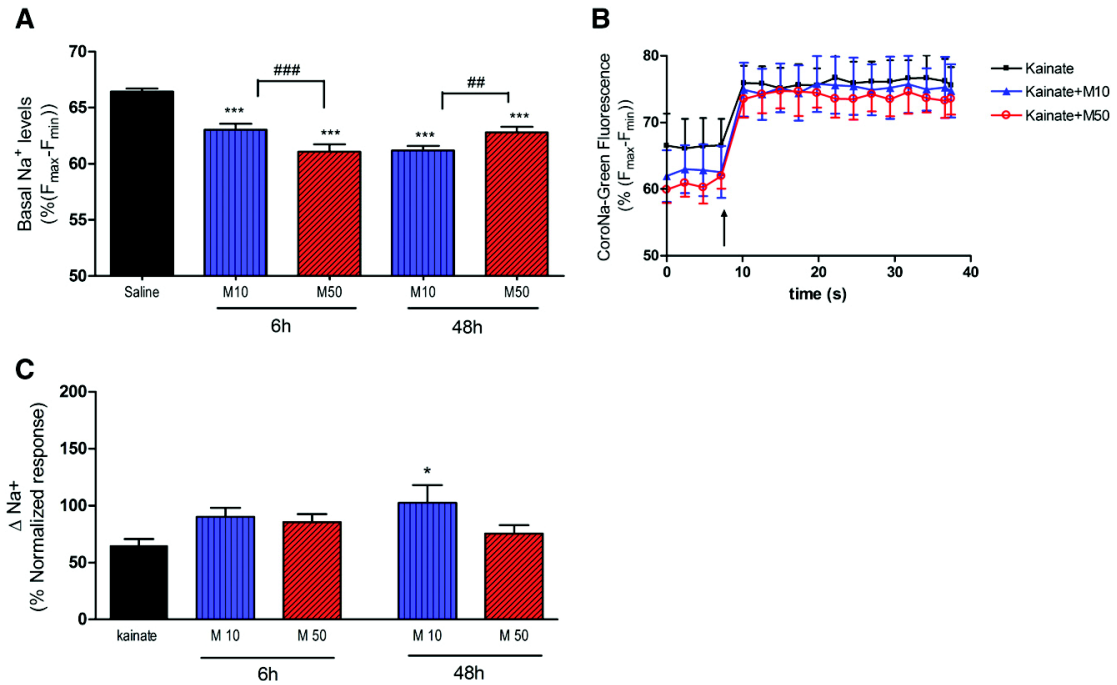


Fig. 8. Assays in cultured cortical cells. Effect of 6 h or 48 h preincubation with MDMA 10 (M10) or 50 μ M (M50) on intracellular sodium levels. Panel A: basal intracellular sodium levels. Panel B: time-course of the increases in Corona-Green fluorescence after the addition of Kainate 500 μ M (at the arrow), in cells pre-treated for 6 h with saline or MDMA 10 or 50 μ M. Panel C: intracellular sodium increase after kainate administration. Two-way ANOVA was used to study two variables jointly, MDMA concentration and preincubation time. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ versus saline; ## $p < 0.01$ and ### $p < 0.001$ versus time-matched MDMA 50 μ M.

Although the measure of the typical parameters indicative of nerve terminal injury did not show a significant effect of the applied treatment, this does not completely exclude minor disruptions or other consequences of MDMA exposure (Frenzilli et al., 2007; Wang et al., 2004). Such consequences probably exist in the present study as the treatment with MDMA is able to potentiate the astrogliosis and neurotoxic effects of KA 30 mg/kg. Anneken et al. (2013) concluded that, within the hippocampus, MDMA produces neuroinflammatory mediators and a subsequent increase in glutamate release. This assumption could explain the enhancement of KA-induced neurodegeneration obtained in our experiments.

Calcium binding proteins (CaBP) are expressed by distinct subsets of GABAergic interneurons in the hippocampus and they are crucial for calcium homeostasis in neurons. These include parvalbumin, calbindin-D28k and calretinin. In the present study, using immunohistochemistry for these three proteins, we compared the KA-associated changes in hippocampal regions with those induced by MDMA. Based on the MDMA effects described by Anneken and Gudelsky (Anneken and Gudelsky, 2012), we have limited the study to the hippocampus.

CaBP act as intracellular facilitators of calcium diffusion or as intracellular calcium buffering systems. Since an increase in intracellular calcium levels triggers molecular events related to neuronal degeneration, it has been suggested that CaBP protect against calcium overload, rendering neurons more resistant to various toxic insults and neurodegenerative diseases (Figueredo-Cardenas et al., 1998; Lukas and Jones, 1994; Tsuboi et al., 2000). However, the efficacy of reduced CaBPs as markers of neuronal death in the epileptic hippocampus has been challenged. In a study by Kim et al. (2006) the expression of CaBPs was reduced in the hippocampus in a stimulus-dependent manner following electroconvulsive shock, and recovered to the control level later. It was concluded that the reduced expression of CaBPs induced by seizure

activity may be indicative of the hyperactivity of CaBP-positive neurons, which is a practical consequence of the abnormal discharge, and that they may play an important role in regulating seizure activity.

Our results demonstrated an early decrease in the expression of these different molecular markers when animals were exposed to high epileptogenic doses of KA, and we have also shown that exposure of adolescent mice to recreational doses of MDMA produces a similar profile of CaBPs.

MDMA greatly reduced CB levels in hippocampal CA1 48 h post-administration. This robust reduction can be attributed also to the fact that serotonergic afferents from the median raphe nucleus, which are affected by MDMA (Sharkey et al., 1991), were shown to heavily innervate CB-containing GABAergic interneurons in the hippocampus (Freund et al., 1990). It is known that this amphetamine derivative generates an acute 5-HT release. Repeated MDMA exposure used in the present study tends to reduce, but not significantly, the density of 5-HT transporter in the hippocampus. Indeed, binge administration of MDMA can cause reductions in 5-HT without changing transporter levels (Wang et al., 2004). Therefore, can be assumed that the stimulation rate of postsynaptic 5-HT receptors changes after MDMA exposure. This could be the explanation to the changes of CB-containing interneurons detected early after MDMA, and also described by Gonçalves et al. (2010) after an acute high dose of methamphetamine. As expected, in general, this MDMA- and KA-induced decrease was reversed later. Similar results were obtained in the dentate gyrus.

CR immunoreactivity showed a similar profile to that of CB, with comparable effects in the K30 and MDMA groups 24 h after completing treatment.

Additionally, both treatments increased CR immunoreactivity of granule cells in the infragranular zone of DG, which are considered to be recently generated neurons (Liu et al., 1996). It is known that after KA-induced hippocampal damage, the number of CR immunoreactive

cells present in the subgranular layer increases significantly (Domínguez et al., 2003). These cells could represent a reservoir of pre-existing not completely differentiated granule cells. Surprisingly, MDMA exposure induced a similar intensification of this marker. This adds to the evidence of parallel effects of KA and the psychostimulant, which should not be surprising when one considers that this amphetamine derivative triggers glutamate release (Anneken and Gudelsky, 2012).

In the present study we also found that MDMA, in parallel with kainate, reduces the number of PV-positive neurons, especially in DG. This decrease was potentiated in the M + K20 group. The reduction in PV interneuron activity has been reported to be associated with an increase in the risk of epileptogenic processes, thus increasing the susceptibility to seizures (Sloviter et al., 2001).

Finally, another interesting outcome of our study is the evidence that in cultures of cortical neurons low concentrations of MDMA (10, 50 μM) increase basal intracellular calcium concentrations. Our data thus suggest that previous exposure to MDMA sensitizes neurons to maintain high intracellular levels of calcium and potentiates the glutamate agonist response to an acute challenge of NMDA. These *in vitro* results could contribute to explain the observed *in vivo* changes in CaBP density. The reduction in basal intracellular sodium concentrations could also have a role in destabilizing neuronal ionic homeostasis, enhancing the Na^+ response to a kainate challenge.

5. Conclusions

The results of the present study provide evidence that the schedule of MDMA used, by itself, does not induce neuronal damage but potentiates the presence of degenerating neurons in CA1 due to KA 30 mg/kg exposure, increasing seizure susceptibility in all KA treatments. The MDMA-induced decrease in CaBP immunoreactivity, especially in the PV-positive neurons, may affect the excitability of hippocampal networks. The proconvulsant effect of MDMA correlates with modifications in these hippocampal interneurons markers and, interestingly, run in parallel with the changes induced by KA. It can be speculated that these CaBP modifications could be the consequence of either a direct mechanism involving changes in calcium homeostasis or/and an indirect effect through glutamate release. Recently, it has been described that MDMA increases glutamate release in the dorsal hippocampus of rats (Anneken and Gudelsky, 2012), but our *in vitro* results point to changes in calcium homeostasis as an additional molecular event that can contribute also to these GABAergic modifications. The variation of the ionic balance observed in cortical cells after the incubation with MDMA could explain that the responses to the depolarizing stimuli have been altered. Probably other mechanisms such as free radical production or the modification on mossy fiber sprouting could also promote this convulsive susceptibility.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.06.007>.

Financial support

Sonia Abad received a fellowship from the Institut de Biomedicina (IBUB, University of Barcelona). Funding for this study was provided by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2010-15948; SAF2011-23631 and SAF2012-39852-C02-01) and by the Generalitat de Catalunya.

Authorship contributions

CA and EE were responsible for the study concept and design. AS carried out the experimental work. CJ, EE and PD assisted with data analysis and AC with immunoassays methodology. EE drafted the manuscript, CA and JF assisted with interpretation of findings. AC, PD and PM provided critical revision of the manuscript for important intellectual content.

All authors critically reviewed content and approved final version for publication.

Conflict of interest statement

The authors disclose any potential conflict of interest including financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence the present work.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Language Advisory Service of the University of Barcelona for editing the language of the manuscript.

References

- Anneken JH, Gudelsky GA. MDMA produces a delayed and sustained increase in the extracellular concentration of glutamate in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2012;63:1022–7.
- Anneken JH, Cunningham JI, Collins SA, Yamamoto BK, Gudelsky GA. MDMA increases glutamate release and reduces parvalbumin-positive GABAergic cells in the dorsal hippocampus of the rat: role of cyclooxygenase. *J Neuroimmune Pharmacol* 2013;8:58–65.
- Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 1992;15:303–8.
- Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 2000;23:580–7.
- Benkovic SA, O'Callaghan JP, Miller DB. Regional neuropathology following kainic acid intoxication in adult and aged C57BL/6J mice. *Brain Res* 2006;1070:215–31.
- Brown JW, Dunne JW, Fatovich DM, Fatovich DM, Lee J, Lawn ND. Amphetamine-associated seizures: clinical features and prognosis. *Epilepsia* 2011;52:401–4.
- Cano-Abad MF, Villarroya M, García AG, Gabilan NH, López MG. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J Biol Chem* 2001;276:39695–704.
- Capela JP, Ruscher K, Lautenschlager M, Freyer D, Dirnagl U, Gaio AR, et al. Ecstasy-induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin 2A-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia. *Neuroscience* 2006;139:1069–81.
- Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ. Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience* 2004;126:677–88.
- Chipana C, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E. Protection against MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in mice by methyllycaconitine: involvement of nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 2006;51:885–95.
- Colado MI, Camarero J, Mechan AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, Green AR. A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurons in mouse brain. *Br J Pharmacol* 2001;134:1711–23.
- Crespo-Biel N, Camins A, Gutiérrez-Cuesta J, Melchiorri D, Nicoletti F, Pallàs M, et al. Regulation of GSK-3 β by calpain in the 3-nitropropionic acid model. *Hippocampus* 2010;20:962–70.
- Cuyas E, Robledo P, Pizarro N, Farré M, Puerta E, Aguirre N, et al. 3,4-methylenedioxymethamphetamine induces gene expression changes in rats related to serotonergic and dopaminergic systems, but not to neurotoxicity. *Neurotox Res* 2014;25:161–9.
- Domínguez MI, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ. Calretinin/PSA-NCAM immunoreactive granule cells after hippocampal damage produced by kainic acid and DEDTC treatment in mouse. *Brain Res* 2003;966:206–17.
- Escubedo E, Chipana C, Pérez-Sánchez M, Camarasa J, Pubill D. Methyllycaconitine prevents methamphetamine-induced effects in mouse striatum: involvement of $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;315:658–67.
- Esteban B, O'Shea E, Camarero J, Sanchez V, Green AR, Colado MI. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;154:251–60.
- Figueredo-Cardenas G, Harris CL, Anderson KD, Reiner A. Relative resistance of striatal neurons containing calbindin or parvalbumin to quinolinic acid-mediated excitotoxicity compared to other striatal neuron types. *Exp Neurol* 1998;149:356–72.
- Frenzilli G, Ferrucci M, Giorgi FS, Blandini F, Nigro M, Ruggieri S, et al. DNA fragmentation and oxidative stress in the hippocampal formation: a bridge between 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) intake and long-lasting behavioral alterations. *Behav Pharmacol* 2007;18:471–81.
- Freund TF, Gulyás AI, Acsády L, Görcs T, Tóth K. Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:8501–5.
- García-Ratés S, Camarasa J, Sánchez-García AI, Gandía L, Escubedo E, Pubill D. The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on nicotinic receptors: intracellular calcium increase, calpain/caspase 3 activation, and functional upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;244:344–53.
- Giorgi FS, Pizzanelli C, Ferrucci M, Lazzeri G, Faetti M, Giusiani M, et al. Previous exposure to (+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine produces long-lasting alteration in limbic brain excitability measured by electroencephalogram spectrum analysis, brain metabolism and seizure susceptibility. *Neuroscience* 2005;136:43–53.

- Giorgi FS, Lazerri G, Natale G, Iudice A, Ruggieri S, Paparelli A, et al. MDMA and seizures: a dangerous liaison? *Ann N Y Acad Sci* 2006;1074:357–64.
- Gonçalves J, Baptista S, Martins T, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, et al. Methamphetamine-induced neuroinflammation and neuronal dysfunction in the mice hippocampus: preventive effect of indomethacin. *Eur J Neurosci* 2010;31:315–26.
- Gulyás AI, Hájos N, Freund TF. Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 1996;16:3397–411.
- Green AR, Mehan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* 2003;55:463–508.
- Hammersley R, Ditton J, Smith I, Short E. Patterns of ecstasy use by drug users. *Br J Criminol* 1999;39:625–47.
- Holmes SB, Banerjee AK, Alexander WD. Hyponatraemia and seizures after ecstasy use. *Postgrad Med J* 1999;75:32–3.
- Junyent F, De Lemos L, Utrera J, Paco S, Aguado F, Camins A, et al. Content and traffic of taurine in hippocampal reactive astrocytes. *Hippocampus* 2011a;21:185–97.
- Junyent F, Porquet D, de Lemos L, Romero R, Utrera J, Camins A, et al. Decrease of calbindin-d28k, calretinin, and parvalbumin by taurine treatment does not induce a major susceptibility to kainic acid. *J Neurosci Res* 2011b;89:1043–51.
- Kim J-E, Kwak S-E, Kim D-S, Won MH, Kwon O-S, Choi S-Y, et al. Reduced calcium binding protein immunoreactivity induced by electroconvulsive shock indicates neuronal hyperactivity, not neuronal death or deactivation. *Neuroscience* 2006;137:317–26.
- Kondratyev A, Gale K. Latency to onset of status epilepticus determines molecular mechanisms of seizure-induced cell death. *Brain Res Mol Brain Res* 2004;121:86–94.
- Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* 2002;50:93–103.
- Liu Y, Fujise N, Kosaka T. Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus. I. General description. *Exp Brain Res Exp Hirnforsch Exp Céréb* 1996;108:389–403.
- Logan BJ, Laverty R, Sanderson WD, Yee YB. Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethylamphetamine) neurotoxicity. *Eur J Pharmacol* 1988;152:227–34.
- Lothman EW, Collins RC, Ferrendelli JA. Kainic acid-induced limbic seizures: electrophysiological studies. *Neurology* 1981;31:806–12.
- Lukas W, Jones KA. Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience* 1994;61:307–16.
- McNamara JO. The neurobiological basis of epilepsy. *Trends Neurosci* 1992;15:357–9.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology. *J Nutr* 2000;130:1007S–15S.
- Meyer FB. Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Res Rev* 1989;14:227–43.
- Meyer JS, Piper BJ, Vancollie VE. Development and characterization of a novel animal model of intermittent MDMA ("Ecstasy") exposure during adolescence. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1139:151–63.
- Niquet J, Ben-Ari Y, Represa A. Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells. *J Neurocytol* 1994;23:641–56.
- O'Callaghan JP, Miller DB. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6 J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:741–51.
- O'Shea E, Orio L, Escobedo I, Sanchez V, Camarero J, Green AR, et al. MDMA-induced neurotoxicity: long-term effects on 5-HT biosynthesis and the influence of ambient temperature. *Br J Pharmacol* 2006;148:778–85.
- Orio L, O'Shea E, Sanchez V, Pradillo JM, Escobedo I, Camarero J, et al. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J Neurochem* 2004;89:1445–53.
- Penkowa M, Molinero A, Carrasco J, Hidalgo J. Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. *Neuroscience* 2001;102:805–18.
- Pernot F, Heinrich C, Barbier L, Peinnequin A, Carpentier P, Dhote F, et al. Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2011;52:2315–25.
- Pubill D, Canudas AM, Pallàs M, Camins A, Camarasa J, Escubedo E. Different glial response to methamphetamine- and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003;367:490–9.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972;32:281–94.
- Ravizza T, Rizzi M, Perego C, Richichi C, Velísková J, Moshé SL, et al. Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia* 2005;46(Suppl. 5):113–7.
- Represa A, Niquet J, Pollard H, Ben-Ari Y. Cell death, gliosis, and synaptic remodeling in the hippocampus of epileptic rats. *J Neurobiol* 1995;26:413–25.
- Sanchez V, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI, Green AR. Effect of repeated ("binge") dosing of MDMA to rats housed at normal and high temperature on neurotoxic damage to cerebral 5-HT and dopamine neurones. *J Psychopharmacol* 2004;18:412–6.
- Santos JB, Schauwecker PE. Protection provided by cyclosporin A against excitotoxic neuronal death is genotype dependent. *Epilepsia* 2003;44:995–1002.
- Sharkey J, McBean DE, Kelly PA. Alterations in hippocampal function following repeated exposure to the amphetamine derivative methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)* 1991;105:113–8.
- Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD, Menkens KA. Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *J Comp Neurol* 2001;430:283–305.
- Smith RF. Animal models of periadolescent substance abuse. *Neurotoxicol Teratol* 2003;25:291–301.
- Sonn K, Pankratova S, Korshunova I, Zharkovskiy A, Bock E, Berezin V, et al. A metallothionein mimetic peptide protects neurons against kainic acid-induced excitotoxicity. *J Neurosci Res* 2010;88:1074–82.
- Spanos IJ, Yamamoto BK. Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-)MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;32:835–40.
- Tsuboi K, Kimber TA, Shults CW. Calretinin-containing axons and neurons are resistant to an intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion. *Brain Res* 2000;866:55–64.
- Wang X, Baumann MH, Xu H, Rothman RB. 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration to rats decreases brain tissue serotonin but not serotonin transporter protein and glial fibrillary acidic protein. *Synapse* 2004;53:240–8.
- Zagnoni PG, Albano C. Psychostimulants and epilepsy. *Epilepsia* 2002;43(Suppl. 2):28–31.

3.4 Publicació 4

Adolescent exposure to MDMA induces dopaminergic toxicity in substantia nigra and potentiates the amyloid plaque deposition in the striatum of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice

Sonia Abad, Carla Ramon, David Pubill, Jorge Camarasa, Antonio Camins, Elena Escubedo. *Sent to: BBA Molecular Basis of the Disease. Under revision*

L'MDMA és una de les substàncies d'abús més populars entre els joves adolescents, i encara que no presenti toxicitat directa sobre els terminals dopaminèrgics en humans, s'han notificat casos de problemes psicomotors en una part dels consumidors.

La malaltia d'Alzheimer (AD) és la malaltia neurodegenerativa més comuna en la població anciana, on entre el 35-40% dels malalts presenten signes extrapiramidals resultat d'alteracions en la via nigroestriatal, l'aparició dels quals s'ha relacionat amb un pitjor pronòstic de la malaltia.

L'*objectiu* de l'estudi va ser determinar si una exposició repetida a l'MDMA durant l'adolescència podria afavorir una disfuncionalitat nigroestriatal en l'edat adulta en subjectes amb predisposició genètica a la AD, donant lloc a un pitjor pronòstic .

Per dur a terme el nostre objectiu es van utilitzar els animals doble transgènics APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1), els quals estan establerts com a model de la AD, a més de presentar alteracions en la via nigroestriatal. Per tal de valorar si el nostre tractament podia accelerar o potenciar aquesta disfuncionalitat dopaminèrgica en aquests animals, es van elegir dos temps de sacrifici després del tractament: dos setmanes (tres mesos d'edat) o tres mesos després (sis mesos d'edat).

Durant el transcurs de l'estudi, vam observar diferències entre genotips que cal tenir en compte, ja que podrien emmascarar o modular els efectes de l'MDMA. Als sis mesos, els animals APP/PS1 van exhibir alteracions dopaminèrgiques estriatals, com un increment en els nivells de dopamina (DA), Tirosina Hidroxilasa (TH) i estrès oxidatiu, així com una disminució en els nivells de MAO-A i en el transportador de DA (DAT).

L'administració repetida del derivat amfetamínic va causar una disminució del número de neurones dopaminèrgiques en substància nigra (SN), independentment del genotip, que va ser persistent almenys tres mesos després del tractament. A nivell d'estriat, l'MDMA va causar una aparent depleció dels nivells de DA en els animals wild-type (WT), la qual es correlacionaria amb la disminució de l'activitat locomotora observada, mentre que els nivells de TH i DAT no es van veure modificats. En canvi, en els animals APP/PS1 el tractament no va afectar ni el neurotransmissor DA ni l'activitat locomotora, però va produir una disminució en els nivells de DAT i un augment superior en la peroxidació lipídica. Tres mesos després els efectes del tractament van desaparèixer. D'altra banda, el resultat més important de l'estudi va ser la potenciació de la deposició de les plaques β -amiloides ($A\beta$) en estriat per part del tractament amb MDMA.

En *conclusió*, l'MDMA indueix una pèrdua neuronal en SN que no depèn del genotip. En els animals APP/PS1, malgrat que l'MDMA no produeix canvis en els nivells de DA, la disminució del DAT i l'increment de 4-HNE en estriat suggereixen una lesió superior. El tractament amb el derivat amfetamínic potencia l'aparició de plaques $A\beta$.

Adolescent exposure to MDMA induces dopaminergic toxicity in substantia nigra and potentiates the amyloid plaque deposition in the striatum of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice

Abad, Sonia¹; Ramon, Carla¹; Pubill, David¹; Camarasa, Jorge¹; Camins, Antonio^{1,2✉}; Escubedo, Elena¹

¹ Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutic Chemistry (Pharmacology Section) and Biomedicine Institute, University of Barcelona (IBUB)

² Networking Research Center on Neurodegenerative Diseases (CIBERNED). Instituto de Salud Carlos III, Spain

* Author for correspondence: Antonio Camins

Department of Pharmacology and Therapeutic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona. Avda. Joan XXIII s/n. Barcelona 08028, Spain.

Tel: +34-934024531

Fax: +34-934035982

E-mail: camins@ub.edu

Running title: MDMA potentiates plaque deposition in the striatum of APP^{swe}/PS1^{dE9} mice

Abstract

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is one of the most used drugs by adolescents whereas Alzheimer disease (AD) is the main cause of dementia in the elderly, thus both issues are of great interest for public health. Many patients of AD have predisposition to suffer nigrostriatal alterations, therefore individuals with this pathology develop extrapyramidal symptoms. Some authors described that early exposure to MDMA may render the dopaminergic neurons more vulnerable to the effects of future neurotoxic insults. The aim of the present study was to elucidate whether in APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1), a mouse model of familial AD (FAD), adolescent exposure to MDMA might later produce a nigrostriatal dysfunction on adulthood. We used a MDMA schedule aiming to simulate the typical weekend binge abuse of this substance. Our MDMA schedule produced a genotype-independent decrease in dopaminergic neurons in the substantia nigra that remained at least 3 months. Shortly after the injury, APP/PS1 mice did not show the typical acute striatal dopamine reduction produced by binge MDMA, although we suggest that the drug-induced damage is more severe in this group, since dopamine transporter (DAT) levels were recovering more slowly and they showed higher levels of oxidative stress and a changed trend in dopamine turnover. We found that these disturbances are age-related characteristics that this special genotype develops spontaneously much later. Therefore, MDMA administration seems to accelerate the appearance of the striatal dopaminergic dysfunction in this FAD model. The most important outcome lies in a potentiation, by MDMA, of the amyloid beta deposition in the striatum.

Keywords

3,4-Methylenedioxymethamphetamine, APP^{swe}/PS1^{dE9} mice, striatum, dopaminergic dysfunction, amyloid plaques.

1. Introduction

Both the recreational use of drugs and neurodegenerative diseases still represent a big challenge for public health. Usually, drugs are consumed by adolescents and young people in a recreational context. It is also during the adolescence when the brains are suffering many transformation to achieve the necessary maturation [1], thus the impact of the drugs in this period might have negative consequences in the adulthood. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), also known as ecstasy, is one of the most consumed amphetamine derivative drugs due to its stimulant and mild hallucinogenic properties. It acts mainly on the monoaminergic system in the central nervous system (CNS) by stimulating the release of serotonin, norepinephrine and dopamine (DA) from the mesocorticolimbic and nigrostriatal systems. This drug can also act as an agonist on central 5-HT receptors and inhibit monoamine oxidase [2,3]. In mice, MDMA is considered a relatively selective dopaminergic neurotoxin, leading to a decrease in the concentration of DA and its main metabolites [4]. One of the most robust evidences by which MDMA causes long-term toxicity is through oxidative stress [5,6] that, in turn, is a common feature of different neurodegenerative diseases [7–9].

Nowadays, Alzheimer Disease (AD) is the most common cause of dementia in the elderly. One of the neuropathological hallmarks of the AD is the presence of extracellular amyloid plaques, mostly composed of amyloid- β (A β) peptides, derived from sequential cleavage of amyloid- β protein precursor (APP) [10,11]. Additionally, Horvath et al., (2014) [12] reported loss of neurons in the substantia nigra (SN) and in the putamen, suggesting pre- and postsynaptic lesions of the nigrostriatal pathway in AD patients. As a consequence, many patients of Alzheimer's disease develop extrapyramidal symptoms throughout the disease. This concomitant parkinsonian syndrome contributes to a worse prognosis of the disease [13,14].

A number of research efforts have been focused on demonstrating the possible relationship between MDMA consumption and dopaminergic neurodegeneration [15,16]. The effects elicited by MPTP in motor brain areas (SN pars compacta (SNc) and striatum) have been shown to be more marked in adult mice treated with MDMA during adolescence [17,18], suggesting that early exposure to MDMA may render the dopaminergic neurons more vulnerable to the detrimental effects of further neurotoxic insults. Furthermore, it is also well established that MDMA might produce cognitive deficits [19–23] although they only can be evidenced in certain paradigms. However, no studies have been performed to investigate whether a prolonged consumption of MDMA might increase the development of dopaminergic dysfunctions in a model of AD. Therefore, we studied the effect of this amphetamine in the SN but also focused in the striatum of a murine model of AD. We used double transgenic mice APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1), which is a well-established transgenic animal model of FAD. These mice secrete elevated amounts of human A β peptide, inducing an age-dependent amyloid plaque deposition in the brain [24–26]. Perez et al., (2005) [27] investigated a possible dopaminergic nigrostriatal dysfunction in the brains of 3- to 17-month-old APP/PS1 mice, and reported some alterations in the nigrostriatal pathway closely related with amyloid deposition.

Hence, the aim of the present study was to elucidate whether prolonged and intermittent exposition to MDMA during adolescence was able to produce such dopaminergic alteration, which might trigger a nigrostriatal dysfunction in this model of FAD. To carry out the study we used a regimen of MDMA that differed from the

classic short but intensely neurotoxic exposure, with the intention to model, in adolescent mice, the classical binge use of this substance during the weekends. We chose two time points to sacrifice the animals and investigate whether the treatment might accelerate or potentiate the nigrostriatal dysfunction in this model.

Our findings suggest that, in APP/PS1 mice, MDMA does not produce all the typical signs of striatal dopaminergic toxicity but seems to accelerate the ulterior nigrostriatal dysfunction that these transgenic mice develop. Moreover, MDMA induced a significant neuronal loss in SN in both strains and, importantly, potentiated A β deposition in the striatum.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Adolescent male APP^{swe}/PS1^{dE9} and C57BL/6 mice (4-5 weeks old) were used in this study. These transgenic animals co-express a Swedish (K594M/N595L) mutation of a chimeric mouse/human APP (Mo/HuAPP695^{swe}), together with the human exon-9-deleted variant of PS1 (PS1-dE9). The animals were kept under controlled temperature, humidity and light conditions with food and water provided ad libitum. Mice were treated in accordance with the European Community Council Directive 86/609/EEC and the procedures established by the Department d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the Generalitat de Catalunya. Efforts were made to reduce the number of animals used. MDMA was provided by the National Health Laboratory (Barcelona, Spain).

2.2. Drug treatment

MDMA or saline were administered according to the treatment schedule displayed in Fig. 1. To model the pattern of weekend consumption of this substance in adolescents, we used intermittent and repeated MDMA administration, given as binges mimicking the widespread practice of “boosting”. Animals received 3 doses in one day, every 3 hours, once per week for 8 weeks. The doses increased along the treatment as described elsewhere [19]. Taking into account that the neurotoxic regimen in mice is 25 mg/kg three times in one day [28], the maximum doses given in our study was 10 mg/kg. Drug administration was carried out at high ambient temperature, thus simulating the hot environments in which this substance tends to be consumed (i.e. dance clubs, raves). Mice were killed at 2 different points after the treatment: 2 weeks (3 months old, young adults; n= 59) or 3 months later (6 months old, mature adults; n= 68). The treatment groups were: Wild-type/Saline/ (WT Saline), Wild-type/MDMA (WT MDMA), APP^{swe}/PS1^{dE9}/Saline (APP Saline), APP^{swe}/PS1^{dE9}/MDMA (APP MDMA).

2.3. Open Field Test (OF)

One week before the sacrifice, animals were monitored for 10 min in a circular arena of 40 cm of diameter. The locomotor activities were recorded and expressed as total distance travelled and average speed (Smart 3, Panlab SL, Barcelona, Spain).

2.4. Measurement of neurotransmitter levels

In the experiments aiming at analyzing neurotransmitter levels, mice were killed by cervical dislocation followed by decapitation, the brains rapidly removed and striata were dissected out on ice. Samples were prepared by sonication in 10 volumes of 0.1 M perchloric acid, centrifuged for 30 min at $12,000 \times g$ after which 40 μ l of filtered supernatant was injected into an HPLC system equipped with a Waters 2465 electrochemical detector set to a potential +0.70 V, column oven and a column Nova Pack C18 4 μ m 3.90 x 150 mm (Waters, Milford, MA). The mobile phase consisted of purified water with 10% methanol, 1.92 mM 1-octanesulfonic acid, 0.1 mM EDTA and 10 mM phosphoric acid. Column temperature was set at 37 °C and the flow rate to 1 ml/min. The retention times for NE, DOPAC, 5-HIAA, DA, HVA and 5-HT were 2.74, 4.46, 6.95, 8.13, 11.24 and 20.66 min, respectively.

2.5. Immunofluorescence and thioflavine S staining

Mice were anaesthetized by i.p. injection of ketamine (100 mg/kg) plus xylazine (10 mg/kg) and perfused with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, after which the brains were removed. Coronal sections of 30 μ m were obtained and incubated with primary antibody against tyrosine hydroxylase (TH) (1:200; BD Biosciences). Immunofluorescence procedure was carried out as described elsewhere [29]. For Thioflavine S staining, free-floating sections were rinsed three times in 0.1 M PBS for 5 minutes each. Afterwards, the sections were incubated with 0.3% Thioflavine S (Sigma-Aldrich) for 8 min at room temperature in the dark, and washed twice with 50% ethanol, for 1 minute. Finally, the slices were mounted on glass slides using Fluoromount (EMS). Image acquisition was performed with a fluorescence laser microscope (BX41, Olympus, Germany). To quantify the total number of TH-positive neurons in the SN, an unbiased counting frame was positioned on each photomicrograph taken at a magnification of 10 x, according to the atlas of Paxinos and Franklin [30]. TH-neurons were counted in both hemispheres using the Image J software and the density (cells/area) was calculated in relation to the area delimited by the frame.

2.6. Tissue Sample Preparation

The striatum was quickly dissected out, frozen and stored at -80 °C until use. When required, tissue samples were thawed and homogenized at 4 °C in lysis buffer (Tris-HCl 20mM, NaCl 137 mM, Nonidet P40 1%, EDTA 2mM, 4.5 μ g/ μ l aprotinin, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium orthovanadate), followed by mixing in an orbital shaker for 2 h at 4 °C. The samples were then centrifuged at $15000 \times g$ for 30 min. The supernatant was recovered and protein content was determined using the Bio-Rad Protein Reagent.

2.7. Western blotting and immunodetection

A Western blotting (WB) and immunodetection protocol was used to determine the proteins levels as described [19]. Primary antibodies are detailed in Table 1. All results are normalized to GAPDH or Actine, unless otherwise stated.

2.8. Statistical analysis

Two- or three-way ANOVA (InvivoStat software) was used when two (genotype and treatment) or three (plus time) variables were studied together. When the statistic value (F) was not significant, it was omitted in order to simplify reading the text. In all cases, post-hoc Turkey tests were performed to compare the treated groups

versus their controls. All data are presented as means \pm SEM, and the p values less than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. MDMA decreases the number of TH-positive neurons in the SN

To determine whether the regimen of MDMA used in this study affected the dopaminergic neurons in the SN, TH immunofluorescence was performed. This quantification allows determining whether the MDMA treatment led to a loss of neuronal bodies. Representative images of TH immunostaining in the coronal section of the brain of saline and MDMA-treated wild-type and mutant mice are presented in Figure 2.

2 weeks after the treatment, two-way ANOVA showed a significant effect of the variable treatment ($F_{1,15}=16.53$, $p=0.001$). We observed that MDMA induced a decrease in the number of TH-positive neurons, which was similar in both strains (WT MDMA 23%; APP MDMA 32%, versus the corresponding saline group). This effect of MDMA was still present and statistically significant 3 months later (Fig. 2B; two-way ANOVA, effect of treatment: $F_{1,14}=16.60$, $p=0.001$). Interestingly, at this time, genotype affected almost significantly the number of dopamine neurons in this area ($p=0.06$). This suggests that in mature adult transgenic mice there is a tendency to reduce the number of dopaminergic neurons in the SN.

3.2. Open Field Test

Short-term effects

Explorative behavior was assessed individually in the open field for 10 min one week after the treatment. Two-way ANOVA showed a significant effect of genotype ($F_{1,54} = 9.043$, $p<0.01$ distance; $F_{1,54} = 4.590$, $p<0.05$ speed) and treatment ($F_{1,54} = 5.651$, $p<0.05$ distance; $F_{1,54} = 7.584$, $p<0.01$ speed) for both parameters. Transgenic mice exhibited hyperactive behavior. Post-hoc analyses showed statistical significance of the lower rates of traveled distance and speed exhibited by the WT MDMA group, compared to their matching controls. Although APP/PS1 mice exposed to MDMA also showed a reduction in their locomotor activity, this decline did not reach statistical significance (Table 2).

Long-term effects

When the test was applied at the age of 6 months, two-way ANOVA analysis of overall activity indicated a significant effect of genotype ($F_{1,65} = 12.74$ $p<0.001$ distance; $F_{1,65} = 12.46$ $p<0.001$ speed). Table 3 shows the values of distance traveled and speed. Transgenic mice exhibited higher total activity than WT mice, but no differences were found between saline- and MDMA-treated animals of the same genotype

3.3. Dopaminergic parameters and oxidative stress in striatum

3.3.1. Neurotransmitter levels

Short-term effects

This approach has been widely used to characterize the MDMA-induced lesion [4,28]. Results are shown in table 4. The statistical analysis of DA and DOPAC levels did not reach significance due to the great deviations in the

APP Saline group. However, continued exposure to MDMA in WT animals brought to an apparent decrease of striatal DA levels (41%) and its main metabolite, DOPAC (37%). We can note that levels of 5HIAA declined significantly in WT MDMA group (two-way ANOVA, variable treatment, $F_{1,15} = 7.69, p < 0.05$).

In transgenic mice, results showed that MDMA, despite provoking a TH reduction in the SN, did not produce any change in DA levels compared with their matching controls, but reversed the trend of its turnover, estimated by the ratio of brain tissue levels of DOPAC over DA.

Long-Term effects

Brain monoamine levels are listed in Table 5. Results from two-way ANOVA revealed a significant effect of genotype ($F_{1,21} = 6.199, p < 0.051$) in DA as well as in its turnover ($F_{1,21} = 11.93, p < 0.01$). The APP/PS1 mice exhibited increased DA levels versus WT animals, whereas DOPAC levels and the DA turnover were decreased, pointing to a dysregulation in the DA system. MDMA exposure accentuated the decrease in DA turnover in double transgenic mice. By contrast, neurotransmitter levels were recovered in the MDMA-exposed WT animals after 3 months of withdrawal.

3.3.2. MAO-A and MAO-B expression

Short-Term effects

Both monoamine oxidases, MAO-A and MAO-B, are enzymes that catalyze the oxidation of monoamines. To evaluate whether MDMA may affect the DA metabolism in APP/PS1 mice differently than in WT, we determined the expression of these enzymes. No differences were found in the expression of MAO-A, but the exposure to MDMA produced a decrease in the expression of MAO-B in APP/PS1 mice (two-way ANOVA: $F_{1,9} = 5.146, p < 0.05$), which might be responsible for the changes in DA turnover detected in this group (Figure 3 A, B)

Long-term effects

Results of MAO-A expression at 6 month-old showed a very significant effect of genotype ($F_{1,10} = 18.61, p = 0.001$). The double transgenic mice exhibited a reduction of 40% in MAO-A expression. In this sense, the exposure to MDMA contributed to these low values. No differences were observed in MAO-B expression (Figure 3 C, D).

3.3.3. TH and DAT expression

Short-term effects

To assess whether MDMA exposure caused any alteration in striatal dopaminergic terminals, TH and DAT, two of the main dopaminergic markers, were determined by WB. Results of TH did not show any significant difference between groups. Therefore, the reduction of TH induced by MDMA in SN is not accompanied by a decrease of TH in the striatum. However, when statistics were applied to DAT results, it revealed a significant effect of treatment on DAT expression ($F_{1,16} = 8.91, p < 0.01$), especially evident in APP MDMA group (Figure 4 A,B).

Long-Term effects

3 months after the end of the treatment, TH protein was increased in the APP/PS1 strain (genotype: $F_{1,15} = 17.17$, $p < 0.001$). Conversely, the double transgenic mice evidenced a decrease in DAT expression (genotype: $F_{1,13} = 6.21$, $p < 0.05$) (Figure 4 C,D).

3.3.4. Mitochondria and oxidative stress

As mentioned above, one of the mechanisms whereby MDMA produces neurotoxicity is through the production of reactive oxygen species (ROS). Thus we further investigated the role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha (PGC-1 α), since it has been described that PGC-1 α is a broad and powerful regulator of ROS metabolism, coordinating the expression of several genes coding for antioxidant enzymes [31].

Short-term effects

We investigated whether our treatment modified PGC-1 α expression, as well as it produced any alterations in lipid peroxidation. Two-way ANOVA evidenced a significant effect of genotype ($F_{1,9} = 7.20$, $p < 0.05$) and the interaction genotype x treatment ($F_{1,9} = 9.64$, $p < 0.05$). Particularly, the exposure to MDMA, had opposite effects in both genotypes, increasing PGC-1 α expression in double transgenic animals and lowering it in WT (Figure 5 A).

4-Hydroxynonenal (4-HNE) is a chemotactic aldehydic end-product of lipid peroxidation playing a role in the harmful effects of oxidative stress. Two-way ANOVA demonstrated a significant effect of genotype ($F_{1,9} = 15.28$, $p < 0.01$), treatment ($F_{1,9} = 36.40$, $p < 0.001$), and interaction genotype x treatment ($F_{1,9} = 7.87$, $p < 0.05$). Namely, MDMA treatment produced a significant increase in 4-HNE in both phenotypes, which was much larger in double transgenic animals (Figure 5 B).

Long-Term effects

Regarding PGC-1 α , statistical analysis exhibited a significant effect of treatment ($F_{1,10} = 6.66$, $p < 0.05$), displaying a lasting effect over this master regulator of mitochondria (Figure 5 C).

We further examined the 4-HNE expression and results from two-way ANOVA indicated a significant effect of the interaction genotype x treatment ($F_{1,11} = 41.36$, $p < 0.001$). APP/PS1 mice showed higher levels of 4-HNE than those of WT. The WT MDMA mice still had significantly increased 4-HNE levels, suggesting a persistent oxidative stress effect whereas, surprisingly, transgenic mice exposed to MDMA did showed a slight decrease in this product (Figure 5 D).

3.4. Plaque deposition in the striatum of APP/PS1 mice.

To quantify the plaque deposition, Thioflavine S staining was performed. Amyloid plaques were only detected in the striatum of double transgenic mice aged 6 months. Therefore the results were analyzed using Student's t-test. Interestingly, the exposure of APP/PS1 mice to the amphetamine derivative exacerbated the deposition of A β in the striatum of these animals, leading to a very significant increase in the number of plaques ($p < 0.01$) (Figure 6).

3.5. Age-related differences in explorative behavior and striatal neurochemistry between wild-type and APP/PS1 animals.

Throughout the experimental process, we observed several differences in the explorative behavior and striatal neurochemistry between both genotypes. Given the novelty that this point shows, we decided to plot together the values of these parameters at both time periods in order to better appreciate the different evolution of both genotypes with age, and to carry out a statistical analysis by means of a three-way ANOVA (variables: genotype, treatment and age).

3.5.1. Open Field Test

Results showed a significant effect of genotype in both, traveled distance ($F_{1,120}=18.99$, $p<0.001$) and speed ($F_{1,120}=18.73$, $p<0.001$). Taking only the groups WT Saline and APP Saline, post-hoc analysis evidenced in both ages, (3 and 6 months old), a significantly higher locomotor activity and speed in the APP/PS1 mice compared to WT (Figure 7).

3.5.2. Neurotransmitters levels

Likewise than in open field test, APP/PS1 mice revealed progressive changes in neurochemical parameters, especially in dopaminergic neurochemistry. Three-way ANOVA showed a significant effect of genotype in DA levels ($F_{1,32}=6.17$, $p<0.05$) and DA turnover ($F_{1,32}=4.71$ $p<0.05$). The post-hoc analysis indicated that the evolution of both parameters depends on the genotype. Thus, the APP/PS1 mice showed an increase in DA levels versus their WT while had a decrease in DA turnover. Regarding noradrenaline, APP/PS1 also showed increasing levels with ageing, as occurred with DA, although did not reach statistical significance (Figure 8).

4. Discussion

Insults in the early-life may contribute to the development of some neurodegenerative diseases in the adulthood. Processes like myelination and connectivity continue from pre-natal days to late adolescence. Therefore several insults during this period could interfere with brain development, but the consequences might not be evidenced until much later. Previous studies suggested that MDMA may constitute a risk factor for dopaminergic neuron degeneration [17,32]. Here, we investigated whether chronic administration of MDMA in mice during adolescence could predispose to the appearance or acceleration of nigrostriatal dysfunction in APP^{swe}/PS1^{dE9}, a model of FAD.

Apart from the effects of MDMA, we found differences in behavior and striatal neurochemistry between both genotypes. Hence, we considered worthy paying attention to such differences, since they might probably modulate the response to MDMA.

Although locomotor activity tended to decline with age in both genotypes, young and mature transgenic adults showed higher locomotor activity than the wild-type, a feature that was also described by Maroof et al., (2014) [33]. Also, WT animals displayed a slight reduction of DA levels with age, yet the turnover of this neurotransmitter was increased. Nevertheless, in APP/PS1 mice the time-course of both parameters was the opposite. Probably, this may be due to increasing levels of TH and a decrease in DAT and MAO-A expression observed in striatum at 6 months old. Furthermore, as expected, the mature adult transgenic mice showed higher

levels of lipid peroxidation. Perez et al. (2005) [27] already reported alterations in the nigrostriatal pathway in these mice consisting in an age-dependent increase in TH immunoreactivity in SN and a significant reduction in the levels of DOPAC in the striatum, only from age 10-month onwards. However, in their study the animals did not show any changes in striatal DA levels. This discrepancy with our results might be due to the fact that we compared animals aged 3 and 6 months; whereas in the study by Perez et al. [27] these ages were put in the same group, so that any change between 3 and 6 months was unnoticed.

This is the first time that an experimental model of Alzheimer's disease has been used to study the consequences of exposure to MDMA. As the goal of the study was to describe the effects of MDMA in the nigrostriatal pathway in an AD model, we did not focus on the memory alterations that this strain may show. We aimed to simulate the typical pattern of consumption of MDMA in adolescents by using a dosage schedule that modeled the recreational use of the drug and we chose 2 time points to evaluate parameters. The first check point was 15 days after the last dose, when the most important effects of MDMA (1-7 days) have already ceased and brain recovers from the homeostatic changes, leaving only the most persistent changes [17,32]. The other check point was 3 months after the end of treatment, when the mice were 6-months-old. At that age, the APP/PS1 animals show amyloid plaques in several areas of the CNS but their number could yet greatly increase after insults such as exposure to MDMA. Although MDMA is one of the most studied recreational drugs, one of the special features of this work is that we studied the effects 3 months after ending the treatment.

Our treatment produced an initial reduction in the number of dopaminergic neurons in SN. Under our drug schedule, the highest dose used was notably lower than the dose established as toxic [28], therefore repeated binge exposure is essential for the neurotoxic effect. Our results are in agreement with reported dopaminergic degeneration in SN after sporadic and prolonged exposure to MDMA [17]. This reduction is still present at 6 months-old, suggesting either an irreversible lesion or that recovery takes more than 3 months. This reduction in nigrostriatal functionality would hasten the onset of extrapyramidal symptoms that are not apparent until a threshold loss has occurred.

4.1. Dopaminergic parameters and oxidative stress in striatum

4.1.1. Short-term effects of MDMA

In the open field test, the amphetamine derivative significantly reduced locomotor activity in mice. This result is in line with the observed loss of dopaminergic neurons in SN. In the WT group this result is also consistent with the apparent depletion of DA and its main metabolite DOPAC in the striatum, without changing the DA turnover. TH and DAT levels are commonly used as markers of DA neurons. Mice exposed to a binge regimen of MDMA might show a decrease in striatal TH expression and DA reuptake sites [6], depending on the MDMA schedule and time after treatment [4,32]. In our study, exposure to the amphetamine derivative did not affect these parameters measured after two weeks of washout. This is in agreement with the findings from Costa et al. (2013) [17], where the decrease in DA neurons in SN, three weeks after treatment with MDMA, did not run in parallel with a decrease in the striatal TH. One mechanism responsible for this discrepancy between both areas could be a neuronal sprouting that took place as a recovery phenomenon after MDMA, and detected only some time after the drug exposure. Concerning APP/PS1 mice, MDMA treatment did not diminish striatal TH expression but, when analyzing DAT expression, we found a significant reduction in this group, suggesting an

impaired recovery after dopaminergic injury. This feature, jointly with the decreased MAO-B expression, suggests a residual effect of MDMA on DA terminal functionality in these transgenic mice, leading to a decrease in DA turnover, which was probably the responsible for the lack of effect on DA levels in the striatum.

Evidence suggests that mitochondrial dysfunction occurs early in all major neurodegenerative diseases [8,34]. Interestingly, exposure to MDMA produced opposite effects on PGC-1 α expression, depending on the genotype. This different response could be due to two factors. Firstly, exposing APP/PS1 mice to MDMA may produce greater levels of oxidative stress. This would be in agreement with the levels of 4-HNE observed in this group. Or secondly, the response to oxidative stress could be different according to genotype. It would not be surprising since these APP/PS1 mice show mitochondrial alterations at the early age of 3 months [35]. Clearly, both processes may also have occurred at once.

4.1.2. Long-Term effects of MDMA

Despite the SN lesion still being present 3 months after treatment, no dopaminergic alterations were observed in the striatum of the MDMA-exposed mice, pointing to a transient effect of the drug in this area. Only the APP/PS1 mice treated with the drug showed a residual effect in their DA turnover, which was still reduced at the age of 6 months. This suggests that these mice were unable to recover the basal levels and ran in parallel with a low expression of MAO-A.

Unlike what occurs in the cortex or the hippocampus, the number of A β -plaques in the striatum at 6 months old is lower than in these areas due to the pattern of appearance of A β deposition. Early deposition occurs most prominently in the cortex and, as the animals age, A β deposition becomes more widespread and both the size and the number of plaques is increased. In animals aged 6 months, the deposition plaque also appears in other brain zones, such as striatum [11]. Thus the number and size at this stage in the striatum are still low and small in APP saline. The most novel finding shown in this study is that adolescent exposure to MDMA produces an increase in the number of A β -amyloid plaques in the striatum of APP/PS1 mice in their early adulthood. The potentiation of plaque deposition is a finding of great importance and this is the first study showing such potentiation by an amphetamine derivative in a murine model of FAD. This result opens the door to study if this potentiation takes place also in other brain areas more directly involved with FAD.

Surprisingly, the expression of PGC-1 α remained affected by the treatment. Its increase would probably be a residual effect of the oxidative stress generated by MDMA. Indeed, as a consequence of this production of ROS, the results for 4-HNE were still elevated in the WT MDMA animals. Unexpectedly, the 4-HNE levels in the APP MDMA group were reduced, while these animals exhibited a high increase in deposition of A β . Our hypothesis regarding this result is that, in the APP MDMA animals, the production of oxidative stress was constant and much greater than in the WT MDMA mice. In fact, the APP SF group already showed increased 4-HNE levels compared with WT SF, which indicates a higher basal oxidative stress. The reduced 4-HNE observed in APP MDMA mice could be explained by an adaptive induction of its metabolic pathway [36] and with the appearance of senile plaques. In fact, 4-HNE immunoreactivity was identified in neurofibrillary tangles and some neurons in brain tissue of patients diagnosed with AD, but not in the A β deposits [37].

In summary, young and mature adult APP/PS1 mice exhibit hyperlocomotion that could be related with the dopaminergic alterations evidenced in the striatum of animals aged 6 months, namely higher DA levels and lower DA turnover. Our model of intermittent exposure to increasing doses of MDMA produces a genotype-independent decrease in dopaminergic neurons in the SN that remains in the adulthood. Although two weeks after the treatment, striatal DA levels were not decreased by MDMA in APP/PS1 mice, we hypothesize that the consequences triggered by the drug are more severe in this group, since DAT levels were recovering more slowly and they showed higher levels of oxidative stress and a changed trend in DA turnover. These disturbances are age-related characteristics that this genotype develops spontaneously much later in the saline-treated animals. Therefore, MDMA administration seems to accelerate the appearance of the striatal dopaminergic dysfunction in this FAD model. APP/PS1 mice exposed to MDMA during the adolescence show an increased amount of A β plaques in the striatum in early adulthood, probably contributing to a worse prognosis of the neurodegenerative process associated with the AD.

Acknowledgements

Funding for this study was provided by the Ministerio de Economía y Competitividad (SAF 2013-46135-P) and Ministerio de Sanidad y Consumo (CIBERNED, CB06/05/0024). Sonia Abad received a fellowship from the Institut de Biomedicina (IBUB, University of Barcelona). AC belongs to 2014SGR525, and JC, DP and EE to 2014SGR1081. The authors acknowledge the Language Advisory Service of the University of Barcelona for editing the language of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors have no actual or potential conflict of interest including financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence the present work.

Authorship Contributions

CA and EE were responsible for the study concept and design. AS carried out the experimental work. CJ and PD assisted with data analysis and RC with plaque deposition experiments. EE and AS drafted the manuscript, CA supported with interpretation of findings. CJ and PD provided critical revision of the manuscript. All authors critically reviewed content and approved final version for publication.

References

- [1] L.P. Spear, The adolescent brain and age-related behavioral manifestations, *Neurosci Biobehav Res* 24 (2000) 417-63.
- [2] J.P. Capela, H. Carmo, F. Remião, M.L. Bastos, A. Meisel, F. Carvalho, Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: An overview, *Mol. Neurobiol.* 39 (2009) 210–271.
- [3] E. Escubedo, S. Abad, I. Torres, J. Camarasa, D. Pubill, Comparative neurochemical profile of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its metabolite alpha-methyldopamine on key targets

- of MDMA neurotoxicity., *Neurochem. Int.* 58 (2011) 92–101.
- [4] E. O’Shea, B. Esteban, J. Camarero, A.R. Green, M.I. Colado, Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA (“ecstasy”) on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain, *Neuropharmacology.* 40 (2001) 65–74.
- [5] C. Chipana, S. García-Ratés, J. Camarasa, D. Pubill, E. Escubedo, Different oxidative profile and nicotinic receptor interaction of amphetamine and 3,4-methylenedioxy-methamphetamine., *Neurochem. Int.* 52 (2008) 401–10.
- [6] C. Chipana, J. Camarasa, D. Pubill, E. Escubedo, Protection against MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in mice by methyllycaconitine: involvement of nicotinic receptors., *Neuropharmacology.* 51 (2006) 885–95.
- [7] K.J. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush, Neurodegenerative diseases and oxidative stress., *Nat. Rev. Drug Discov.* (2004) 205-14.
- [8] A. Federico, E. Cardaioli, P. Da Pozzo, P. Formichi, G.N. Gallus, E. Radi, Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration., *J. Neurol. Sci.* 322 (2012) 254–62.
- [9] J. Emerit, M. Edeas, F. Bricaire, Neurodegenerative diseases and oxidative stress, *Biomed. Pharmacother.* (2004) 39-46.
- [10] M.N. Gordon, L.A. Holcomb, P.T. Jantzen, G. DiCarlo, D. Wilcock, K.W. Boyett, et al., Time course of the development of Alzheimer-like pathology in the doubly transgenic PS1+APP mouse., *Exp. Neurol.* 173 (2002) 183–95.
- [11] E. McGowan, S. Sanders, T. Iwatsubo, A. Takeuchi, T. Saido, C. Zehr, et al., Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes., *Neurobiol. Dis.* 6 (1999) 231–44.
- [12] J. Horvath, P.R. Burkhard, F.R. Herrmann, C. Bouras, E. Kövari, Neuropathology of parkinsonism in patients with pure Alzheimer’s disease., *J. Alzheimers. Dis.* 39 (2014) 115–20.
- [13] F. Portet, N. Scarmeas, S. Cosentino, E.P. Helzner, Y. Stern, Extrapiramidal signs before and after diagnosis of incident Alzheimer disease in a prospective population study., *Arch. Neurol.* 66 (2009) 1120–1126.
- [14] A. Martorana, G. Koch, “Is dopamine involved in Alzheimer’s disease?”, *Front. Aging Neurosci.* 6 (2014) 252 eCollection 2014.
- [15] S.C. Flavel, J.D. Koch, J.M. White, G. Todd, Illicit stimulant use in humans is associated with a long-term increase in tremor., 7 (2012) e52025.

- [16] G. Todd, C. Noyes, S.C. Flavel, C.B. Della Vedova, P. Spyropoulos, B. Chatterton, et al., Illicit stimulant use is associated with abnormal substantia nigra morphology in humans., 8 (2013) e56438.
- [17] G. Costa, L. Frau, J. Wardas, A. Pinna, A. Plumitallo, M. Morelli, MPTP-induced dopamine neuron degeneration and glia activation is potentiated in MDMA-pretreated mice., *Mov. Disord.* 28 (2013) 1957–65.
- [18] G. Costa, N. Simola, M. Morelli, MDMA administration during adolescence exacerbates MPTP-induced cognitive impairment and neuroinflammation in the hippocampus and prefrontal cortex., *Psychopharmacology (Berl)*. (2014) 4007-18.
- [19] S. Abad, J. Camarasa, D. Pubill, A. Camins, E. Escubedo, Adaptive Plasticity in the Hippocampus of Young Mice Intermittently Exposed to MDMA Could Be the Origin of Memory Deficits, *Mol. Neurobiol.* (2015).
- [20] C. Ros-Simó, M. Moscoso-Castro, J. Ruiz-Medina, J. Ros, O. Valverde, Memory impairment and hippocampus specific protein oxidation induced by ethanol intake and 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice., *J. Neurochem.* 125 (2013) 736–46.
- [21] A. Arias-Cavieres, C. Rozas, M. Reyes-Parada, N. Barrera, F. Pancetti, S. Loyola, et al., MDMA (“ecstasy”) impairs learning in the Morris Water Maze and reduces hippocampal LTP in young rats., *Neurosci. Lett.* 469 (2010) 375–9.
- [22] M.R. Skelton, M.T. Williams, C. V. Vorhees, Developmental effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a review., *Behav. Pharmacol.* 19 (2008) 91–111.
- [23] J.E. Sprague, A.S. Preston, M. Leifheit, B. Woodside, Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): effects on spatial learning, *Physiol. Behav.* 79 (2003) 281–287.
- [24] M. Garcia-Alloza, E.M. Robbins, S.X. Zhang-Nunes, S.M. Purcell, R. a Betensky, S. Raju, et al., Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease., *Neurobiol. Dis.* 24 (2006) 516–24.
- [25] A. Savonenko, G.M. Xu, T. Melnikova, J.L. Morton, V. Gonzales, M.P.F. Wong, et al., Episodic-like memory deficits in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer’s disease: relationships to beta-amyloid deposition and neurotransmitter abnormalities., *Neurobiol. Dis.* 18 (2005) 602–17.
- [26] W. Zhang, M. Bai, Y. Xi, J. Hao, Z. Zhang, C. Su, et al., Multiple inflammatory pathways are involved in the development and progression of cognitive deficits in APP^{swe}/PS1^{dE9} mice., *Neurobiol. Aging.* 33 (2012) 2661–77.

- [27] S.E. Perez, O. Lazarov, J.B. Koprach, E.-Y. Chen, V. Rodriguez-Menendez, J.W. Lipton, et al., Nigrostriatal dysfunction in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic mice., *J. Neurosci.* 25 (2005) 10220–9.
- [28] M.I. Colado, J. Camarero, a O. Mechan, V. Sanchez, B. Esteban, J.M. Elliott, et al., A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine neurones in mouse brain., *Br. J. Pharmacol.* 134 (2001) 1711–1723.
- [29] E. Verdaguer, S. Brox, D. Petrov, J. Olloquequi, R. Romero, M.L. de Lemos, et al., Vulnerability of calbindin, calretinin and parvalbumin in a transgenic/knock-in APP^{swe}/PS1^{ΔE9} mouse model of Alzheimer disease together with disruption of hippocampal neurogenesis., *Exp. Gerontol.* 69 (2015) 176–88.
- [30] K.B.J. Paxinos, G and Franklin, *Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2001.
- [31] J. St-Pierre, S. Drori, M. Uldry, J.M. Silvaggi, J. Rhee, S. Jäger, et al., Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators, *Cell.* 127 (2006) 397–408.
- [32] N. Granado, E. O'Shea, J. Bove, M. Vila, M.I. Colado, R. Moratalla, Persistent MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the striatum and substantia nigra of mice., *J. Neurochem.* 107 (2008) 1102–12.
- [33] N. Maroof, S. Ravipati, M.C. Pardon, D.A. Barrett, D.A. Kendall, Reductions in Endocannabinoid Levels and Enhanced Coupling of Cannabinoid Receptors in the Striatum are Accompanied by Cognitive Impairments in the A β PP^{swe}/PS1 Δ E9 Mouse Model of Alzheimer's Disease., *J. Alzheimers. Dis.* (2014) 227-45.
- [34] A.B. Knott, G. Perkins, R. Schwarzenbacher, E. Bossy-Wetzel, Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration., *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (2008) 505–518.
- [35] I. Pedrós, D. Petrov, M. Allgaier, F. Sureda, E. Barroso, C. Beas-Zarate, et al., Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APP^{swe}/PS1^{ΔE9} mouse model of Alzheimer's disease., *Biochim. Biophys. Acta.* 1842 (2014) 1556–66.
- [36] R. Zheng, A.-C. Dragomir, V. Mishin, J.R. Richardson, D.E. Heck, D.L. Laskin, et al., Differential metabolism of 4-hydroxynonenal in liver, lung and brain of mice and rats., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279 (2014) 43–52.
- [37] L.M. Sayre, D. a Zelasko, P.L. Harris, G. Perry, R.G. Salomon, M. a Smith, 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in

Legends for figures

Figure 1. Treatment schedule.

Figure 2. Effect of MDMA on TH-positive neurons in the SN, in wild type (WT) and APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP) mice. Bar graphs A and B show the number of TH positive neurons in SN, 2 weeks and 3 months after the last exposure to the drug, respectively. Two-way ANOVA showed a significant effect of the variable treatment (2 weeks: $F_{1,15}=16.11$, $P=0.01$; 3 months: $F_{1,14}=16.54$, $P=0.001$) Data represent the mean \pm SEM ($n=4-5$ animals/group). Post-hoc Turkey test: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ versus the corresponding saline group. Panels A1-4 and B1-4 show representative photomicrographs of the effects of MDMA on TH immunofluorescence in the SN at two time points, 2w and 3m, respectively. Scale bar: 200 μ M.

Figure 3. Quantification of MAO-A and MAO-B expression 2 weeks (panels A and B) and 3 months (panels C and D) after the last exposition to MDMA or saline in wild type (WT) and APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP) mice. Proteins were detected and quantified by Western blotting. Representative WB autoradiographs, and the results of the two-way ANOVA are displayed below each bar graph: n.s. non-significant; \$ $p<0.05$, \$\$\$ $p<0.001$. Post-hoc Turkey test: * $p<0.05$ versus the corresponding saline group. Data represent the means \pm SEM ($n=3-5$ animals/group) of normalized values.

Figure 4. Effects of MDMA on the striatal dopaminergic markers TH and DAT 2 weeks (panels A and B) and 3 months (panels C and D) after the last exposition to MDMA or saline in wild type (WT) and APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP) mice. Panels show the protein levels of protein measured by WB. Representative WB autoradiographs are shown below bar graphs. Results of the two-way ANOVA are displayed in the tables below each graph: n.s. non-significant; \$ $p<0.05$; \$\$ $p<0.01$. Data represent the means \pm SEM ($n=4-5$ animals/group) of normalized values. Post-hoc Turkey tests: * $p<0.05$ versus the corresponding saline group.

Figure 5. Determination of PGC-1 α and 4-HNE levels, 2 weeks after the treatment (panels A and B), and 3 months later (panels C and D), in wild type (WT) and APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP) mice. Representative WB autoradiographs, and the results of the two-way ANOVA are displayed in the tables below each graph: n.s. non-significant; \$ $p<0.05$; \$\$ $p<0.01$; \$\$\$ $p<0.001$. Data represent the mean \pm SEM ($n=4-5$ animals/group) of normalized values. Post-hoc Turkey tests: * $p<0.05$; ** $p<0.01$ versus the corresponding saline group. & $p<0.05$; && $p<0.01$ versus same group-treated animals but different genotype.

Figure 6. Thioflavin S staining of β -amyloid plaques in 6 month-old APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse brain. MDMA exposure induced a very significant increase in the number of A β -depositions. ** $p<0.01$ versus saline ($n=4$ animals/group). A, B, C and D representative pictures of thioflavine staining. Str: striatum; Ctx: cortex. Scale bar: 200 μ M (panels A and C); 20 μ M (panels B and D).

Figure 7. Comparison of the locomotor activity between 3 and 6-month-old wild type (WT) and APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP) mice. Considering that three-way ANOVA showed a significant effect of genotype in traveled distance and speed, the values of the MDMA group were removed from graph to simplify. Panel A: distance traveled. Panel B: Speed. I. Data represent the mean \pm SEM (n =12-19 animals/group). Post-hoc Turkey tests: * $p < 0.05$ versus the WT age-matched group.

Figure 8. Temporal evolution of neurotransmitters in wild type (WT) and APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP) mice of 3 and 6 months of age. Three-way ANOVA showed a significant effect of genotype in DA as well as in its turnover. In order to simplify, values of the MDMA group were removed from graph. Panel A: DA levels. Panel B: DA turnover. Panel C: Norepinephrine. Data represent the means \pm SEM (n=4-5 animals/group). Post-hoc Turkey tests: * $p < 0.05$ versus the WT age-matched group.

Table 1. A list of antibodies used for the immunoblotting experiments

Protein	Antibody	Dilution
Tyrosine hydroxylase (TH)	TH-612300 (Transduction Laboratories)	1:1000
Monomine Oxidase A (MAO-A)	Anti-MAOA (H-70) Sc:20156 (Santa Cruz)	1:200
Monomine Oxidase B (MAO-B)	Anti-MAOB (C-17) Sc:18401 (Santa Cruz)	1:500
Dopamine Transporter (DAT)	Anti- Dopamine Transporter AB1591P (Millipore)	1:500
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha (PGC-1 α)	Anti- PGC-1 α (H-300) Sc: 13067 (Santa Cruz)	1:500
4-Hydroxynonenal (4-HNE)	Anti-4-Hydroxynonenal ab46545 (Abcam)	1:500

Table 2. Effects of treatment on locomotor activity in the open field test one week after the end of the treatment, measured as traveled distance (cm/s) and speed (s). Two-way ANOVA showed a significant effect of variable genotype and treatment (traveled distance $p < 0.01$; speed $p < 0.05$). Double transgenic mice showed a hyperactive behavior. Post-hoc test showed a significant effect of MDMA in WT animals. Data represent the means \pm SEM (n=12-18 animals/group). * $p < 0.05$ versus the corresponding saline group.

PARAMETER	WT SF	WT MDMA	APP SF	APP MDMA
Distance (cm)	3081.30 \pm 160.05	2603.99 \pm 132.97*	3634.63 \pm 221.95	3201.89 \pm 292.25
Speed (cm/s)	5.14 \pm 0.27	4.45 \pm 0.24*	6.06 \pm 0.37	5.34 \pm 0.49

Table 3. Locomotor activity in the open field 3 months after the last exposition to MDMA. Statistical analysis showed an effect of genotype (traveled distance and speed $p < 0.001$). Double transgenic mice still showed a hyperactive behavior compared with WT animals. No effects of MDMA were evidenced. Data represent the means \pm SEM (n=15-18 animals/group).

PARAMETER	WT SF	WT MDMA	APP SF	APP MDMA
Distance (cm)	2514.00 \pm 239.9	2573.16 \pm 83.13	3306.20 \pm 224.25	3401.84 \pm 364.59
Speed (cm/s)	4.19 \pm 0.40	4.29 \pm 0.14	5.50 \pm 0.38	5.67 \pm 0.6

Table 4. Effects of treatment on the neurotransmitters levels in striatum two weeks after the end of the treatment. 5HIA levels declined significantly in WT MDMA group. Although the two-way ANOVA did not reach significance, residual effects by MDMA exposition were observed in DA, DOPAC levels in WT animals compared with their matching saline group. Nevertheless, no effects of MDMA were perceived in double transgenic mice. Data represent the means \pm SEM (n= 4-5 animals/group). ** p <0.01 versus the corresponding saline group.

PARAMETER (nmols/g wet tissue)	WT SF	WT MDMA	APP SF	APP MDMA
NE	0.66 \pm 0.074	0.67 \pm 0.19	0.65 \pm 0.08	0.69 \pm 0.09
DOPAC	14.22 \pm 1.28	9.31 \pm 0.98	15.57 \pm 4.20	11.21 \pm 1.96
DA	42.38 \pm 5.01	24.76 \pm 4.73	41.68 \pm 7.68	39.53 \pm 2.89
DOPAC/DA	0.32 \pm 0.08	0.39 \pm 0.03	0.39 \pm 0.06	0.28 \pm 0.04
HVA	3.87 \pm 0.66	2.96 \pm 0.62	4.77 \pm 0.64	4.25 \pm 0.73
5HIA	1.94 \pm 0.14	1.25 \pm 0.06*	1.81 \pm 0.18	1.69 \pm 0.11
5HT	1.24 \pm 0.37	1.77 \pm 0.33	2.30 \pm 0.30	2.68 \pm 0.07

5. Quantification of the neurotransmitters levels 3 months after the end of the treatment. Two-way ANOVA showed an effect of variable genotype in DA ($p=0.05$), DOPAC ($p<0.01$) and in the DA turnover (DOPAC/DA) ($p<0.01$). Double transgenic mice exhibited an increase in dopamine levels, while a decrease in DOPAC levels and the DA turnover. Post-hoc test showed a significant effect of MDMA in the dopamine turnover and DOPAC levels in APP/PS1 mice. Data represent the means \pm SEM (n=4-5 animals/group). * $p<0.05$ versus the corresponding saline group.

PARAMETER (nmols/g wet tissue)	WT SF	WT MDMA	APP SF	APP MDMA
NE	0.68 \pm 0.06	0.80 \pm 0.04	0.77 \pm 0.06	0.81 \pm 0.07
DOPAC	14.48 \pm 1.16	12.83 \pm 1.34	13.18 \pm 1.45	7.91 \pm 1.43*
DA	37.20 \pm 2.65	37.70 \pm 6.96	51.40 \pm 5.35	53.20 \pm 6.93
DOPAC/DA	0.41 \pm 0.05	0.38 \pm 0.07	0.25 \pm 0.04	0.13 \pm 0.02*
HVA	3.50 \pm 0.46	2.89 \pm 0.45	3.41 \pm 0.67	3.20 \pm 0.61
5HIA	1.60 \pm 0.10	1.72 \pm 0.11	1.59 \pm 0.13	1.57 \pm 0.34
5HT	2.70 \pm 0.28	2.24 \pm 0.10	2.19 \pm 0.15	2.89 \pm 0.29

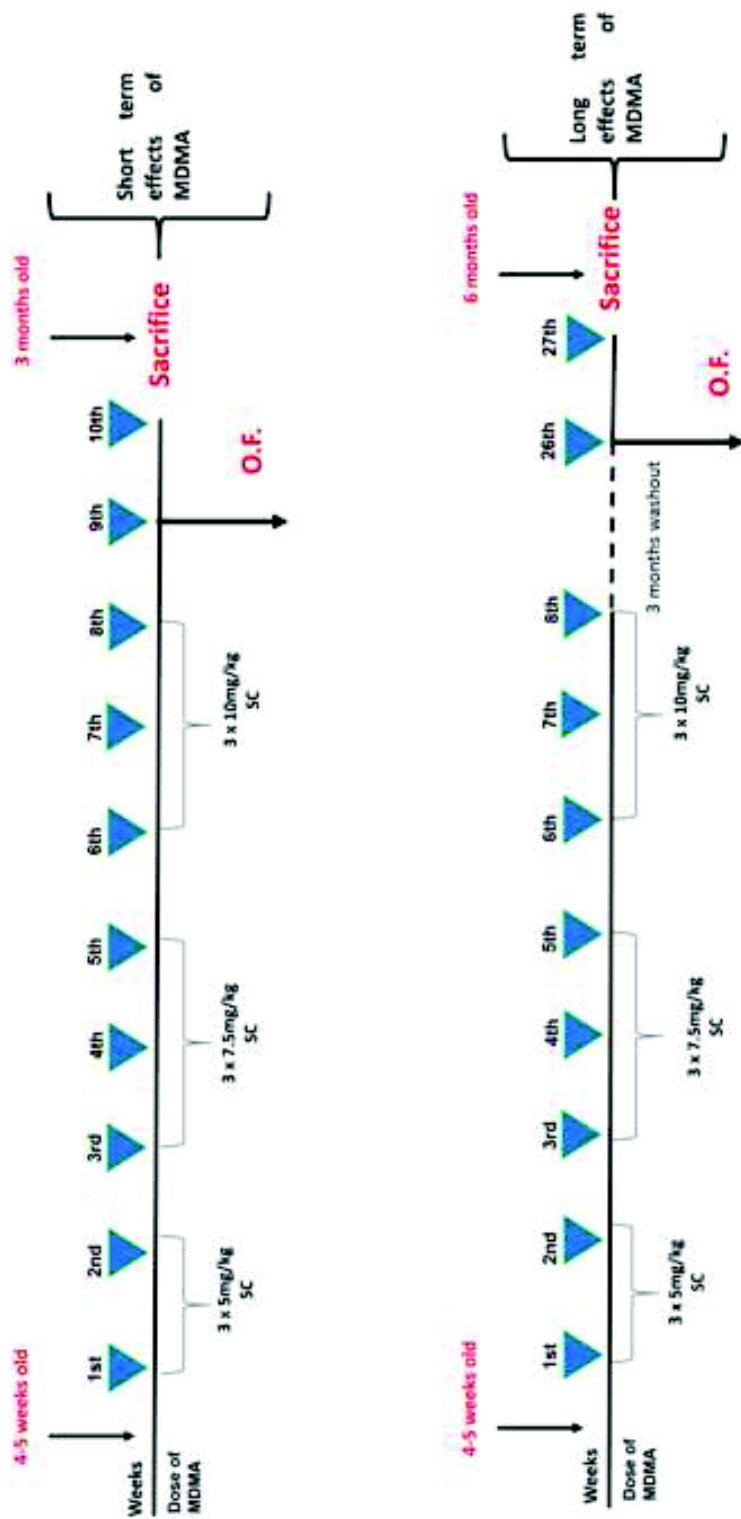


Figure 1

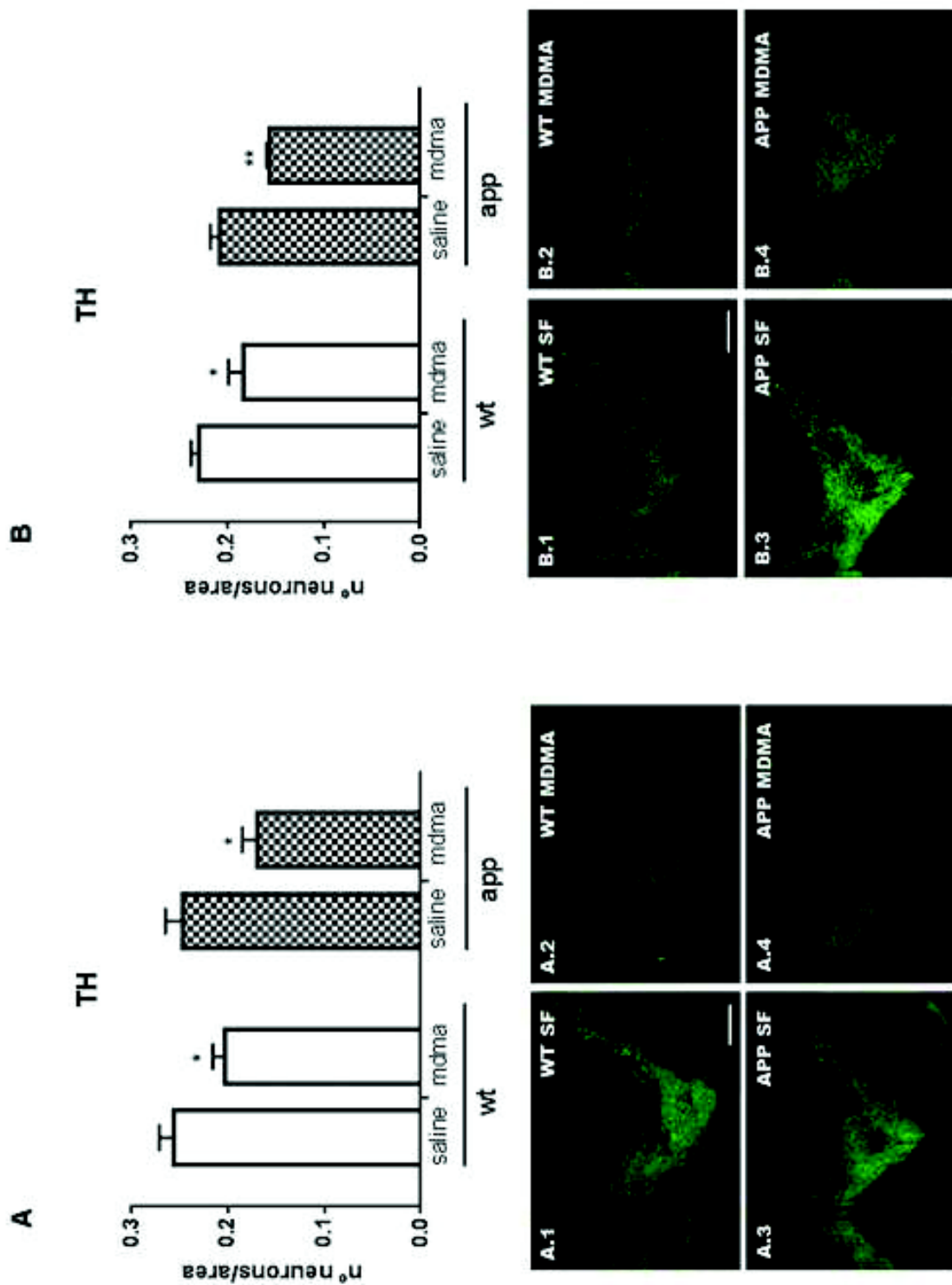


Figure 3

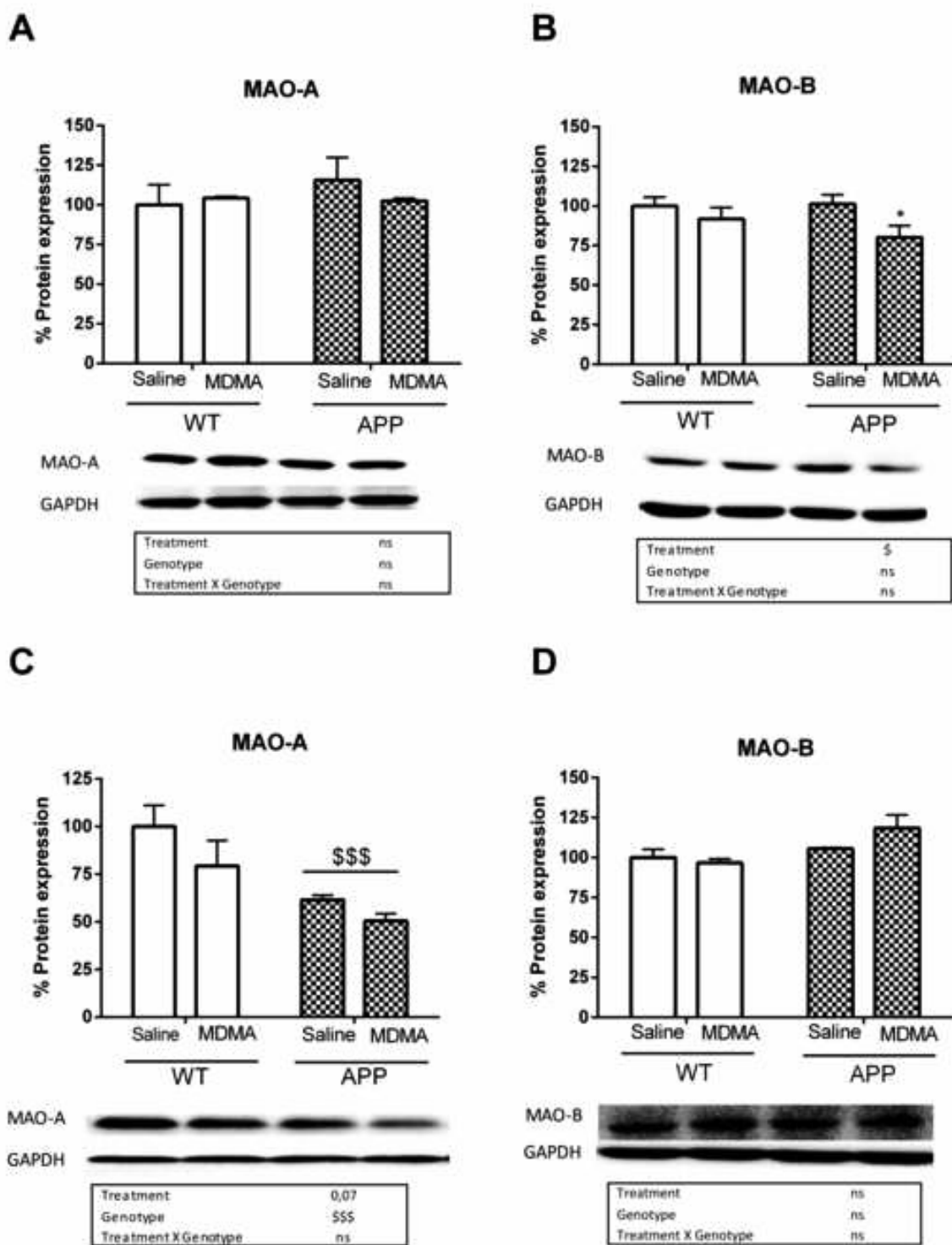


Figure 4

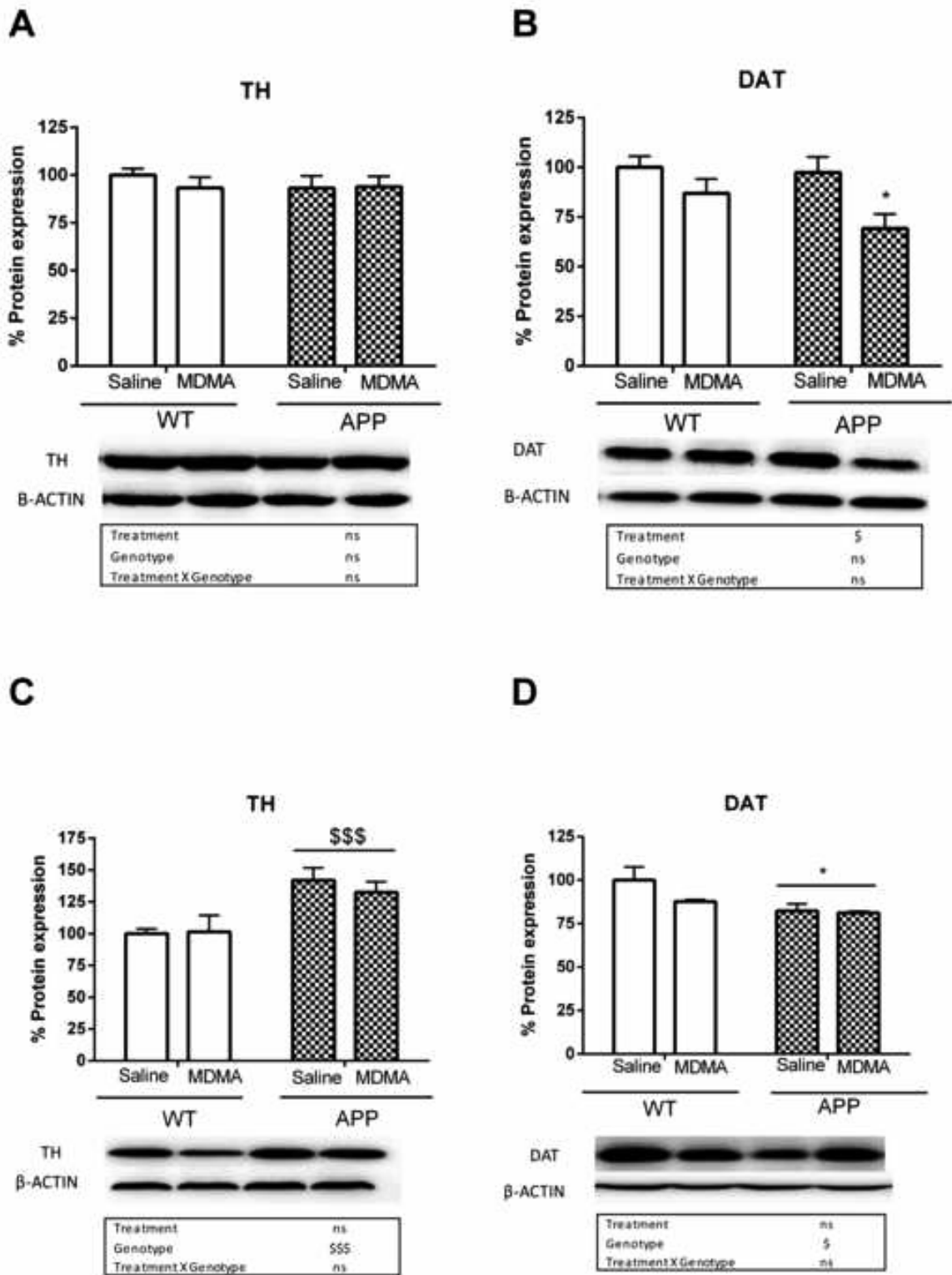


Figure 5

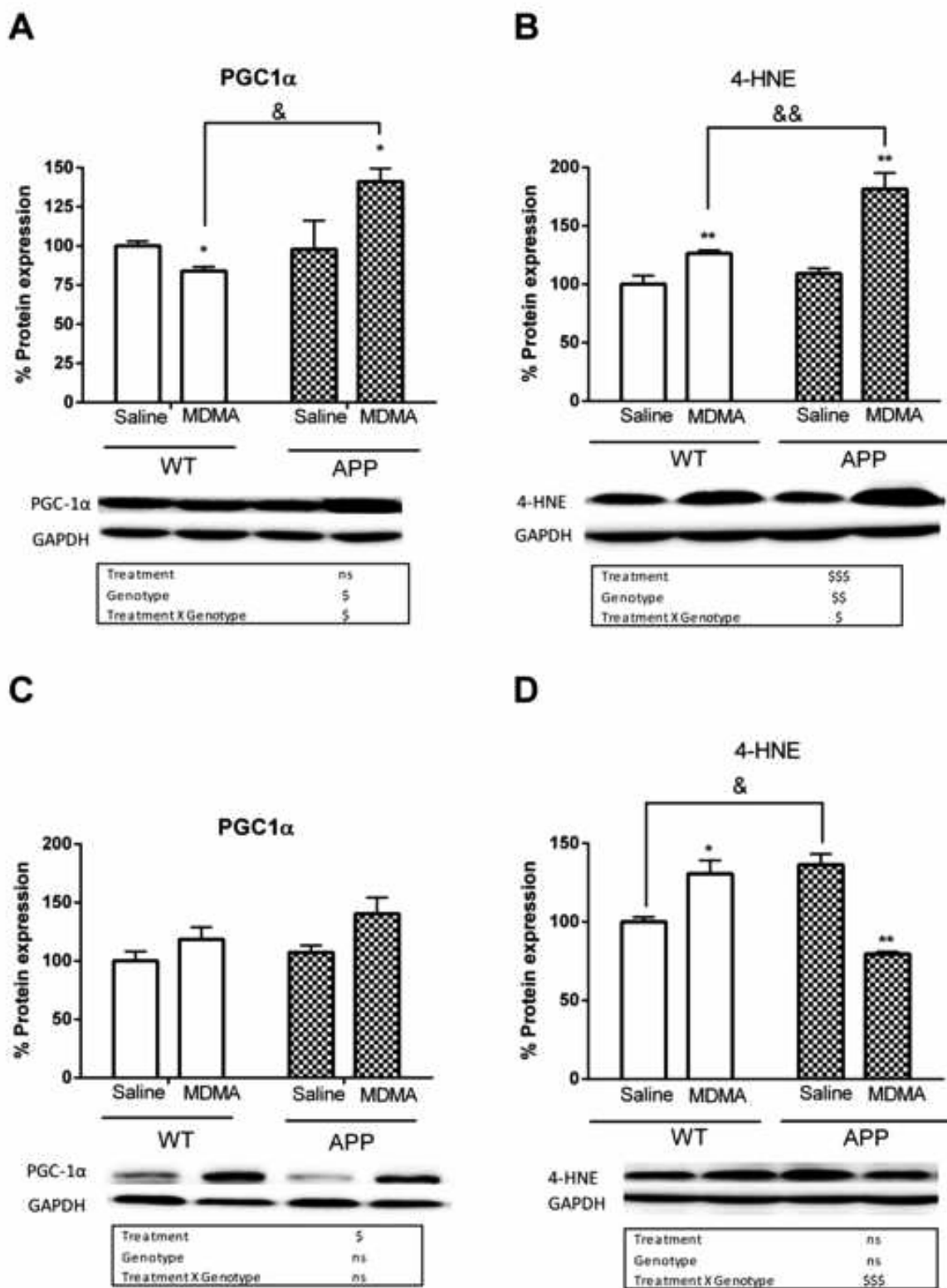
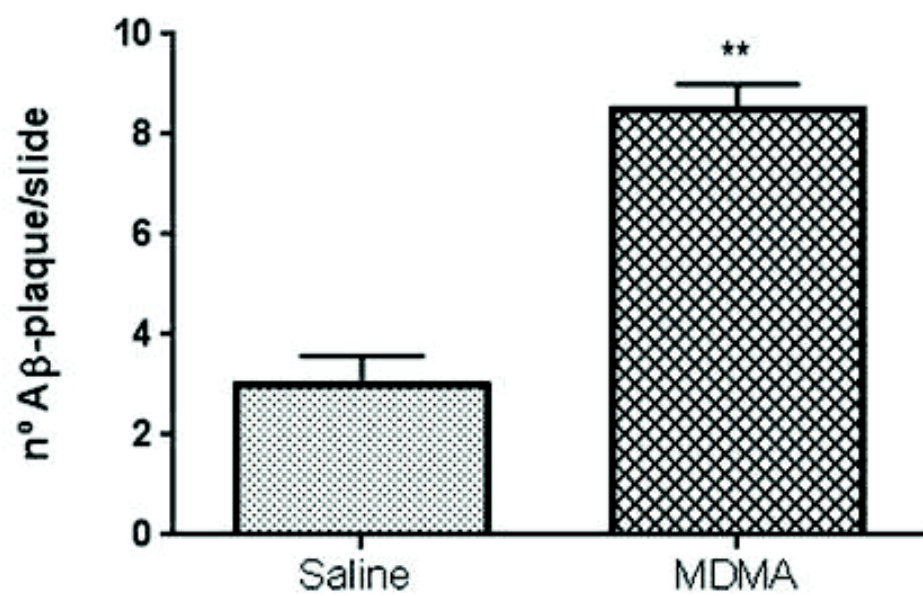


Figure 6

A



B

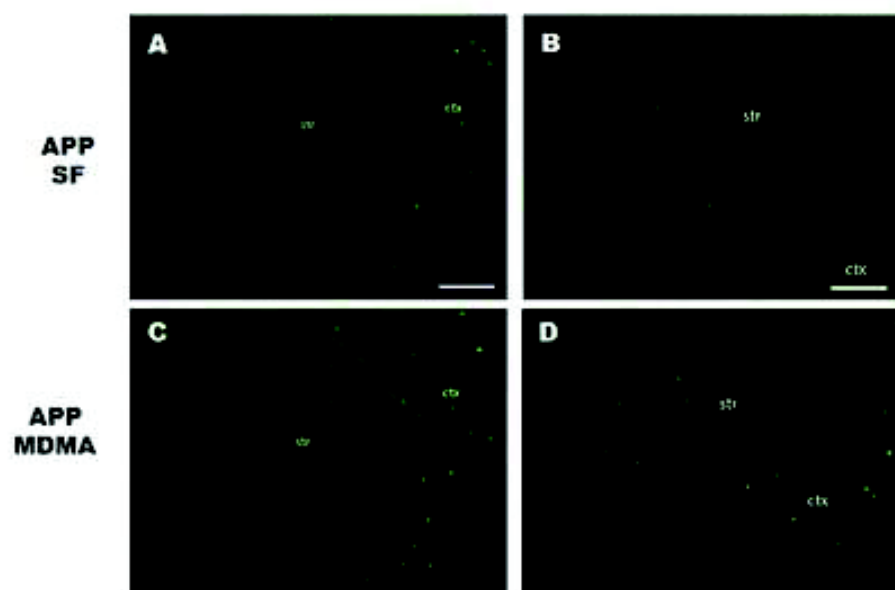
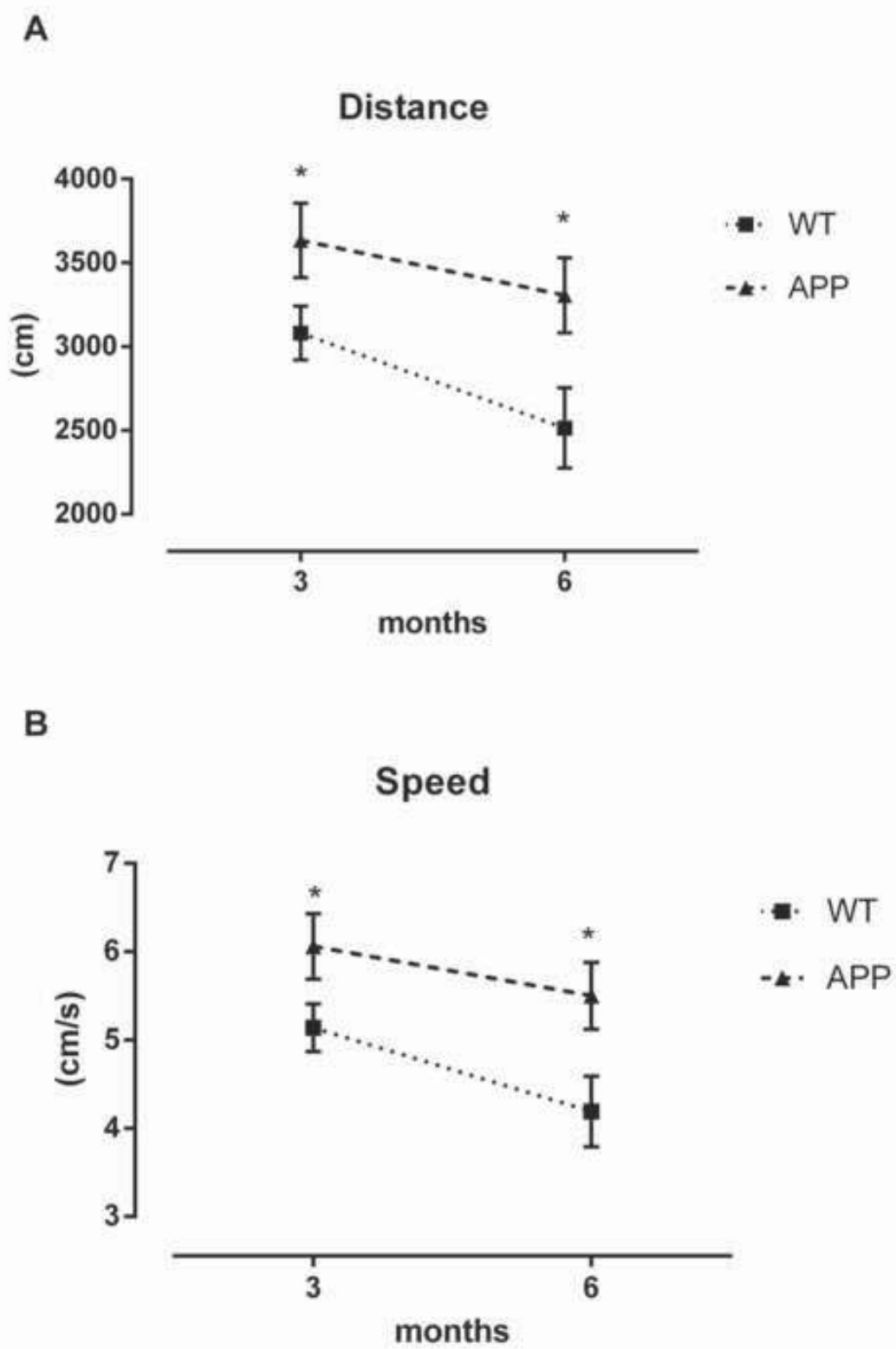
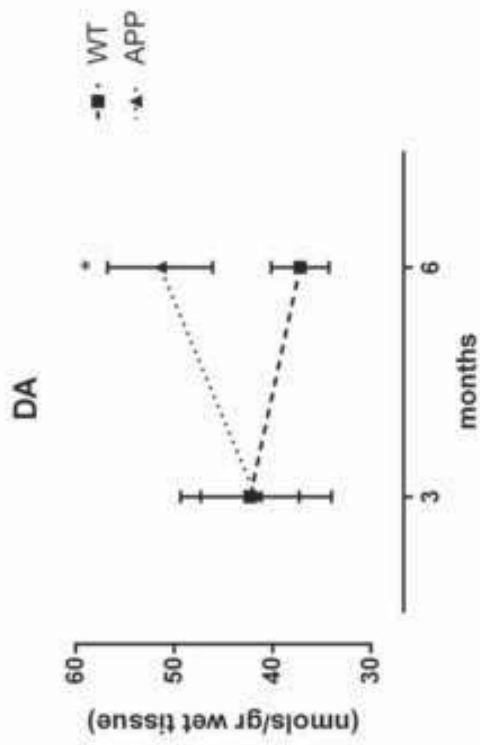


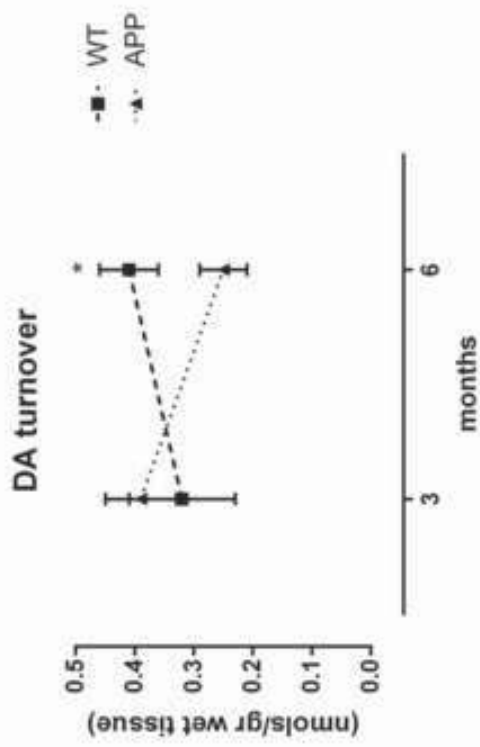
Figure 7



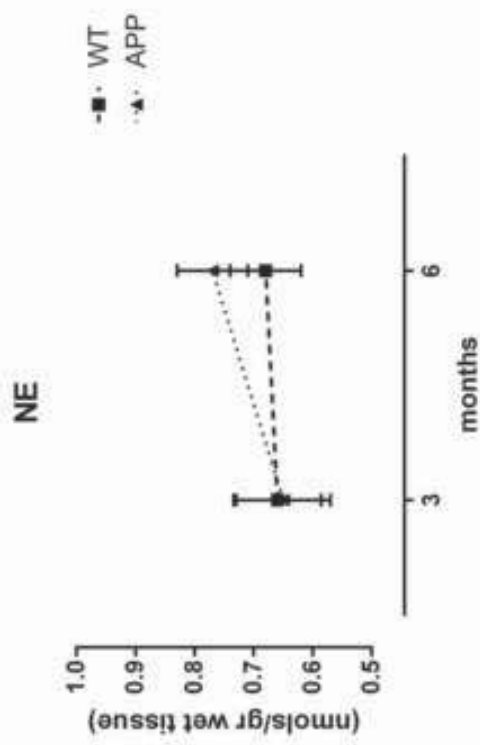
A



B



C



DISCUSSIÓ

Encara que el consum de substàncies psicoactives ha existit al llarg de la història, en les últimes dècades ha pres una nova dimensió. En l'actualitat la relació directa entre les societats desenvolupades i el consum abusiu de substàncies psicoactives és notable. Per tant, en aquest marc, cal destacar que el consum de substàncies d'abús constitueix en l'actualitat un important fenomen social que té especial repercussió en els adolescents. La prevalença de l'ús i abús de les drogues en l'etapa adolescent i en l'adulthood primerenca és remarcable. Tal com s'ha mencionat en la introducció, l'MDMA és una de les drogues predilectes pels adolescents a causa de les seves propietats entactògenes. En la literatura podem trobar un gran nombre d'estudis experimentals realitzats sobre els efectes en el SNC d'aquesta substància en animals d'experimentació, però els diferents autors no aconseguen posar-se d'acord en el seu potencial neurotòxic, ja que depèn molt de la dosi utilitzada, temps de durada del tractament, model d'experimentació, edat, soca animal o temps d'abstinència de la substància. Cal destacar que el número d'estudis experimentals realitzats en animals en edat adolescent constitueix menys d'una quarta part del total. Les investigacions realitzades durant aquest període de la vida són de gran rellevància per tal de poder simular al màxim les condicions de consum d'aquesta substància. Cal insistir que és en l'adolescència quan el cervell experimenta una gran remodelació a causa del procés de maduració. Els canvis ocorren a diversos nivells, des del nivell neuroanatòmic, tant en una regió específica o com en la seva connexió a diferents regions, a la funcionalitat dels sistemes de neurotransmissió i la seva reactivitat als agents farmacològics tan a curt com a llarg termini. La naturalesa i el grau pel qual l'exposició a substàncies d'abús influeixen la topografia final en l'adult ve determinada per la fase de maduració d'aquests factors crítics.

Per tant, la present tesi s'ha focalitzat en els efectes en diferents processos del SNC d'una de les substàncies psicoactives més populars entre els joves adolescents, la 3,4-metildioximetamfetamina o més coneguda amb el nom d'èxtasi o MDMA. Per tal de simular al màxim els factors que envolten el consum d'aquesta substància, tots els estudis s'han dut a terme en animals adolescents i a una temperatura ambiental

elevada, imitant d'aquesta manera l'entorn on els adolescents acostumen a consumir aquestes substàncies.

4.1 Estudi dels efectes de l'MDMA en la plasticitat i memòria

En els últims anys s'ha fet evident que l'exposició repetida a substàncies psicoactives, com l'amfetamina, cocaïna o l'MDMA poden conduir a canvis estructurals, alteracions en el comportament i transformacions neuroquímiques en el cervell que poden persistir inclús molt de temps després de que l'administració de la substància hagi cessat. Aquests canvis també poden ser induïts a través de processos com l'aprenentatge o l'estrès i poden alterar substancialment el patró d'activació neuronal. Aquest fenomen es coneix com a neuroplasticitat, un concepte que és àmpliament considerat com un procés important no únicament en el desenvolupament saludable de la memòria i l'aprenentatge, sinó també en traumes cerebrals i en la recuperació d'un dany neuronal. Els efectes de les substàncies d'abús en els processos cognitius o d'addicció comprenen alteracions en la plasticitat cerebral i en els diferents sistemes de neurotransmissió relacionats amb aquests processos.

L'MDMA és un derivat amfetamínic en el qual la seva habilitat per alliberar 5-HT, NA i DA en àrees relacionades amb els processos d'aprenentatge i memòria està ben establerta (veure introducció). Com també està ben establert la seva diferent farmacotoxicologia segons l'espècie estudiada. En humans, primats i rates la seva acció neurotòxica és principalment en els terminals serotoninèrgics de l'HC i còrtex, tenint poca o nul·la afectació dopaminèrgica, en canvi en ratolins es considera principalment una neurotoxina dopaminèrgica, tot i que també es descriuen afectacions de terminals serotoninèrgics (Chipana et al., 2006). Aquestes diferències poden venir donades pel tipus de metabolisme de la substància, ja que està ben estudiat que el metabolisme difereix entre espècies.

Tal com s'ha explicat en la Introducció, el metabolisme de l'MDMA juga un paper molt important en la diferent neurotoxicitat entre espècies. Molts autors coincideixen en que la metabolització hepàtica

d'aquesta substància és necessària per exercir la seva neurotoxicitat (de la Torre et al., 2004; Escobedo et al., 2005). Aquesta hipòtesi neix a partir de resultats on l'administració i.c.v. tant de l'MDMA com del seu metabòlit actiu MDA en el cervell no provoquen els mateixos canvis observats quan aquestes substàncies són administrades via perifèrica (Esteban et al., 2001). L'administració i.c.v dels seus principals metabòlits HMMA i HHA, tampoc produeixen la neurotoxicitat esperada (Johnson et al., 1992; Chu et al., 1996). Els adductes tioèters amb quinones formats a partir de l'autooxidació dels metabòlits HHAA i HHA han estat postulats com les espècies més probables d'estar involucrades en la neurotoxicitat serotoninèrgica (Miller et al., 1996; Easton et al., 2003). A més, diferències tant en la cinètica de l'enzim que metabolitza l'MDMA com en la inhibició induïda per la pròpia substància a través de la formació del complex enzim-metabòlit, suggereixen que pot existir diferent susceptibilitat entre espècies a causa dels diferents índex de formació de les diferents molècules reactives neurotòxiques (de la Torre & Farré, 2004). Per exemple, en les femelles de la soca Dark Agouti, l'enzim encarregat de metabolitzar l'MDMA és absent, el qual explica la seva sensibilitat i toxicitat a aquesta substància (Colado et al., 1995). Cal tenir en compte que l'MDMA provoca una disrupció en la neuroquímica del cervell que inclou interaccions dinàmiques entre els diferents sistemes de neurotransmissió que no pot ser minimitzat a un sol mecanisme, però aquestes diferències entre el metabolisme de les espècies podria explicar la seva diferent neurotoxicitat. A causa d'aquesta discrepància entre espècies es fa difícil la comparació dels estudis realitzats.

4.1.1 Efectes de l'MDMA en rata

Les accions neurotòxiques de l'MDMA en les neurones serotoninèrgiques depenen tant de la dosi administrada com del nombre d'administracions. A més, la dosi i/o el número d'administracions pot afectar diferencialment els diferents marcadors serotoninèrgics per determinar la neurotoxicitat, per tant cal diferenciar entre les dosis que produeixen efectes supressors sobre el metabolisme de la 5-HT en neurones estructuralment intactes, i les que produeixen efectes neurodegeneratius del derivat amfetamínic sobre la integritat estructural dels axons i terminals serotoninèrgics (Battaglia et al.,

1988). En el nostre estudi, en rates adultes la dosis escollida provoca neurotoxicitat en els terminals serotoninèrgics del còrtex, HC i estriat, produint una reducció tant en els nivells de 5-HT com en el nombre de 5HTT, observable a partir de les divuit hores post-administració, i parcialment revertida una setmana després en HC i estriat (Pubill et al., 2003). La taxa de recuperació neuronal depèn de la regió i podria venir donada per una recuperació inicial ràpida des d'unes hores després de l'administració fins quatre setmanes, la qual aniria seguida d'una taxa de recuperació definitiva més lenta que podria ocórrer fins un any després (Battaglia et al., 1988).

En els nostres experiments, una setmana després del règim d'administració els animals tractats amb el derivat amfetamínic no van mostrar un comportament depressiu, tal com van indicar els resultats en el test de natació forçada o *Forced Swimming Test* (FST). D'altra banda, en el test del camp obert o *Open field* (OF) els animals sotmesos a l'MDMA van aventurar-se a restar més temps en el centre de l'àrea mostrant un comportament ansiolític en comparació amb el grup control. Aquest comportament podria ser el resultat d'una ràpida adaptació a un nou entorn. En els darrers anys, l'interès per aquesta substància en el camp de la terapèutica ha incrementat a causa del seu possible ús per tractar l'estrès post-traumàtic (PTSD) en pacients resistents a les teràpies convencionals (Doblin, 2002; Mithoefer et al., 2011, 2013, 2016). Mithoefer i col. (2011) van publicar el primer estudi clínic realitzat en pacients amb PTSD on s'avaluava l'efecte de l'MDMA per tractar aquest desordre. Tant a la finalització de l'estudi com en els seguiments realitzats durant setanta-quatre mesos després es van obtenir resultats positius sense informar de cap efecte secundari greu (Mithoefer et al., 2011, 2013). S'ha hipotetitzat que aquest efecte ansiolític seria el resultat d'un increment en l'alliberació d'oxitocina i un augment de l'activitat en l'àrea prefrontal ventromedial juntament amb una disminució de l'activitat en l'amígdala. A més, està ben establert que l'MDMA provoca una alliberament de NA i cortisol que podria facilitar l'extinció de records associats a situacions perilloses (Johansen & Krebs, 2009). Conseqüentment, els animals amb uns nivells d'ansietat més baixos poden gestionar millor les noves situacions, donant lloc a un increment de l'exploració.

En un altre grup d'animals, una setmana després del tractament els animals van ser sotmesos a la prova del laberint d'aigua o *Morris Water Maze* (MWM) per avaluar l'aprenentatge espacial i la memòria de referència. Els animals tractats prèviament amb la substància no van mostrar cap dèficit en els processos cognitius, per contra van exhibir un millor aprenentatge en els dies dos i quatre, contràriament a l'esperat. Per tal d'examinar la flexibilitat en l'habilitat d'aprendre un procés nou, l'últim dia després de la prova de memòria, es va dur a terme l'aprenentatge invertit o *reversal learning*, on la plataforma es troba en el quadrant oposat i els animals han de ser capaços de re-aprendre la nova posició de la plataforma tan sols en tres proves. Tal com el test es va anar desenvolupant, el grup tractat amb MDMA va demostrar una millor habilitat en el re-aprenentatge. A la vista d'aquests resultats vam voler sotmetre els animals a un test de memòria més restrictiu, disminuint els dies d'adquisició i incrementant el temps entre proves, per a dificultar la seva memorització. Sorprenentment, els animals administrats amb MDMA van exhibir una millor puntuació tant en l'adquisició com en la prova de memòria. Aquests efectes van desaparèixer un mes després del tractament. En la literatura, els resultats sobre els efectes de les amfetamines en l'aprenentatge són motiu de controvèrsia. Per exemple, Sprague i col. (2003) no van observar diferències en l'adquisició en el test MWM en animals tractats amb MDMA, però sí un dèficit en el test de memòria (Sprague et al., 2003). En canvi, Brown i col. (2000) van descriure que l'administració de D-amfetamina després de cada prova en el MWM facilitava l'aprenentatge d'aquesta tasca (Brown et al., 2000). Cal destacar que el grau de la lesió, el dèficit que aquesta pugui provocar i la taxa de recuperació depenen de diversos factors mencionats anteriorment. S'han descrit diferències en l'efecte de l'MDMA segons l'edat de l'animal (Broening et al., 2001; Thompson et al., 2009). Així, s'ha observat que els animals periadolescents són més resistents als efectes d'aquesta substància. Colado i col. (1997) van descriure que el cervell de rates joves disposava d'un alt sistema de captura de radicals lliure que fa que aquests animals siguin més resistents als efectes neurotòxics de l'MDMA (Colado et al., 1997). A més, l'estadi de maduració en el qual es troba el cervell en el moment de l'exposició també juga un paper molt important en l'esdevenir dels resultats, ja que els principals

sistemes de neurotransmissió es troben en fase de remodelació. Addicionalment, els efectes de l'MDMA en el MWM semblen dependre, a més d'aquests factors, de l'estrès (D'Hooge & De Deyn, 2001). En el nostre estudi els animals exposats al derivat amfetamínic van mostrar un comportament ansiolític, el qual podria ajudar a la capacitat d'adaptació en front d'una situacions nova. Cal recordar que el MWM es considera un test de motivació aversiu, el qual pot suposar un cert grau d'estrès pels animals. De fet, aquests resultats tampoc ens haurien de sorprendre si es té en compte que els derivats amfetamínics indueixin un increment en la capacitat de concentració, com és el cas d'un anàleg, el metilfenidat, utilitzat en terapèutica pel tractament del dèficit d'atenció i hiperactivitat en nens.

Les alteracions en el comportament i en certes funcions fisiològiques venen donades per alteracions a nivell molecular. Canvis en l'HC que resultin de l'aprenentatge, l'enriquiment ambiental, el consum de substàncies d'abús o d'una recuperació després d'un dany cerebral estan tots ells associats amb alteracions estructurals en circuits rellevants del SNC. Entre moltes altres neuroadaptacions que ocorren després de l'administració repetida d'aquestes substàncies, s'han observat alteracions en la morfologia cel·lular incloent canvis en les espines dendrítiques. La sinaptogènesis associada amb les experiències com l'aprenentatge o la complexitat ambiental es reflecteix en canvis en el nombre d'espines dendrítiques o modificacions en la forma de les ja existents (Rampon et al., 2000; Tsay & Yuste, 2004).

En el nostre estudi el tractament amb MDMA va produir una disminució d'espines dendrítiques en la regió CA1 de l'HC dotze dies després del tractament, conseqüència probablement relacionada amb l'efecte neurotòxic de la substància sobre els terminals serotoninèrgics. Aquest efecte va ser revertit quan els animals van ser sotmesos al test del MWM. Quan es va comparar la densitat d'espines entre els animals sotmesos al MWM en front dels que no van realitzar la prova es va observar un increment significatiu en els animals entrenats. A més a més, aquests animals també van presentar un increment dels nivells de la proteïna PSD95, un marcador sinàptic. És important emfatitzar que el tipus d'alteracions estructurals observades amb la tècnica de Golgi no proporciona informació del funcionament cel·lular o dels propis

circuits. De fet, alteracions aparentment similars en les dendrites produïdes per diferents tractaments, pot tenir resultats molt diversos en la funcionalitat i circuit cel·lular si els inputs sinàptics estan reordenats diferentment. A més a més, la resposta pot ser totalment diferent segons l'àrea estudiada. (Robinson & Kolb, 2004).

Diverses hipòtesis podrien explicar els efectes neuroplàstics en els animals tractats amb el derivat amfetamínic. L'MDMA actua com agonista del receptor 5-HT_{2A}, el qual es troba extensament expressat en àrees corticals, on participa en processos d'atenció. A més a més, s'ha observat un efecte positiu en aquest sentit dels agonistes dels receptors 5-HT_{2A/2C}, que podria ser particularment eficient en situacions on la dificultat de la tasca es troba incrementada, com seria el cas del MWM restrictiu (Buhot et al., 2000). Tanmateix, l'MDMA provoca també un alliberament d'acetilcolina en el PFC que podria ser el resultat d'una acció indirecta de la pròpia substància o a través de l'activació dels receptors 5-HT₂ (Acquas et al., 2001; Nair & Gudelsky, 2006). La gran majoria de receptors serotoninèrgics interaccionen amb el sistema colinèrgic en l'HC i el còrtex frontal, els quals representen els principals substrats subjacents en els processos d'aprenentatge i memòria.

Tant la 5-HT com el factor tròfic BDNF juguen un paper clau en la regulació sinàptica, neurogènesis i la supervivència cel·lular en el cervell adult. Aquestes dos senyals funcionen sovint com un conjunt per regular aquests processos de plasticitat. L'activació dels receptors de 5-HT acoblats a la producció d'cAMP i l'activació de CREB indueixen la transcripció del gen de BDNF. D'altra banda, el BDNF pot estimular el creixement i l'*sprouting* en els axons de neurones serotoninèrgiques, incrementant d'aquesta manera el nombre de sinapsis. Tant el BDNF com la 5-HT poden activar gens que actuen de manera complementària en la plasticitat neuronal i la supervivència cel·lular (Mattson

et al., 2004). En el nostre estudi, els nivells de BDNF es van veure augmentats pel tractament de l'MDMA, els quals van ser majors, encara que no significativament, en els animals sotmesos a l'aprenentatge. Diversos autors han observat una regulació a l'alça en

l'expressió de BDNF en diferents àrees del cervell després de l'administració de l'MDMA, que pot diferir segons el regim administrat o el temps d'abstinència de la substància (Martínez-Turrillas et al., 2006; Hemmerle et al., 2012). Addicionalment, Angelucci i col. (2010) van reportar nivells elevats de BDNF en sèrum en consumidors d'MDMA (Angelucci et al., 2010). L'increment de BDNF observat en els nostres animals podria ser un mecanisme compensatori del cervell per restaurar el dany serotoninèrgic, o el resultat de l'activació per part de l'MDMA de diferents receptors, com els receptors serotoninèrgics acoblats a proteïnes G, els quals activarien quinases dependents de Ca^{2+} o dependents de diacilglicerol (DAG), o a través dels receptors nicotínics α_7 que sabem associats a la via BDNF-TrkB (*Tyrosine receptor Kinase B*, el receptor del BDNF) (Serres & Carney, 2006). Cal destacar que el BDNF incrementa la densitat d'espines dendrítiques i en les sinapsis millora la LTP, procés vinculat amb l'enfortiment sinàptic relacionat amb l'aprenentatge i la memòria (Alonso et al., 2004; Bramham & Messaoudi, 2005).

Per tant, l'administració d'aquest regim d'MDMA sobre rates adolescents no tan sols no ha produït un dèficit de memòria en els diferents test realitzats, sinó que sota condicions restrictives o de més dificultat, el grup tractat amb el derivat amfetamínic va gestionar millor aquests tests obtenint millors resultat. Aquesta millora es correlaciona amb un increment en la densitat de les espines dendrítiques en la regió CA1 de l'HC. Aquest resultat podria ser la conseqüència d'una sinèrgia entre la plasticitat produïda per la pròpia substància juntament amb la plasticitat que genera el procés d'aprenentatge i memòria. L'increment de BDNF observat en els animals tractats podria estar involucrat en el mecanisme subjacent de plasticitat. No podem descartar que aquesta millora en l'aprenentatge i la memòria sigui per un increment en l'atenció de l'animal a través de l'activació dels receptors 5-HT_{2A}, o per una disminució de l'ansietat amb una ràpida adaptació a les situacions noves, o per la combinació dels dos processos.

4.1.2 Efectes de l'MDMA en ratolí

En el cervell de ratolí, aquesta substància mostra un perfil neurotòxic que difereix significativament de l'observat en rates (O'Shea et al., 2001), on els efectes d'aquesta substància recauen principalment en l'estriat mostrant poca afectació a nivell d'HC. A més a més, sembla tenir molt poc efecte sobre l'enzim TPH en el cervell de ratolí (Green et al., 2003). De manera que estudis focalitzats en les conseqüències a llarg termini sobre l'efecte d'aquesta substància en l'HC de ratolí són escassos. Ha quedat evidenciat que l'MDMA és capaç de produir plasticitat en l'HC i afectar els processos cognitius, per tant l'objectiu principal de l'estudi amb ratolins va ser determinar l'efecte d'aquesta substància sobre la plasticitat i la memòria, en un model que no produeix toxicitat serotoninèrgica.

Per tal d'imitar el consum clàssic d'MDMA en els joves adolescents durant els caps de setmana, es va escollir un règim de dosificació setmanal on les dosis es van anar incrementant paulatinament al llarg del tractament. Cal destacar que la finalitat principal de l'estudi no era provocar un efecte neurotòxic dopaminèrgic, per tant la dosis més alta utilitzada va ser molt menor que l'establerta com a tòxica (dosis tòxica: 25mg/kg, 3 cops al dia) (Colado et al., 2001), encara que la durada del tractament va ser extensa per tal d'abastar tot el període adolescent i l'adultesa primerenca. Com s'ha esmentat amb anterioritat, les substàncies psicoestimulants produeixen modificacions estables en el cervell que poden durar molt de temps inclús després d'haver deixat de consumir la droga. Conseqüentment, es va voler determinar si els efectes produïts a curt termini podien ser encara observats mesos després de cessar l'administració. Així, els animals es van sacrificar quinze dies (curt termini) o tres mesos (llarg termini) després de l'última dosis.

Per valorar si el tractament havia provocat neurotoxicitat dopaminèrgica es van determinar els nivells de neurotransmissors en estriat i es va comptabilitzar el número de neurones TH⁺ en SN. Malgrat no utilitzar dosis neurotòxiques, dos setmanes després del tractament els animals exposats al derivat amfetamínic van mostrar una reducció en el número de neurones dopaminèrgiques en SN. Per tant,

cal remarcar que tot i utilitzar dosis per sota de l'establerta com a tòxica, la durada de l'exposició és un component clau en la neurotoxicitat d'aquesta substància. Aquest resultat observat en SN concorda amb els resultats observats per Costa i col. (2013) on també van reportar una reducció del número de neurones dopaminèrgiques amb un tractament no tòxic, perllongat i esporàdic d'MDMA (Costa et al., 2013). Aquesta reducció encara va ser evident tres mesos post-tractament, indicant un efecte irreversible sobre aquestes neurones. La falta de recuperació neuronal estaria en acord amb l'estudi de Granado i col. (2008) els quals també van descriure una reducció en el nombre de neurones dopaminèrgiques en la SNpc un més després d'un règim neurotòxic, conclouent que l'efecte de l'MDMA sobre aquestes neurones era irreversible (Granado et al., 2008b).

En referència a l'estriat, els nivells de DA i el seu principal metabòlit DOPAC es van veure lleugerament reduïts a curt termini en els animals exposats al derivat amfetamínic. Aquesta disminució de DA es va correlacionar amb una reducció de l'activitat locomotora observada en aquests grup. Tant els nivells de neurotransmissors com l'activitat locomotora es van recuperar tres mesos després, indicant així un efecte transitori sobre aquests marcadors. Això suggeriria un increment en la síntesi de catecolamines o un fenomen compensatori d'*sprouting* dels terminals dopaminèrgics (Granado et al., 2008b; Costa et al., 2013).

En canvi, quan vam determinar els nivells de la proteïna TPH₂ en HC, un marcador serotoninèrgic, no es van observar canvis pel tractament amb MDMA en cap dels dos períodes analitzats. Per tal d'estudiar els efectes sobre la memòria, tots els animals van realitzar el test de reconeixement d'objectes una setmana abans del sacrifici. El grup tractat amb el derivat amfetamínic no va manifestar diferències respecte al seu control quan en el test es va utilitzar un temps de retenció curt (1h), en canvi amb un temps de retenció llarg (24h) sí que van exhibir un dèficit de memòria, el qual encara va ser evident amb els animals que van realitzar el test tres mesos després. Aquestes diferències podrien ser degudes a que el tractament afectés diferents àrees. S'ha descrit que mentre el còrtex perirrinal està involucrat en el reconeixement d'objectes després d'un interval de retenció curt, l'HC és responsable pel reconeixement d'objectes després d'un interval de

retenció llarg (Reger et al., 2009). Per tant, l'HC mitjançant la codificació de la memòria de l'objecte, intervé en la forta preferència per l'objecte nou després d'un interval de retenció llarg, però no breu (Hammond et al., 2004). Així, malgrat la no observar canvis en la TPH₂ en l'HC, sembla que el tractament amb l'MDMA va afectar significativament el funcionament d'aquesta estructura. Diversos autors han reportat en rata canvis a llarg termini en diferents comportaments després de l'administració d'MDMA sense produir dèficits en els nivells de 5-HT o en el 5-HTT (Fone et al., 2002; Rodsiri et al., 2011).

L'expressió específica de determinats gens d'expressió immediata (*IEGs: immediate-early genes*) es induïda per l'activitat neuronal, que produeix canvis estables en les sinapsis (Abraham et al., 1993; Worley et al., 1993), i per la formació de certes conductes (Nagahara & Handa, 1995; Vann et al., 2000). Això ha donat lloc a la hipòtesi que l'expressió d'aquests IEG juguen un paper en els mecanismes de neuroplasticitat necessaris pel procés de consolidació de la memòria (Robertson, 1992; Dragunow, 1996; Tischmeyer & Grimm, 1999). L'activació dels receptors D1 pot induir una fosforilació del factor de transcripció CREB via cAMP i PKA, el qual sota la seva forma activada desencadena l'expressió de certs IEG, com *Arc*, *c-Fos* i *Bdnf* (Lovenberg et al., 1991). En el nostre estudi, els animals sotmesos al derivat amfetamínic van mostrar uns nivells de fosforilació de CREB elevats inclús dos setmanes després del tractament. A més a més, aquest increment en la fosforilació va anar acompanyat per un increment de l'expressió tant gènica com a nivell de proteïna de c-Fos, indicant una forta activació cel·lular. Resultats similars van ser publicats per Calabrese i col. (2013) els quals van observar un increment tant de l'expressió de *c-Fos* com *Arc* un més després d'un tractament amb amfetamina durant set dies (Calabrese et al., 2013). Els autors hipotetitzen que l'augment sostingut d'aquests IEGs podria ser el resultat d'un enfortiment exagerat de les sinapsis el que representaria un estímul que interferiria en la neuroplasticitat fisiològica a causa d'una saturació sinàptica. D'altra banda, alguns autors suggereixen també que l'expressió continuada de c-Fos precedeix a la mort cel·lular, indicant així que un increment perllongat en aquest IEG actuaria com a marcador de mort neuronal (Schreiber et al., 1993;

Smeyne et al., 1993; Sakhi et al., 1994). Tres mesos després els nivells tant de c-Fos com de p-CREB van ser restaurats.

L'activació de CREB també porta a la regulació d'*Arc*, el qual juga un paper important en la plasticitat sinàptica, reorganitzant el citoesquelet i regulant l'activitat de la CaMKII localitzada en les dendrites (Lyford et al., 1995; Wallace et al., 1998). L'expressió d'*Arc* es regulada per l'estimulació que indueix la LTP i per l'activitat fisiològica neuronal. Un altre regulador d'*Arc* és el BDNF, on s'ha descrit que l'aplicació local de BDNF en l'HC desencadena LTP, la qual està associada amb l'activació de CREB dependent de la quinasa que regula l'expressió extracel·lular (*ERK: extracellular signal-regulated protein kinase*) i la regulació a l'alça d'*Arc*, que és ràpidament alliberat a les dendrites on allí es traduït (Ying et al., 2002). En el nostre estudi l'expressió gènica i els nivells de proteïna d'*Arc* van incrementar a curt termini després de l'administració de l'MDMA, mostrant així un fort efecte sobre la plasticitat. Tres mesos després del tractament encara va ser evident un increment en l'expressió gènica d'*Arc*, indicant un efecte perllongat en la plasticitat. Beveridge i col. (2004) van observar un increment del mRNA d'*Arc* en la CA1 vint-i-dos dies després d'una única dosis d'MDMA en rates, per tant tenint en compte el nostre règim de tractament de vuit setmanes no es sorprenent que tres mesos després els nivells del mRNA encara estiguin elevats. Aquests autors hipotetitzen que la inducció d'*Arc* no es controlada per la 5-HT, ja que la disminució d'aquest NT no sembla atenuar l'expressió d'*Arc*. A més especulen que l'augment d'*Arc* podria interrompre la plasticitat neuronal i desencadenar una disfunció cognitiva (Beveridge et al., 2004). A més a més, s'ha reportat que el tractament amb metamfetamina i cocaïna també incrementa els nivells d'*Arc* en diferents zones del cervell i que aquest increment es revertit pels antagonistes del receptor D1 (SCH23390) o per l'antagonista dels receptors NMDA (MK-801) (Fosnaugh et al., 1995; Kodama et al., 1998). Tenint en compte que l'MDMA produeix un alliberament tant de dopamina com de glutamat en HC (Anneken & Gudelsky, 2012), podríem especular que aquest increment d'*Arc* podria venir mediat per l'activació dels receptors D1 i els NMDA, la qual podria mostrar una

potenciació sinèrgica per induir l'expressió del mRNA d'*Arc* (Kodama et al., 1998).

Dues setmanes després del tractament també es va observar un increment del mRNA del *Bdnf*, que no va anar acompanyat d'un augment de la síntesi proteica. A nivell cel·lular l'expressió del mRNA augmenta quan els receptors glutamatèrgics tipus AMPA són activats (Zafra et al., 1990; Lauterborn et al., 2000). A més a més, s'ha observat que un increment de Ca^{2+} a través dels receptors NMDA també pot incrementar l'expressió del mRNA. Hem descrit que un tractament amb MDMA pot produir una disrupció en la homeòstasis del Ca^{2+} que pot afavorir un alliberament de glutamat en l'HC (Abad et al., 2014), el qual podria donar lloc a aquest increment d'expressió del mRNA. Contràriament als resultats observat a curt termini, tres mesos després vam observar només un increment en la proteïna de BDNF, ja que tal com hem observat en l'estudi en rata un tipus d'exposició més curta i neurotòxica, difereix amb els resultats obtinguts en ratolí a curt termini. Aquesta diferència entre l'expressió i la síntesi de proteïna mostra que una exposició perllongada a l'MDMA pot afectar diferencialment la regulació de la transcripció i traducció del BDNF. Aquestes discrepàncies també van ser observades després d'una exposició repetida amb cocaïna, indicant una afectació de la transcripció i traducció, i una alteració en el processament de la neurotrofina (Fumagalli et al., 2007). Cal dir que diversos autors han confirmat un augment en els nivells de BDNF (Meredith et al., 2002; Graham et al., 2007), que es consoliden i persisteixen en el temps durant l'abstinència a les substàncies psicoestimulants (Grimm et al., 2003; Pu et al., 2006). Per exemple, Grimm i col. (2003) van observar un increment dels nivells proteics de BDNF tres mesos després de finalitzar el tractament amb cocaïna en l'àrea ventral tegmental (VTA), amígdala i en el nucli accumbens (NAc) (Grimm et al., 2003). Els autors correlacionen aquest increment amb els processos de sensibilització i d'addicció induïts per les substàncies d'abús.

Està ben establert que els receptors NMDA estan implicats en les conductes addictives en les drogues d'abús, a més de ser necessaris per la plasticitat sinàptica associada als mecanismes d'aprenentatge i

memòria. S'ha descrit que el complex de la subunitat NR2B amb la proteïna PSD-95, una proteïna post-sinàptica que es troba exclusivament localitzada a les sinapsis glutamatèrgiques, juga un paper important en la regulació de la sinàptogènesis, plasticitat sinàptica i en els processos d'aprenentatge i memòria (Migaud et al., 1998; Kennedy, 2000). També la subunitat NR1 dels receptors NMDA de la CA1 d'HC està implicada en la formació de la LTP hipocampal. La sinaptofisina és una proteïna que es troba a les vesícules pre-sinàptiques que contenen el NT i estaria involucrada en la formació de les sinapsis i l'exocitosis (Wiedenmann & Franke, 1985). En el nostre estudi l'únic que va mostrar una tendència a la baixa en els seus nivells totals va ser la subunitat NR1, mentre que en els altres marcadors no es va observar cap canvi significatiu. Cal recordar que l'única subunitat indispensable per la formació dels receptors NMDA és la NR1, per tal aquesta tendència a la baixa podria indicar una alteració en aquests receptors. Que no s'observin alteracions en la NR2B podria ser per un canvi en la formació de les subunitats dels receptors, ja que està descrit que tal com els individus maduren aquesta subunitat és intercanviada per la NR2A, la qual també està unida a la PSD95 (Tsien, 2000; Li & Tsien, 2009).

En base als resultats, es podria postular que un increment en la plasticitat podria donar lloc a una plasticitat maladaptativa, i conseqüentment ser la causa dels dèficits de memòria observats en els animals. D'altra banda, si és té en compte la hipòtesi que una expressió sostinguda de c-Fos és un preludi de mort neuronal, també podríem especular que el tractament hagués causat més toxicitat a l'HC que la pròpiament esperada, i que l'increment sostingut tant d'Arc com BDNF fos un mecanisme compensatori del cervell per intentar restaurar el dany produït.

4.2 Estudi dels efectes de l'MDMA en un model d'excitotoxicitat

S'han descrit alguns casos on el consum d'MDMA produeix convulsions, probablement relacionades majoritàriament amb els seus efectes sistèmics, com la hiponatrèmia i la hipertèrmia (Zagnoni & Albano, 2002; Giorgi et al., 2006). A més aquest efecte també pot venir donat per alteracions en el sistema monoaminèrgic o glutamatèrgic, ja que recentment s'ha publicat que l'MDMA és capaç d'alliberar glutamat en l'HC (Anneken & Gudelsky, 2012). Tal com s'ha mencionat anteriorment, un augment de glutamat pot donar lloc a un procés excitotòxic, i són pocs els estudis que s'han focalitzat en els efectes de l'MDMA sobre aquest procés.

Per dur a terme l'estudi es va utilitzar, igual que en l'estudi anterior, un règim de tractament que imita el consum recreatiu dels adolescents amb dosis que incrementen setmanalment que va abastar, en aquest cas, només el període d'adolescència (quatre setmanes). Es va utilitzar un temps de tractament més curt considerant que els efectes que volíem determinar eren a curt termini. Per tal de valorar la toxicitat del tractament es va realitzar l'estudi de la densitat dels transportadors, DAT en estriat i 5-HTT en hipocamp, el qual va revelar que el règim de dosificació utilitzat no va produir toxicitat en els terminals.

L'avaluació de l'aparició i la intensitat de les convulsions, vint-i-quatre hores després de l'última dosi d'MDMA, va demostrar que l'exposició al derivat amfetamínic va potenciar les convulsions induïdes pel KA, augmentant tant la intensitat de les convulsions com el nombre d'animals que van convulsionar, a més de disminuir el temps de latència. Aquesta potenciació va ser evident sobretot quan els animals van ser injectats amb la dosi de 20mg/Kg de KA, considerada en aquesta soca com a dosi baixa o moderada (Sonn et al., 2010). Aquests resultats es troben en concordança amb els publicats per Giogi i col. (2005), on un tractament previ amb diferents dosis acumulatives d'MDMA va incrementar la susceptibilitat a les convulsions induïdes per KA. Els autors descriuen alteracions persistents en els encefalogrames i una hiperactivitat latent metabòlica en els ratolins exposats a l'MDMA, factors que relacionen amb l'alta susceptibilitat

d'aquests animals a les convulsions provocades pel KA (Giorgi et al., 2005). En el nostre estudi vam observar una alteració en la homeòstasi iònica cel·lular acompanyada d'una disminució en les proteïnes d'unió al Ca^{2+} (*CaBP: Calcium Binding Proteins*), que a més de contribuir al control de la concentració intracel·lular d'aquest catió i participar en nombroses funcions cel·lulars (Yañez M. et al., 2012), marquen subpoblacions de neurones GABAèrgiques, per tant canvis en aquestes proteïnes o en la homeòstasi del Ca^{2+} pot desencadenar un procés d'excitabilitat.

Un dels resultats a destacar a nivell molecular és la potenciació, en els animals tractats prèviament amb l'MDMA, de la neurodegeneració en l'àrea CA1 i de l'astroglíosis, tant en la CA1 com en el DG de l'HC, induïdes pel KA administrat a la dosi de 30mg/kg. Aquesta potenciació podria venir donada per un increment en la concentració del glutamat extracel·lular per part de l'MDMA i potenciat pel KA. Anneken i col. (2012) van descriure un increment sostingut de glutamat en l'HC després de diverses administracions del derivat amfetamínic, postulant que aquest augment podria ser el resultat de l'activació dels receptors 5-HT_{2A} localitzats als astròcits, per part de la 5-HT alliberada per l'MDMA (Anneken & Gudelsky, 2012; Collins et al., 2015). L'activació d'aquests receptors dona lloc a l'activació de la ciclooxigenasa (COX), la qual incrementa la formació de prostanoïds, i aquests alliberen glutamat des dels astròcits (Anneken et al., 2013). Cal destacar, que l'activació d'aquests receptors incrementa l'alliberament de glutamat de manera Ca^{2+} dependent (Meller et al., 2002), i tal com s'ha observat en aquest estudi, l'MDMA pot produir un increment persistent de Ca^{2+} . Per tant, l'alliberament de glutamat induït per l'MDMA podria ser el responsable d'aquesta potenciació en la mort neuronal. Conseqüentment, en aquest grup l'increment en la neurodegeneració va anar acompanyat d'un augment en l'astroglíosis, probablement a causa d'una major toxicitat, i d'un increment de mediadors inflamatoris induïts per l'exposició a l'MDMA (Anneken et al., 2013).

D'altra banda ni el KA 20mg/kg ni l'exposició a l'MDMA van induir *per se* degeneració neuronal i/o neuroinflamació. L'absència de mort neuronal i inflamació en els animals tractats amb el derivat

amfetamínic es correlaciona amb la falta de toxicitat en els terminals dopaminèrgics i serotoninèrgics.

Alguns autors afirmen que l'MDMA causa toxicitat més enllà dels sistemes dopaminèrgics i serotoninèrgics. En la hipòtesi de la toxicitat de l'MDMA descrita per Sprague i col. (1998), la qual es centra en el paper de la DA, les interneurons GABAèrgiques hi juguen un paper clau (Sprague et al., 1998). Alguns autors han confirmat l'afectació d'aquestes neurones per l'administració d'MDMA (Armstrong & Noguchi, 2004; Anneken et al., 2013; Collins et al., 2015). En l'HC, les CaBP, com la Parvalbumina (PV), Calbindina (CB) i Calretinina (CR), s'expressen en diferents subpoblacions d'interneurons GABAèrgiques, l'expressió de les quals es troba disminuïda després de l'administració de KA (Best et al., 1993; Kotti et al., 1996; Yang et al., 1997; Junyent et al., 2011). Donat que la mort neuronal produïda pel KA s'atribueix a un increment de Ca^{2+} intracel·lular resultat de l'activació dels receptors glutamatèrgics, s'ha suggerit la contribució d'aquestes proteïnes en la neuroprotecció en front d'aquesta toxina, ja que desenvolupen un paper clau en el tamponament del Ca^{2+} i en la participació de nombroses funcions cel·lulars, com el transport d'aquest catió a través de les membranes. Cal recordar, que el nostre laboratori va descriure un increment en el Ca^{2+} intracel·lular induït per l'exposició a l'MDMA a través dels receptors nicotínics $\alpha 7$ (Garcia-Ratés et al., 2010). En base aquestes dades prèvies vam voler determinar l'efecte de l'MDMA sobre aquestes proteïnes i comparar-ho amb els efectes produïts pel KA.

El perfil d'expressió que van mostrar les CaBP estudiades després de l'administració d'MDMA en animals adolescents va ser similar a l'observat en els animals tractats amb KA 30g/Kg. Diversos estudis han descrit una disminució en la proteïna CB després de l'administració de KA, reflectint una pertorbació en la homeòstasis del Ca^{2+} i suggerint que aquesta alteració en l'expressió de CB podria estar involucrada en el baix llindar de les cèl·lules a les convulsions (Sloviter, 1989; Yang et al., 1997). L'exposició a l'MDMA va causar una forta reducció en els nivells de CB a l'àrea CA1 de l'HC quaranta-vuit hores post-administració, observant-se el mateix patró en els animals administrats

amb KA30. Probablement, aquesta reducció es deu a una disrupció de la homeòstasi del Ca^{2+} , suggerint alteracions en la dinàmica d'aquesta catió convertint les cèl·lules més susceptibles a un estímul excitatori posterior. A més a més, en el cas de l'MDMA, aquesta reducció podria ser atribuïda també al fet que les aferents serotoninèrgiques del nucli del rafe mitjà, les quals estan afectades per l'exposició a aquesta substància (Sharkey et al., 1991) innerven interneurons GABAèrgiques CB^+ (Freund et al., 1990). En el nostre estudi, l'exposició repetida al derivat amfetamínic va mostrar una lleugera, però no significativa, disminució en la densitat dels terminals serotoninèrgics, que podria donar lloc a una disminució en aquesta proteïna. Els nivells de CB en la CA1 van ser restablerts quatre dies després de l'administració de l'MDMA. En el DG l'MDMA va causar un efecte similar a l'observat en la CA1 a curt termini, en canvi quatre dies després del tractament els resultats van mostrar una regulació a l'alça de l'expressió d'aquesta proteïna, possiblement a causa d'un mecanisme compensatori que podria ser degut a un increment en la neurogènesis o a una estimulació de la síntesi de la proteïna (Lee et al., 1997; Carter et al., 2008). De fet, s'ha descrit que després d'un dany neuronal la neurogènesis incrementa en la zona subgranular del DG (Parent et al., 1997; Sharp et al., 2002; Dong et al., 2003), on en aquesta zona el marcatge amb CB s'utilitza com un marcador de neurones madures (Brandt et al., 2003; Von Bohlen Und Halbach, 2007).

El patró d'expressió de la CR després de l'administració de l'MDMA va ser similar a l'observat per la CB, encara que l'efecte sobre l'àrea CA1 de l'HC va ser més pronunciat. Cal destacar que l'àrea més afectada pel tractament amb MDMA respecte a l'expressió d'aquestes proteïnes va ser la CA1, sobre la qual es va observar una potenciació de la neurodegeneració. Per tant, podríem hipotetitzar que una disminució robusta d'aquestes proteïnes tamponadores de Ca^{2+} deixa les cèl·lules més vulnerables a possibles estímuls excitatoris posteriors, donant lloc a un increment en la mort neuronal. Els nivells de CR van tornar als nivells basals quatre dies després del tractament en les dos àrees estudiades. D'altra banda, Dominguez i col. (2003) van descriure un increment en el marcatge de CR en la zona subgranular del DG després

d'un tractament amb KA. Els autors van concloure que les cèl·lules immunoreactives per CR, malgrat presentar característiques de cèl·lules immadures, no eren producte d'una neurogènesis reactiva, suggerint que podien representar un reservori de cèl·lules granulars pre-existents no completament diferenciades que reaccionen en front d'un dany (Domínguez et al., 2003). Curiosament, l'exposició al derivat amfetamínic, al igual que amb kainat, va produir un increment en el marcatge de cèl·lules CR⁺ en la zona subgranular del DG als dos temps estudiats. Diversos estudis han reportat que un tractament amb MDMA afecta la neurogènesis en la zona subgranular de l'HC. Així, Catlow i col. (2010) van descriure alteracions en la proliferació i la supervivència de la cèl·lula de nova síntesi de manera dosis-dependent en animals adolescents després d'un tractament amb MDMA (Catlow et al., 2010), mentre que en animals adults la capacitat proliferativa dels progenitors hipocampals no es va veure afectada però sí la supervivència de les cèl·lules adultes generades de nou (Hernández-Rabaza et al., 2006). Per tant, es podria postular també que l'augment de cèl·lules reactives a CR i l'increment observat en CB més tard en el DG, podria ser degut a modificacions en la neurogènesis i en el destí d'aquestes cèl·lules, o bé a l'activació de cèl·lules en estat quiescent que reaccionarien en front de l'estímul provocat per l'exposició a l'MDMA. Respecte al KA30, els efectes sobre l'expressió de la CR van ser similars als observats per l'MDMA.

En el nostre estudi l'exposició al derivat amfetamínic, paral·lelament amb el KA30, va produir una disminució del número de PV⁺ especialment en el DG. Aquesta disminució es va veure potenciada en el grup KA20+M. Anneken i col. (2013) també van descriure una disminució de neurones PV⁺ en el DG després d'una exposició a l'MDMA, donant suport al paper del glutamat en la pèrdua d'aquestes neurones GABAèrgiques (Anneken et al., 2013; Collins et al., 2015). A més a més, una disminució en aquesta proteïna està associada a un augment del risc d'un procés epileptogènic (Gorter et al., 2001). Cal recordar que els efectes de l'MDMA sobre la susceptibilitat a les convulsions van ser més evidents en aquest grup.

Finalment, cal destacar que la incubació d'MDMA a concentracions baixes en cultius de neurones corticals va produir una disrupció en l'homeòstasi de les cèl·lules, resultant en un increment en la basal del Ca^{2+} i deixant les cèl·lules més sensibles a l'acció del NMDA, el qual aplicat en el medi provoca l'entrada de Ca^{2+} . En les cèl·lules incubades prèviament amb el derivat amfetamínic, l'NMDA va provocar una entrada menor de Ca^{2+} , probablement a causa d'una saturació d'aquesta catió en les neurones, les quals es van quedar sobrecarregades de Ca^{2+} . Paral·lelament, les cèl·lules incubades amb MDMA també van mostrar una disminució en la concentració basal de Na^+ , donant lloc a una potenciació de la resposta en front a l'aplicació de KA. Aquesta disminució en la basal del Na^+ podria venir donada per una activació de la bomba ATPasa Na^+/K^+ per l'alliberament de catecolamines (Desai & Ho, 1979; Swann et al., 1980). A més, s'ha reportat que l'amfetamina produeix un efecte bifàsic sobre aquesta ATPasa, incrementant la seva activitat a dosis baixes (Rangaraj & Harold, 1978). Una alteració en el gradient del Na^+ pot comprometre la funcionalitat d'altres bombes intercanviadores d'ions, com la bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ participant en la disrupció de l'homeòstasi cel·lular (Kaczorowskis et al., 1984). Aquests resultats *in vitro* poden contribuir a l'explicació dels canvis observats en les CaBP *in vivo* i reforcen la hipòtesi de la disrupció iònica en la susceptibilitat a les convulsions per KA.

4.3 Efectes de l'MDMA sobre la via nigroestriatal en un model de la malaltia d'Alzheimer

Entre el 35-40% dels malalts d'Alzheimer presenten signes extrapiramidals conjuntament amb el deteriorament cognitiu, donant suport a la idea que les neurones dopaminèrgiques també pateixen canvis neurodegeneratius (Lopez et al., 1997). Les neurones que formen la via nigroestriatal mostren diverses característiques patològiques com els cabdells neurofibril·lars, depòsit d'A β , pèrdua neuronal i disminució en el contingut de DA, canvis que suggereixen una implicació clara de la DA en la fisiopatologia del deteriorament i dels símptomes de la AD (Selden et al., 1994; Storga et al., 1996; Burns et al., 2005). Els signes extrapiramidals com la bradicinèsia, tremolors i

trastorns de la marxa, poden ocórrer en els primers estadis o més comunament en els estadis avançats de la malaltia (Portet et al., 2009; Vilalta-Franch et al., 2013), on l'aparició dels quals representa un pronòstic d'evolució negativa. Per tant, si la deficiència en el sistema dopaminèrgic ocorre en estats inicials, el deteriorament cognitiu i l'evolució de la malaltia serà més ràpida. En els darrers anys, diverses dades experimentals evidencien un interès renovat en el paper de la DA en la AD (Martorana & Koch, 2014). De fet, Perez i col. (2005) van mostrar en el model APP^{swe}/PS1^{dE9}, utilitzat en el nostre estudi, com la patologia dopaminèrgica i la deposició amiloide es troben estretament relacionades, postulant un paper causal de l'amiloide en la disfuncionalitat dopaminèrgica (Perez et al., 2005). Cal destacar, que en la FAD que involucra la mutació dE9 de la PS1 s'associa sovint amb trastorns motors, suggerint la possibilitat de la participació de l'estriat en algunes formes de la malaltia (Richner et al., 2009).

Encara que l'MDMA no presenti toxicitat directa sobre els terminals dopaminèrgics en humans (Semple et al., 1999; Reneman et al., 2002), s'han notificat casos de problemes psicomotors en una part dels consumidors (Kuniyoshi M & Jankovic, 2003; O'Suilleabhain & Giller, 2003). Parrot i col. (2002) van descriure tremolors i espasmes en abstinents d'èxtasi depenent del tipus de consum, els quals es van fer més evidents en els consumidors més abusius del derivat amfetamínic, hipotetitzant que els usuaris amb signes psicomotors inicials podrien tenir un risc més elevat de desenvolupar una patologia motora (Parrott et al., 2002). De fet, molts estudis s'han focalitzat en la possible relació entre el consum d'MDMA i la malaltia de Parkinson (Granado et al., 2008b; Flavel et al., 2012; Costa et al., 2013), tenint en compte que en ratolins aquesta substància actua com a neurotoxina dopaminèrgica (Colado et al., 2001; Granado et al., 2008a, 2008b). Però fins a dia d'avui no s'ha dut a terme cap estudi per valorar si un consum abusiu d'èxtasi en l'adolescència podria afavorir un quadre dopaminèrgic en subjectes amb predisposició genètica a la AD, donant lloc a una acceleració de la malaltia amb un pitjor pronòstic.

Per dur a terme el nostre objectiu vam utilitzar els ratolins doble transgènics APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1), el qual està ben establert com

a model de la AD familiar (Garcia-Alloza et al., 2006) i que s'han proposats com a model vàlid per estudiar l'impacte de la deposició d'A β sobre el sistema nigroestriatal (Perez et al., 2005). En el transcurs del procés experimental vam observar canvis progressius entre genotips, tant a nivell de la neuroquímica estriatal com en els experiments de comportament, els quals podrien modular la resposta al tractament amb l'amfetamina. A nivell del comportament, encara que els dos genotips van presentar una reducció de l'activitat locomotora amb l'edat, els animals APP/PS1 van exhibir una activitat motora superior en comparació amb els animals WT en els dos temps estudiats, característica que també va ser descrita per Maroof i col. (2014) (Maroof et al., 2014). En referència a la neuroquímica estriatal, els animals transgènics de tres mesos, tot i mostrar una activitat locomotora més elevada, no van presentar diferències en els nivells tissulars de DA respecte els animals WT, hipotetitzant que la disponibilitat o l'alliberament d'aquest neurotransmissor és diferent segons el genotip, provocant un efecte major en els APP/PS1. A l'edat de sis mesos, aquests animals van seguir manifestant una activitat locomotora superior, però en aquest cas sí que va anar acompanyada d'alteracions en el metabolisme de la DA, com un increment en els nivells de DA i una disminució en el seu recanvi, efectes probablement deguts a l'increment de síntesi de TH i a la disminució en els nivells de MAO-A enregistrats. Aquestes alteracions en la via nigroestriatal podrien venir donades per l'afectació dels terminals dopaminèrgics a causa dels depòsits d'A β , hipòtesi que es reforça amb l'increment observat de peroxidació lipídica i la disminució de la proteïna DAT en l'estriat en aquesta edat. De fet, Liu i col. (2008) descriuen que aquests animals doble transgènics presenten una degeneració dels terminals monoaminèrgics, majoritàriament TH⁺, en diferents àrees cerebrals atribuïble a l'efecte dels depòsits d'A β , que precedeix a la mort neuronal (Liu et al., 2008). A més, tal com s'ha mencionat anteriorment Perez i col. (2005) també van descriure una disfuncionalitat dopaminèrgica en l'estriat dels animals APP/PS1 estretament relacionada amb les plaques amiloides (Perez et al., 2005). Es podria postular que l'increment de TH amb el conseqüent augment en els nivells de DA seria un efecte compensatori transitori, ja que a edats més tardanes (deu-dotze mesos) altres autors no observen diferències

en els nivells d'aquest NT, en canvi sí que s'ha descrit una disminució en els nivells de DOPAC, atribuïble a una possible alteració del metabolisme de la DA causat per una disfuncionalitat de la MAO o del mitocondri (Perez et al., 2005). Diversos estudis han demostrat alteracions mitocondrials en aquest model de FAD. Pedrós i col. (2014) van descriure alteracions en estadis considerats pre-plaques (Pedrós et al., 2014), i Xie i col. (2013) en un estudi realitzat *in vivo* van demostrar la relació directa entre les plaques amiloides i alteracions tant de tipus funcional com estructurals en el mitocondri (Xie et al., 2013). En el nostre estudi, els animals APP/PS1 mostren una disminució dels nivells de la MAO-A als sis mesos, la qual probablement és la responsable d'aquesta alteració en el recanvi de la DA, sense afectar els altres NT. Cal destacar, que la MAO-A es troba majoritàriament en les neurones dopaminèrgiques i noradrenèrgiques, tant en els cossos cel·lulars com en els seus terminals axònics (Willoughby et al., 1988; Westlund et al., 1993), i que el metabolisme de les catecolamines ocorre majoritàriament en el citoplasma de les neurones on es sintetitzen (Eisenhofer, 2004). Tenint en compte que en l'estriat hi predominen els terminals dopaminèrgics, suposadament són aquests els més afectats per la toxicitat produïda per la deposició d'A β . Per tant es podria hipotetitzar que aquesta disminució de la MAO-A vindria donada per l'alteració d'aquests terminals afectant d'aquesta manera només el metabolisme de la DA. Probablement, totes aquestes modificacions observades en els animals APP/PS1 són alteracions que precedeixen als canvis observats en edats més tardanes per altres autors (Perez et al., 2005; Liu et al., 2008; Richner et al., 2009).

Respecte al tractament amb MDMA, en aquest estudi es van seguir les mateixes pautes de tractament i temps de sacrifici utilitzats en el segon treball (Abad et al., 2015). Tres i sis mesos d'edat van ser elegits per investigar l'efecte d'aquesta substància en diferents estadis de la patologia. Dos setmanes després de finalitzar el tractament (3mesos) es considera temps suficient perquè la substància no es trobi en l'organisme i només restin els efectes més persistents, a més en aquesta edat ho considerariem com un estadi anterior a la deposició de plaques amiloides. Als sis mesos la deposició d'aquestes plaques es troba extensament distribuïda per tot el cervell (McGowan et al., 1999), però

el seu nombre encara podria augmentar per l'efecte d'una substància com l'MDMA.

Aquest tractament d'MDMA va provocar una reducció en el nombre de neurones dopaminèrgiques de la SN, en els dos temps estudiats, la qual no es va veure afectada pel genotip, indicant que els ratolins transgènics no mostren una susceptibilitat més alta en aquesta àrea a l'MDMA.

Paràmetres dopaminèrgics i estrès oxidatiu en l'estriat

Efectes a curt termini de l'exposició a l'MDMA

En la prova del camp obert, l'exposició a l'MDMA va reduir significativament l'activitat locomotora en els animals WT, resultat consistent amb la disminució del nombre de neurones dopaminèrgiques en SN i l'aparent depleció de DA i DOPAC en l'estriat. Malgrat la reducció de neurones dopaminèrgiques en SN, els nivells de proteïna de DAT i TH no van mostrar canvis en aquest grup respecte el seu control. Aquests resultats coincideixen amb els resultats publicats per Costa i col. (2014), els quals també van observar una reducció de neurones dopaminèrgiques en SN que no va anar acompanyada d'una disminució de TH en estriat (Costa et al., 2013). Un mecanisme responsable d'aquestes diferències entre àrees podria ser degut al fenomen d'*sprouting* com a mecanisme compensatori dels terminals danyats. Cal esmentar que Granado i col. (2008) ja van descriure una recuperació dels terminals dopaminèrgics després d'un tractament neurotòxic d'MDMA que va tenir lloc a partir del tercer dia post-administració (Granado et al., 2008b). Després d'analitzar aquests resultats on s'observa una disminució en l'activitat locomotora i en el número de neurones dopaminèrgiques en la SN, sense afectació dels nivells de TH i DAT, caldria reflexionar sobre els paràmetres utilitzats per mesurar la lesió en estriat. En el nostre estudi, probablement el paràmetre més fiable seria la determinació dels nivells de DA que reflecteix l'efecte sobre l'activitat locomotora, ja que l'expressió de TH i DAT està sotmesa a una regulació diferent segons el tipus i grau de lesió, i el temps d'abstinència després de l'estímul tòxic.

En referència als animals APP/PS1, el tractament amb MDMA tampoc va produir una reducció dels nivells de TH en estriat, en canvi si que va provocar una reducció de la proteïna DAT, suggerint que en aquest grup el dany provocat sobre els terminals dopaminèrgics va ser major o més lent en la seva recuperació. S'ha descrit que després d'una lesió estriatal es pot produir una regulació a l'alça en l'expressió de mRNA de TH en les neurones restants o en diferents neurones que passen a expressar aquesta proteïna per tal de compensar el dany produït (Nakahara et al., 2001; Jakowec et al., 2004). A més, aquests últims autors van demostrar que després d'una lesió amb la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) les proteïnes TH i DAT diferien en la seva taxa de recuperació, on els nivells de DAT van mostrar una recuperació més lenta, postulant que aquesta diferència en la taxa de recuperació podria jugar un paper clau en els nivells de DA en estriat (Jakowec et al., 2004). En quant als nivells de neurotransmissors, els animals tractats amb MDMA no van manifestar cap descens en comparació amb els seus controls. Amb totes les dades obtingudes no podem explicar aquesta falta d'efecte sobre els nivells de DA, suggerint que un mecanisme addicional sobre aquest sistema aconseguixi recuperar els nivells de DA. Podria especular-se que la disfuncionalitat dopaminèrgica observada en aquests animals als sis mesos (increment de DA i TH, disminució de DAT i MAO-A) estigui latent emmascarant els dèficits dopaminèrgics induïts per aquesta substància.

El mitocondri és el responsable de la producció de la gran majoria de ROS a través de la cadena de transport d'electrons, per tant una alteració perllongada en l'activitat mitocondrial pot donar lloc a un risc en la superproducció d'aquestes espècies tòxiques (Balaban et al., 2005). El PGC-1 α (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha*) és un ampli regulador del metabolisme de l'estrès oxidatiu, coordinant l'expressió de diferents gens que codifiquen per enzims antioxidants (St-Pierre et al., 2006). Sorprenentment, en el nostre estudi l'exposició a l'MDMA va provocar els efectes oposats sobre la proteïna PGC-1 α , depenent del genotip. Aquesta resposta diferent podria ser deguda a dos factors. Primerament, l'exposició de

l'MDMA en els animals APP/PS1 podria haver produït un estrès oxidatiu superior, tal com van indicar els nivells més elevats de 4-HNE. S'ha descrit que l'expressió de PGC-1 α és altament induïda per la producció de ROS, i que aquest al seu torn, regula un sistema de defensa de ROS complex i multifacètic (St-Pierre et al., 2006). Per tant, podria ser que aquest increment observat en els animals APP/PS1 fos un mecanisme de protecció contra l'increment d'estrès oxidatiu observat en aquests animals, tot i que no va ser suficient per tamponar-lo. Mudò i col. (2012) van descriure que una activació de PGC-1 α protegia les cèl·lules dopaminèrgiques de la lesió amb MTPT combatent l'estrès oxidatiu i la viabilitat neuronal (Mudò et al., 2012). O en segon lloc, la resposta a l'estrès oxidatiu podria ser diferent segons el genotip. Cal recordar que aquests animals APP/PS1 presenten alteracions mitocondrials en aquesta edat (Pedrós et al., 2014), per tant davant d'una substància tòxica la resposta de la cèl·lula pot ser totalment diferent en comparació amb un animal WT. Evidentment, els dos processos poden ser possibles.

Efectes a llarg termini de l'exposició a l'MDMA

Malgrat observar encara una disminució en el nombre de neurones dopaminèrgiques en la SN tres mesos després de finalitzar el tractament, els animals exposats a l'MDMA no van mostrar alteracions dopaminèrgiques en l'estriat, suggerint o bé un efecte transitori o bé un efecte compensatori sobre aquesta àrea. Només el grup dels animals APP/PS1 tractats amb el derivat amfetamínic va exhibir un efecte residual en el recanvi de la DA, el qual va mostrar una disminució significativa.

El nombre de plaques A β en l'estriat als sis mesos és menor que les observades en còrtex i hipocamp a causa del patró que presenta la deposició de les plaques amiloides (McGowan et al., 1999). Conseqüentment, el nombre de plaques en l'estriat dels animals APP/PS1 control encara és baix. En el nostre estudi, l'exposició perllongada a l'MDMA va causar un augment en el número de plaques amiloides en l'estriat en els animals adults. Cal destacar, que aquest és el primer estudi que demostra que un consum abusiu del derivat

amfetamínic pot potenciar la deposició de plaques A β , sent aquest resultat de gran rellevància tenint en compte que l'MDMA és una de les substàncies més consumides en els països occidentals.

Inesperadament, els nivells de PGC-1 α encara van romandre afectats en els animals exposat a l'MDMA tres mesos després de finalitzar el tractament. L'increment observat podria ser un efecte residual a causa de l'estrès oxidatiu generat per la substància. De fet, encara es va observar un increment en els nivells de 4-HNE en els animals WT. Sorprenentment, en els animals doble transgènics exposats al derivat amfetamínic els nivells de 4-HNE es van veure reduïts. La nostra hipòtesi respecte aquest resultat inesperat és que en aquest grup la producció d'estrès oxidatiu a causa de l'MDMA va ser major que en els animals WT, i possiblement va experimentar una producció constata i creixent a causa del depòsit d'A β , tal com pot apreciar-se per l'increment en els nivells de 4-HNE en el grup APP^{swe}/PS1^{dE9} control. La formació continua de 4-HNE podria donar lloc a una regulació a l'alça de les vies de metabolització d'aquest compost, ja que s'ha descrit que el 4-HNE és capaç d'estimular l'activitat de la glutatió S-transferasa, el seu enzim detoxificant principal (Zheng et al., 2014). S'ha reportat que les cèl·lules sotmeses a un estrès oxidatiu adquireixen la capacitat d'excloure el 4-HNE del seu entorn més ràpidament (Cheng et al., 2001). Consistents amb aquests resultats, Awasthi i col. (2004) van descriure que quan les cèl·lules estaven preconditionades amb estímuls oxidants aconseguïen metabolitzar i excloure el 4-HNE intracel·lular a un ritme més ràpid (Awasthi et al., 2004). D'altra banda, aquest increment sostingut dels nivells de PGC-1 α en els animals APP/PS1 exposats a l'MDMA podria contribuir a l'increment del depòsit de plaques A β , ja que s'ha publicat que la sobreexpressió de PGC-1 α en un model de la AD exacerba la deposició de plaques amiloides, probablement per una disrupció en l'activitat proteosomal (Dumont et al., 2014).

En base als resultats, es podria hipotetitzar que la hiperactivitat locomotora descrita inicialment en els animals APP/PS1 podria ser deguda a les alteracions observades en l'estriat d'aquests animals als sis mesos, bàsicament per l'increment dels nivells de DA i la disminució

del seu recanvi, acompanyada d'un augment de TH i un descens de MAO-A. L'exposició intermitent a l'MDMA provoca una reducció del nombre de neurones dopaminèrgiques en SN, que és independent del genotip. Malgrat no observar una disminució en els nivells de DA en els animals doble transgènics dos setmanes després del tractament, es suggereix una lesió major en aquest grup, tal com indica la disminució en la proteïna DAT i l'augment en l'estrès oxidatiu, característiques existents a edats més tardanes en aquets animals APP/PS1. Per tant, sembla que l'exposició a l'MDMA pugui accelerar la disfuncionalitat dopaminèrgica observada en aquest model de FAD. L'exposició abusiva durant l'adolescència incrementa el nombre de plaques A β en estriat en els animals adults, probablement contribuint a un pitjor pronòstic del procés neurodegeneratiu.

CONCLUSIONS

The conclusions of the present doctoral thesis are the following:

5.1 Study of the effects of MDMA on plasticity and memory

Effects of MDMA in rats

- 1.1) The treatment used in our study does not produce neither memory loss nor learning alterations in the water maze test; in contrast, the MDMA-exposed animals show an improved ability both in the learning of a new task and in the restrictive water maze, as well as an anxiolytic behavior.
- 1.2) The treatment with MDMA induces a decrease in spine density in the CA1 region, which is reversed by training the rats in the water maze.
- 1.3) MDMA produces an increase of BDNF in the hippocampus, which is not related to training.

Effects of MDMA in mice

- 1.4) Intermittent and prolonged MDMA administration during adolescence causes a loss in long-term memory, even three months after finishing the treatment.
- 1.5) MDMA produces a strong induction of c-Fos and p-CREB, triggering the activation of other IEGs, such as Arc and BDNF, probably giving as a response a maladaptive plasticity, resulting in memory deficits, which are not related to NMDA receptor subunits.

Global effects of MDMA on plasticity and memory

- 1.6) MDMA increases plasticity in the hippocampus and affects the memory process; however, the enhancement or impairment of this process is dependent on the pattern of consumption.

5.2 Study of MDMA in a model of excitotoxicity

- 2.1) Intermittent MDMA administration during adolescence enhances kainic acid convulsive susceptibility and potentiates kainate-induced neurodegeneration and astrogliosis. These effects are likely the result of the ionic cellular homeostatic disruption, in addition to the reduction of the expression of calcium binding proteins.

5.3 Effects of MDMA on the nigrostriatal pathway in a familial model of Alzheimer's disease.

- 3.1) APP^{swe}/PS1^{dE9} animals show age-related dopaminergic alterations, which at six months of age are manifested by an increase in dopamine levels and a reduction in its turnover, probably due to a rise of TH synthesis and decreased levels of MAO-A and DAT. Furthermore, at both time points studied these animals exhibit greater locomotor activity, which is likely attributable to this dopaminergic dysfunction.
- 3.2) Initially, the lesion induced by MDMA in the striatum of the transgenic animals is apparently greater than in the wild-type mice. This is due to the reduction in DAT levels and the increase of PGC1- α , in addition to the higher levels of lipid peroxidation observed, resulting in an acceleration of the dopaminergic dysfunction observed in these animals in later stages of life.
- 3.3) The intermittent and prolonged exposure to MDMA in adolescence causes an increase in the number of amyloid plaques in the striatum of adult animals.

BIBLIOGRAFIA

Abad S, Camarasa J, Pubill D, Camins A, Escubedo E (2015)

Adaptive Plasticity in the Hippocampus of Young Mice Intermittently Exposed to MDMA Could Be the Origin of Memory Deficits. *Mol Neurobiol*. DOI 10.1007/s12035-015-9618-z

Abad S, Junyent F, Auladell C, Pubill D, Pallàs M, Camarasa J, Escubedo E, Camins A (2014) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine enhances kainic acid convulsive susceptibility. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 54C:231–242.

Abe T, Sugihara H, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca²⁺ signal transduction. *J Biol Chem* 267:13361–13368.

Abel T, Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11:180–187.

Abraham WC, Mason SE, Demmer J, Williams JM, Richardson CL, Tate WP, Lawlor PA, Dragunow M (1993) Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56:717–727.

Acquas E, Marrocu P, Pisanu A, Cadoni C, Zernig G, Saria A, Di Chiara G (2001) Intravenous administration of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine) enhances cortical and striatal acetylcholine release in vivo. *Eur J Pharmacol* 418:207–211.

Allinson TMJ, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci Res* 74:342–352.

Alonso M, Medina JH, Pozzo-Miller L (2004) ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal

CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* 11:172–178.

Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* 31:571–591.

Angelucci F, Ricci V, Martinotti G, Palladino I, Spalletta G, Caltagirone C, Bria P (2010) Ecstasy (MDMA)-addicted subjects show increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor, independently from a rise of drug-induced psychotic symptoms. *Addict Biol* 15:365–367.

Anggono V, Huganir RL (2012) Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 22:461–469.

Anneken JH, Cunningham JI, Collins SA, Yamamoto BK, Gudelsky GA (2013) MDMA increases glutamate release and reduces parvalbumin-positive GABAergic cells in the dorsal hippocampus of the rat: Role of cyclooxygenase. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:58–65.

Anneken JH, Gudelsky GA (2012) MDMA produces a delayed and sustained increase in the extracellular concentration of glutamate in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 63:1022–1027.

Arias-Cavieres A, Rozas C, Reyes-Parada M, Barrera N, Pancetti F, Loyola S, Lorca RA, Zeise ML, Morales B (2010) MDMA (“ecstasy”) impairs learning in the Morris Water Maze and reduces hippocampal LTP in young rats. *Neurosci Lett* 469:375–379.

Armstrong BD, Noguchi KK (2004) The neurotoxic effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and methamphetamine on serotonin, dopamine, and GABA-ergic terminals: An in-vitro autoradiographic study in rats. *Neurotoxicology* 25:905–914.

Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325–337.

Awasthi YC, Yang Y, Tiwari NK, Patrick B, Sharma A, Li J, Awasthi S (2004) Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free Radic Biol Med* 37:607–619.

Azmitia EC, Murphy RB, Whitaker-Azmitia PM (1990) MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: evidence for Ca²⁺-dependent toxicity linked to release. *Brain Res* 510:97–103.

Bahn S, Volk B, Wisden W (1994) Kainate receptor gene expression in the developing rat brain. *J Neurosci* 14:5525–5547.

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120:483–495.

Barbosa DJ, Serrat R, Mirra S, Quevedo M, Gómez de Barreda E, Avila J, Fernandes E, Bastos MDL, Capela JP, Carvalho F, Soriano E (2014) MDMA impairs mitochondrial neuronal trafficking in a Tau- and Mitofusin2/Drp1-dependent manner. *Arch Toxicol*. 88:1561-1572

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3:205-214.

Battaglia G, Yeh SY, De Souza EB (1988) MDMA-induced neurotoxicity: Parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol Biochem Behav* 29:269–274.

Baumann MH, Rothman RB (2009) Neural and Cardiac Toxicities Associated With 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), *Int Rev Neurobiol*. 88:257-296.

Baumann MH, Wang X, Rothman RB (2007) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: A reappraisal of past and present findings. *Psychopharmacology (Berl)* 189:407–424.

BIBLIOGRAFIA

Ben-Ari Y (1985) Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 14:375–403.

Ben-Ari Y, Cossart R (2000) Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci* 23:580–587.

Benedict RHB, Munschauer F, Zarevics P, Erlanger D, Rowe V, Feaster T, Carpenter RL (2008) Effects of l-amphetamine sulfate on cognitive function in multiple sclerosis patients. *J Neurol* 255:848–852.

Beninger RJ, Gerdjikov T V. (2004) The role of signaling molecules in reward-related incentive learning. *Neurotox Res* 6:91–103.

Best N, Mitchell J, Baimbridge KG, Wheal H V. (1993) Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci Lett* 155:1–6.

Benloucif S, Keegan M, Galloway M (1993) Serotonin-Facilitated Dopamine Release in Vivo: Pharmacological Characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 265:373–377.

Beveridge TJR, Mehan AO, Sprakes M, Pei Q, Zetterstrom TSC, Green AR, Elliott JM (2004) Effect of 5-HT depletion by MDMA on hyperthermia and Arc mRNA induction in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 173:346–352.

Bilkei-Gorzo A (2014) Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacol Ther* 142:244–257.

Bizon JL, Gallagher M (2005) More is less: neurogenesis and age-related cognitive decline in Long-Evans rats. *Sci Aging Knowledge Environ* 16:1–5.

Blumcke I, Becker AJ, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, Waha A, Friedl MG, Kuhn R, Emson P, Elger C, Wiestler OD (2000) Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate

receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:1–10.

Bramham CR, Messaoudi E (2005) BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76:99–125.

Brandt C, Potschka H, Löscher W, Ebert U (2003) N-methyl-d-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience* 118:727–740.

Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, Behrens W Von Der, Kempermann G (2003) Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24:603–613.

Brenner-Lavie H, Klein E, Ben-Shachar D (2009) Mitochondrial complex I as a novel target for intraneuronal DA: modulation of respiration in intact cells. *Biochem Pharmacol* 78:85–95.

Brenner-Lavie H, Klein E, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P, Ben-Shachar D (2008) Dopamine modulates mitochondrial function in viable SH-SY5Y cells possibly via its interaction with complex I: relevance to dopamine pathology in schizophrenia. *Biochim Biophys Acta* 1777:173–185.

Brodkin J, Malyala A, Frank Nash J (1993) Effect of acute monoamine depletion on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Pharmacol Biochem Behav* 45:647–653.

Broening HW, Morford LL, Inman-Wood SL, Fukumura M, Vorhees C V (2001) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy)-Induced Learning and Memory Impairments Depend on the Age of Exposure During Early Development. *J Neurosci* 21:3228–3235.

Brown RW, Bardo MT, Mace DD, Phillips SB, Kraemer PJ (2000) D-amphetamine facilitation of Morris water task performance is blocked by eticlopride and correlated with increased dopamine synthesis in the prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 114:135–143.

Buhot MC, Martin S, Segu L (2000) Role of serotonin in memory impairment. *Ann Med* 32:210–221.

Burns JM, Galvin JE, Roe CM, Morris JC, McKeel DW (2005) The pathology of the substantia nigra in Alzheimer disease with extrapyramidal signs. *Neurology* 64:1397–1403.

Busceti CL, Biagioni F, Riozzi B, Battaglia G, Storto M, Cinque C, Molinaro G, Gradini R, Caricasole A, Canudas AM, Bruno V, Nicoletti F, Fornai F (2008) Enhanced tau phosphorylation in the hippocampus of mice treated with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”). *J Neurosci* 28:3234–3245.

Calabrese F, Richetto J, Racagni G, Feldon J, Meyer U, Riva MA (2013) Effects of withdrawal from repeated amphetamine exposure in peri-puberty on neuroplasticity-related genes in mice. *Neuroscience* 250:222–231.

Capela JP, Carmo H, Remião F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F (2009) Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: An overview. *Mol Neurobiol* 39:210–271.

Capela JP, Meisel A, Abreu AR, Branco PS, Ferreira LM, Lobo AM, Remião F, Bastos ML, Carvalho F (2006) Neurotoxicity of Ecstasy metabolites in rat cortical neurons, and influence of hyperthermia. *J Pharmacol Exp Ther* 316:53–61.

Carter DS, Harrison AJ, Falenski KW, Blair RE, DeLorenzo RJ (2008) Long-term decrease in calbindin-D28K expression in the hippocampus

of epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. *Epilepsy Res* 79:213–223.

Catlow BJ, Badanich KA, Sponaugle AE, Rowe AR, Song S, Rafalovich I, Sava V, Kirstein CL, Sanchez-Ramos J (2010) Effects of MDMA (“ecstasy”) during adolescence on place conditioning and hippocampal neurogenesis. *Eur J Pharmacol* 628:96–103.

Cavazos JE, Jones SM, Cross DJ (2004) Sprouting and synaptic reorganization in the subiculum and CA1 region of the hippocampus in acute and chronic models of partial-onset epilepsy. *Neuroscience* 126:677–688.

Chavis P, Shinozaki H, Bockaert J, Fagni L (1994) The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J Neurosci* 14:7067–7076.

Cheng JZ, Sharma R, Yang Y, Singhal SS, Sharma A, Saini MK, Singh S V, Zimniak P, Awasthi S, Awasthi YC (2001) Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. *J Biol Chem* 276:41213–41223.

Chipana C, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E (2006) Protection against MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in mice by methyllycaconitine: involvement of nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 51:885–895.

Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369–379.

Chu T, Kumagai Y, DiStefano EW, Cho AK (1996) Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem Pharmacol* 51:789–796.

BIBLIOGRAFIA

Colado MI, Camarero J, Mechana O, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, Green R (2001) A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol* 134:1711–1723.

Colado MI, O'Shea E, Granados R, Murray TK, Green R (1997) In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br J Pharmacol* 121:889–900.

Colado MI, Williams JL, Green R (1995) The hyperthermic and neurotoxic effects of "Ecstasy" (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Br J Pharmacol* 115:1281–1289.

Collins S a., Gudelsky G a., Yamamoto BK (2015) MDMA-induced loss of parvalbumin interneurons within the dentate gyrus is mediated by 5HT2A and NMDA receptors. *Eur J Pharmacol.*761:95-100

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

Costa G, Frau L, Wardas J, Pinna A, Plumitallo A, Morelli M (2013) MPTP-induced dopamine neuron degeneration and glia activation is potentiated in MDMA-pretreated mice. *Mov Disord* 28:1957–1965.

Crews F, He J, Hodge C (2007) Adolescent cortical development: A critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 86:189–199.

Dafters RI, Hoshi R, Talbot AC (2004) Contribution of cannabis and

MDMA (“ecstasy”) to cognitive changes in long-term polydrug users. *Psychopharmacology (Berl)* 173:405–410.

Darvesh AS, Gudelsky GA (2005) Evidence for a role of energy dysregulation in the MDMA-induced depletion of brain 5-HT. *Brain Res* 1056:168–175.

de la Torre R, Farré M, Navarro M, Pacifici R, Zuccaro P, Pichini S (2004a) Clinical Pharmacokinetics of Amphetamine and Related Substances. *Clin Pharmacokinet* 43:157–185.

de la Torre R, Farré M (2004) Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): The limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol Sci* 25:505–508.

de la Torre R, Farré M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, Segura J, Camí J (2004b) Human Pharmacology of MDMA. *Ther Drug Monit* 26:137–144.

de Strooper B, Vassar R, Golde T (2010) The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6:99–107.

de Win MML, Schilt T, Reneman L, Vervaeke H, Jager G, Dijkink S, Booij J, van den Brink W (2006) Ecstasy use and self-reported depression, impulsivity, and sensation seeking: a prospective cohort study. *J Psychopharmacol* 20:226–235.

Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339–350.

Derkach V a, Oh MC, Guire ES, Soderling TR (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *NatRevNeurosci* 8:101–113.

Desaiah D, Ho K (1979) Effect of biogenic amines and GABA on ATPase activities in mouse tissue. *Eur J Pharmacol.* 40:255–261.

Dietz DM, Dietz KC, Nestler EJ, Russo SJ (2009) Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Pharmacopsychiaty* 42 (Suppl 1)S69-S78.

D'Hooge R, De Deyn PP (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 36:60–90.

Doblin R (2002) A clinical plan for MDMA (Ecstasy) in the treatment of posttraumatic stress disorder (PTSD): partnering with the FDA. *J Psychoact Drugs* 34:185–194.

Domínguez MI, Blasco-Ibáñez JM, Crespo C, Marqués-Marí AI, Martínez-Guijarro FJ (2003) Calretinin/PSA-NCAM immunoreactive granule cells after hippocampal damage produced by kainic acid and DEDTC treatment in mouse. *Brain Res* 966:206–217.

Dong H, Csernansky C a, Goico B, Csernansky JG (2003) Hippocampal neurogenesis follows kainic acid-induced apoptosis in neonatal rats. *J Neurosci* 23:1742–1749.

Dragunow M (1996) A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav Genet* 26:293–299.

Dumont M, Stack C, Elipenahli C, Jainuddin S, Launay N, Gerges M, Starkova N, Starkov A a., Calingasan NY, Tampellini D, Pujol A, Beal MF (2014) PGC-1 α overexpression exacerbates β -amyloid and tau deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 28:1745–1755.

Easton N, Fry J, O'Shea E, Watkins A, Kingston S, Marsden CA (2003) Synthesis, in vitro formation, and behavioural effects of glutathione regioisomers of alpha-methyldopamine with relevance to MDA and MDMA (ecstasy). *Brain Res* 987:144–154.

Eisenhofer G (2004) Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacol Rev* 56:331–349.

EMCDDA (2015) European Drug Report: Trends and development

Emerit J, Edeas M, Bricaire F (2004) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 58:39-46

Escobedo I, O’Shea E, Orio L, Sanchez V, Segura M, de la Torre R, Farre M, Green AR, Colado MI (2005) A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. *Br J Pharmacol* 144:231–241.

Esteban B, O’Shea E, Camarero J, Sanchez V, Green AR, Colado MI (2001) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology (Berl)* 154:251–260.

Federico A, Cardaioli E, Da Pozzo P, Formichi P, Gallus GN, Radi E (2012) Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci* 322:254–262.

Flavel SC, Koch JD, White JM, Todd G (2012) Illicit stimulant use in humans is associated with a long-term increase in tremor. *PLoS One* 7:e52025.

Fone KCF, Beckett SRG, Topham IA, Swettenham J, Ball M, Maddocks L (2002) Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity. 159:437–444.

Fornai F, Giorgi FS, Gesi M, Chen K, Alessandri MG, Shih JC (2001)

Biochemical Effects of the Monoamine Neurotoxins DSP-4 and MDMA in Specific Brain Regions of MAO-B-Deficient Mice. *Mol Pharmacol* 221:213–221.

Fosnaugh JS, Bhat R V, Yamagata K, Worley PF, Baraban JM (1995) Activation of arc, a putative “effector” immediate early gene, by cocaine in rat brain. *J Neurochem* 64:2377–2380.

Freixa Santfeliu, Francesc (1981) *El fenómeno droga*. Editorial: Salvat Editores, S.A., Barcelona ISBN 10: 8434578638

Freund TF, Gulyás a I, Acsády L, Görcs T, Tóth K (1990) Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8501–8505.

Fumagalli F, Di Pasquale L, Caffino L, Racagni G, Riva MA (2007) Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 26:2756–2763.

Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky R a, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP (2006) Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 24:516–524.

Garcia-Osta A, Del Rio J, Frechilla D (2004) Increased CRE-binding activity and tryptophan hydroxylase mRNA expression induced by 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) in the rat frontal cortex but not in the hippocampus. *Mol Brain Res* 126:181–187.

Garcia-Ratés S, Camarasa J, Sánchez-García AI, Gandía L, Escubedo E, Pubill D (2010) The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on nicotinic receptors: intracellular calcium increase, calpain/caspase 3 activation, and functional upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol* 244:344–353.

Gassen G V., Annaert W (2003) Amyloid, Presenilins, and Alzheimer's Disease. *Neurosci* 9:117–126.

Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL (1999) Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci* 2:861–863.

Giorgi FS, Lazzeri G, Natale G, Iudice A, Ruggieri S, Paparelli A, Murri L, Fornai F (2006) MDMA and seizures: a dangerous liaison? *Ann N Y Acad Sci* 1074:357–364.

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. *Neuroscience* 136:43–53.

Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis a C, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004) Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8174–8179.

Gorter JA, Van Vliet EA, Aronica E, Lopes Da Silva FH (2001) Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosci* 13:657–669.

Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J (2006) Neurotoxicity of methylenedioxyamphetamines (MDMA; ecstasy) in humans: How strong is the evidence for persistent brain damage? *Addiction* 101:348–361.

BIBLIOGRAFIA

Graham DL, Edwards S, Bachtell RK, DiLeone RJ, Rios M, Self DW (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* 10:1029–1037.

Granado N, Escobedo I, Shea EO, Colado MI (2008a) Early Loss of Dopaminergic Terminals in Striosomes After MDMA Administration to Mice. 84:80–84.

Granado N, O’Shea E, Bove J, Vila M, Colado MI, Moratalla R (2008b) Persistent MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the striatum and substantia nigra of mice. *J Neurochem* 107:1102–1112.

Green AR, Mehan AO, Elliott JM, Shea EO, Colado MI (2003) The Pharmacology and Clinical Pharmacology of 3, 4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”). 55:463–508.

Green AR, O’shea E, Colado MI (2004) A review of the mechanisms involved in the acute MDMA (ecstasy)-induced hyperthermic response. *Eur J Pharmacol* 500:3–13.

Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su T-P, Shaham Y (2003) Time-Dependent Increases in Brain-Derived Neurotrophic Factor Protein Levels within the Mesolimbic Dopamine System after Withdrawal from Cocaine: Implications for Incubation of Cocaine Craving. *J Neurosci* 23:742–747.

Guerri C, Pascual M (2010) Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol* 44:15–26.

Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) β -Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268:3021–3024.

Hammond RS, Tull LE, Stackman RW (2004) On the delay-dependent

involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 82:26–34.

Han DD, Gu HH (2006) Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol* 6:6.

Hardman HF, Haavik CO, Seevers MH (1973) Relationship of the structure of mescaline and seven analogs to toxicity and behavior in five species of laboratory animals. *Toxicol Appl Pharmacol* 25:299–309.

Harris KM, Fiala JC, Ostroff L (2003) Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:745–748.

Hemmerle AM, Dickerson JW, Herring NR, Schaefer TL, Vorhees C V., Williams MT, Seroogy KB (2012) (±)3,4-Methylenedioxymethamphetamine (“Ecstasy”) Treatment Modulates Expression of Neurotrophins and Their Receptors in Multiple Regions of Adult Rat Brain. *J Comp Neurol* 520:2459–2474.

Hernández-Rabaza V, Domínguez-Escribà L, Barcia JA, Rosel JF, Romero FJ, García-Verdugo JM, Canales JJ (2006) Binge administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (“ecstasy”) impairs the survival of neural precursors in adult rat dentate gyrus. *Neuropharmacology* 51:967–973.

Hiramatsu M (1990) Metabolism of Methylenedioxymethamphetamine : Formation of Dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its Glutathione adduct. *J Pharmacol Exp Ther* 254:521-527

Hock BJ, Lamb BT (2001) Transgenic mouse models of Alzheimer’s disease. *Trends Genet* 17:S7–S12.

Jacobsen LK, Mencl WE, Pugh KR, Skudlarski P, Krystal JH (2004)

Preliminary evidence of hippocampal dysfunction in adolescent MDMA (“ecstasy”) users: Possible relationship to neurotoxic effects. *Psychopharmacology (Berl)* 173:383–390.

Jager G, De Win MM, Vervaeke HK, Schilt T, Kahn RS, Van Den Brink W, Van Ree JM, Ramsey NF (2007) Incidental use of ecstasy: No evidence for harmful effects on cognitive brain function in a prospective fMRI study. *Psychopharmacology (Berl)* 193:403–414.

Jakowec MW, Nixon K, Hogg E, McNeill T, Petzinger GM (2004) Tyrosine Hydroxylase and Dopamine Transporter Expression Following 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Neurodegeneration of the Mouse Nigrostriatal Pathway. *J Neurosci Res* 76:539–550.

Jankowsky JL, Fadale DJ, Anderson J, Xu GM, Gonzales V, Jenkins NA, Copeland NG, Lee MK, Younkin LH, Wagner SL, Younkin SG, Borchelt DR (2004) Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue β -amyloid peptide in vivo: Evidence for augmentation of a 42-specific γ secretase. *Hum Mol Genet* 13:159–170.

Jankowsky JL, Slunt HH, Ratovitski T, Jenkins NA, Copeland NG, Borchelt DR (2001) Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: A comparison of strategies. *Biomol Eng* 17:157–165.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT (1993) The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Biochemistry* 32:4693–4697.

Jayanthi S, Ladenheim B, Andrews A., Cadet J. (1999) Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *Neuroscience* 91:1379–1387.

Johnson M, Elayan I, Hanson GR, Flotz RL, Gibb JW, Lim heng (1992) Effects of 3,4-Dihydroxymethamphetamine and 2,5,6-

trihydroxymethamphetamine, two metabolites of 3,4-Methylendioximethamphetamine, on central serotonergic and dopaminergic systems. *J Pharmacol Exp Ther* 261:447–453.

Johansen PØ, Krebs TS (2009) How could MDMA (ecstasy) help anxiety disorders? A neurobiological rationale. *J Psychopharmacol* 23:389–391.

Johnson EA, O’Callaghan JP, Miller DB (2002a) Chronic treatment with supraphysiological levels of corticosterone enhances d-MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the C57BL/6J female mouse. *Brain Res* 933:130–138.

Johnson EA, Sharp DS, Miller DB (2000) Restraint as a stressor in mice: *Brain Res* 875:107–118.

Johnson EA, Shvedova AA, Kisin E, O’Callaghan JP, Kommineni C, Miller DB (2002b) d-MDMA during vitamin E deficiency: effects on dopaminergic neurotoxicity and hepatotoxicity. *Brain Res* 933:150–163.

Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325:529–531.

Jones DC, Duvauchelle C, Ikegami A, Olsen CM, Lau SS, de la Torre R, Monks TJ (2005) Serotonergic neurotoxic metabolites of ecstasy identified in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 313:422–431.

Junyent F, Porquet D, de Lemos L, Romero R, Utrera J, Camins A, Pallàs M, Auladell C (2011) Decrease of calbindin-d28k, calretinin, and parvalbumin by taurine treatment does not induce a major susceptibility to kainic acid. *J Neurosci Res* 89:1043–1051.

Kaczorowskis GJ, Costello L, Dethmers J, Trumble MJ, Vandlen RL

BIBLIOGRAFIA

(1984) Mechanisms of Ca²⁺ Transport in Plasma Membrane Vesicles Prepared from Cultured Pituitary Cells. 259:9395–9403.

Katzman R, Kawas C. Epidemiology of dementia and Alzheimer's disease. In: Terry RD, Katzman R, Bick KL, editors. Alzheimer Disease. New York: Raven Press, 1994:105–22

Kennedy MB (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. Science 290:750–754.

Kew JN, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. Psychopharmacol 179:4–29.

Kish SJ, Lerch J, Furukawa Y, Tong J, McCluskey T, Wilkins D, Houle S, Meyer J, Mundo E, Wilson AA, Rusjan PM, Saint-Cyr JA, Guttman M, Collins DL, Shapiro C, Warsh JJ, Boileau I (2010) Decreased cerebral cortical serotonin transporter binding in ecstasy users: A positron emission tomography/[¹¹C]DASB and structural brain imaging study. Brain 133:1779–1797.

Koch S, Galloway MP (1997) MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. J Neural Transm 104:135–146.

Kodama M, Akiyama K, Ujike H, Shimizu Y, Tanaka Y, Kuroda S (1998) A robust increase in expression of arc gene, an effector immediate early gene, in the rat brain after acute and chronic methamphetamine administration. Brain Res 796:273–283.

Kosaka T, Wu JY, Benoit R (1988) GABAergic neurons containing somatostatin-like immunoreactivity in the rat hippocampus and dentate gyrus. Exp Brain Res 71:388–398.

Kotti T, Tapiola T, Riekkinen Sr. PJ, Miettinen R (1996) The calretinin-containing mossy cells survive excitotoxic insult in the gerbil dentate gyrus. Comparison of excitotoxicity-induced neuropathological changes in the gerbil and rat. Eur J Neurosci 8:2371–2378.

Kuniyoshi M S, Jankovic J (2003) MDMA and Parkinsonism. *N Engl J Med* 348:96–97.

Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 460:525–542.

Lauterborn JC, Lynch G, Vanderklish P, Arai A, Gall CM (2000) Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons. *J Neurosci* 20:8–21.

Lee S, Williamson J, Lothman E., Szele F., Chesselet M., Von Hagen S, Sapolsky R., Mattson M., Christakos S (1997) Early induction of mRNA for calbindin-D28k and BDNF but not NT-3 in rat hippocampus after kainic acid treatment. *Mol Brain Res* 47:183–194.

Leonardi ET, Azmitia EC (1994) MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology* 10:231–238.

Li F, Tsien JZ (2009) Memory and the NMDA receptors. *N Engl J Med* 361:302–303.

Liechti ME, Baumann C, Gamma A, Vollenweider FX (2000) Acute psychological effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”) are attenuated by the serotonin uptake inhibitor citalopram. *Neuropsychopharmacology* 22:513–521.

Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787–795.

Liu Y, Yoo M-J, Savonenko A, Stirling W, Price DL, Borchelt DR, Mamounas L, Lyons WE, Blue ME, Lee MK (2008) Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *J Neurosci* 28:13805–13814.

Lopez OL, Wisniewski SR, Becker JT, Boller F, Dekosky ST (1997) Extrapiramidals Signs in Patients With Probable Alzheimer Disease. *Arch Neurol* 54:969–975.

Lovenberg TW, Roth RH, Nichols DE, Mailman RB (1991) D1 dopamine receptors of NS20Y neuroblastoma cells are functionally similar to rat striatal D1 receptors. *J Neurochem* 57:1563–1569.

Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433–445.

Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L (2001) The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Arch Med Res* 32:367–381.

Malberg JE, Sabol KE, Seiden LS (1996) Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the Rat. *J Pharmacol Exp Ther* 278:258–267.

Malberg JE, Seiden LS (1998) Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci* 18:5086–5094.

Maroof N, Ravipati S, Pardon MC, Barrett DA, Kendall DA (2014) Reductions in Endocannabinoid Levels and Enhanced Coupling of Cannabinoid Receptors in the Striatum are Accompanied by Cognitive Impairments in the A β PP^{swe}/PS1 Δ E9 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 42:227-245.

Martínez-Turrillas R, Moyano S, Del Río J, Frechilla D (2006) Differential effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* 402:126–130 .

Martorana A, Koch G (2014) “Is dopamine involved in Alzheimer’s disease?”. *Front Aging Neurosci* 6:252.

Mattson MP (2004) Pathways towards and away from Alzheimer’s disease. *Nature* 430:631–639.

Mattson MP, Magnus T (2006) Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7:278–294.

Mattson MP, Maudsley S, Martin B (2004) BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 27:589–594.

Mayer ML, Vyklicky LJ (1989) The action of zinc on synaptic transmission and neuronal excitability in cultures of mouse hippocampus. *J Physiol* 415:351–365.

McCann UD, Szabo Z, Seckin E, Rosenblatt P, Mathews WB, Ravert HT, Dannals RF, Ricaurte GA (2005) Quantitative PET Studies of the Serotonin Transporter in MDMA Users and Controls Using [¹¹C]McN5652 and [¹¹C]DASB. *Neuropsychopharmacology* 30:1741–1750.

McCann UD, Szabo Z, Vranesic M, Palermo M, Mathews WB, Ravert HT, Dannals RF, Ricaurte GA (2008) Positron emission tomographic studies of brain dopamine and serotonin transporters in abstinent (±)3,4-methylenedioxymethamphetamine (“ecstasy”) users: Relationship to cognitive performance. *Psychopharmacology (Berl)* 200:439–450.

McGowan E, Sanders S, Iwatsubo T, Takeuchi A, Saido T, Zehr C, Yu X, Uljon S, Wang R, Mann D, Dickson D, Duff K (1999) Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both

BIBLIOGRAFIA

mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes. *Neurobiol Dis* 6:231–244.

Meller R, Harrison PJ, Elliott JM, Sharp T (2002) In vitro evidence that 5-hydroxytryptamine increases efflux of glial glutamate via 5-HT_{2A} receptor activation. *J Neurosci Res* 67:399–405.

Meredith GE, Callen S, Scheuer DA (2002) Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdala, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain Res* 949:218–227.

Meredith GE, Totterdell S, Beales M, Meshul CK (2009) Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 219:334–340.

Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe a M, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, O'Dell TJ, Grant SG (1998) Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 396:433–439.

Migliore L, Fontana I, Trippi F, Coppedè F, Tognoni G, Nucciarone B, Siciliano G (2005) Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes of mild cognitive impairment and AD patients. *Neurobiol Aging* 26:567–573.

Milhazes N, Oliveira T, Martins P, Garrido J, Oliveira C (2006) Synthesis and cytotoxic profile methylenedioxymethamphetamine (“ecstasy”) and its metabolites on undifferentiated PC12 cells : a putative structure - toxicity relationship. *Cell* 19:1294–1304.

Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202.

Miller RT, Lau SS, Monks TJ (1996) Effects of Intracerebroventricular Administration of 5-(Glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine on Brain

Dopamine , Serotonin , and Norepinephrine Concentrations in Male Sprague-Dawley Rats. *Chem Res Toxicol* 9:457–465.

Mithoefer MC, Grob CS, Brewerton TD (2016) Novel psychopharmacological therapies for psychiatric disorders: psilocybin and MDMA. *The Lancet Psychiatry* 0366:1–7.

Mithoefer MC, Wagner MT, Mithoefer AT, Jerome L, Doblin R (2011) The safety and efficacy of {+/-}3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant posttraumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study. *J Psychopharmacol* 25:439–452.

Mithoefer MC, Wagner MT, Mithoefer AT, Jerome L, Martin SF, Yazar-Klosinski B, Michel Y, Brewerton TD, Doblin R (2013) Durability of improvement in post-traumatic stress disorder symptoms and absence of harmful effects or drug dependency after 3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy: a prospective long-term follow-up study. *J Psychopharmacol* 27:28–39.

Monks TJ, Lau SS (1997) Biological Reactivity of polyphenolic-Glutathione conjugates. *ChemResToxicol* 10:1296–1313.

Moreira PI, Cardoso SM, Santos MS, Oliveira CR (2006) The key role of mitochondria in Alzheimer’s disease. *J Alzheimers Dis* 9:101–110.

Moreira PI, Zhu X, Wang X, Lee H-G, Nunomura A, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2010) Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1802:212–220.

Morgan MJ (2000) Ecstasy (MDMA): A review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology (Berl)* 152:230–248.

Mori H, Masaki H, Yamakura T, Mishina M (1992) Identification by mutagenesis of a Mg(2+)-block site of the NMDA receptor channel. *Nature* 358:673–675.

BIBLIOGRAFIA

Morini R, Mlinar B, Baccini G, Corradetti R (2011) Enhanced hippocampal long-term potentiation following repeated MDMA treatment in Dark-Agouti rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:80–91.

Morishima-Kawashima M, Ihara Y (2002) Alzheimer's disease: β -Amyloid protein and tau. *J Neurosci Res* 70:392–401.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681–683.

Morris RGM, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774–776.

Mudò G, Mäkelä J, Di Liberto V, Tselykh T V, Olivieri M, Piepponen P, Eriksson O, Mälkiä A, Bonomo A, Kairisalo M, Aguirre J a., Korhonen L, Belluardo N, Lindholm D (2012) Transgenic expression and activation of PGC-1 α protect dopaminergic neurons in the MPTP mouse model of Parkinsons disease. *Cell Mol Life Sci* 69:1153–1165.

Mueller F, Lenz C, Steiner M, Dolder PC, Walter M, Lang UE, Liechti ME, Borgwardt S (2016) Neuroimaging in moderate MDMA use: A systematic review. *Neurosci Biobehav Rev* 62:21–34.

Murakami S, Takemoto T, and Shimizu Z (1953) The effective principle of *Diginea simplex* Aq. I. Separation of the effective fractions by liquid chromatography. *J Pharm Soc Japan* 73: 1026.

Nagahara AH, Handa RJ (1995) Fetal alcohol exposure alters the induction of immediate early gene mRNA in the rat prefrontal cortex after an alternation task. *Alcohol Clin Exp Res* 19:1389–1397.

Nair SG, Gudelsky GA (2006) Effect of a serotonin depleting regimen of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on the subsequent

stimulation of acetylcholine release in the rat prefrontal cortex. *Brain Res Bull* 69:382–387.

Nakahara T, Yamamoto T, Endo K, Kayama H (2001) Neuronal ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the mouse striatum by combined administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 3-nitropropionic acid. *Neuroscience* 108:601–610.

Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson M a, Tonegawa S (2004) NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5:361–372.

Nash JF, Yamamoto BK (1992) Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Brain Res* 581:237–243.

Nestler EJ (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119–128.

Nichols DE (1986) Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoact Drugs* 18:305–313.

Nixdorf WL, Burrows KB, Gudelsky GA, Yamamoto BK (2001) Enhancement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine neurotoxicity by the energy inhibitor malonate. *J Neurochem* 77:647–654.

O’Callaghan JP, Miller DB (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 270:741–751.

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 evidence for neurotoxicity. *J Neurosci* 8:2788–2803.

O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171–175.

O'Shea E, Escobedo I, Orío L, Sanchez V, Navarro M, Green a R, Colado MI (2005) Elevation of ambient room temperature has differential effects on MDMA-induced 5-HT and dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rats. *Neuropsychopharmacology* 30:1312–1323.

O'Shea E, Esteban B, Camarero J, Green a R, Colado MI (2001) Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ('ecstasy') on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacology* 40:65–74.

O'Suilleabhain P, Giller C (2003) Rapidly progressive parkinsonism in a self-reported user of Ecstasy and other drugs. *Mov Disord* 18:1378–1381.

Oehen P, Schnyder U (2013) A randomized, controlled pilot study of MDMA ((±3,4-Methylenedioxymethamphetamine)-assisted psychotherapy for treatment of resistant, chronic Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD). *J Psychopharmacol* 27:40–52.

Pacifici R, Zuccaro P, Farré M, Pichini S, Carlo SDI, Roset PN (2002) Cell-Mediated immune response in MDMA users after repeated dose administration: Studies in controlled versus noncontrolled settings. *Ann N Y Acad Sci* 965:421-433.

Paoletti P, Neyton J (2007a) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7:39–47.

Paoletti P, Neyton J (2007b) NMDA receptor subunits: function and pharmacology molecular organization and operation of NMDARs. *Curr*

Opin Pharmacol 7:39–47.

Parent JM, Yu TW, Leibowitz RT, Geschwind DH, Sloviter RS, Lowenstein DH (1997) Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17:3727–3738.

Parrott a C (2000) Human research on MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) neurotoxicity: cognitive and behavioural indices of change. *Neuropsychobiology* 42:17–24.

Parrott A (2015) The Adverse Psychiatric Consequences of Recreational Stimulant Drugs Such as Methamphetamine, Cocaine, Ecstasy/mdma, and Mephedrone: a Unified Psychobiological Explanation. *Eur Psychiatry* 30:1067.

Parrott AC, Buchanan T, Scholey AB, Heffernan T, Ling J, Rodgers J (2002) Ecstasy/MDMA attributed problems reported by novice, moderate and heavy recreational users. *Hum Psychopharmacol* 17:309–312.

Patel N, Kumagai Y, Unger SE, Fukuto JM, Cho AK (1991) Transformation of dopamine and alpha-methyldopamine by NG108-15 cells: formation of thiol adducts. *ChemResToxicol* 4:421–426.

Paus T, Keshavan M, Giedd JN (2008) Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? *Nat Rev Neurosci* 9:947–957.

Pedrós I, Petrov D, Allgaier M, Sureda F, Barroso E, Beas-Zarate C, Auladell C, Pallàs M, Vázquez-Carrera M, Casadesús G, Folch J, Camins A (2014) Early alterations in energy metabolism in the hippocampus of APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:1556–1566.

Perez SE, Lazarov O, Koprach JB, Chen E-Y, Rodriguez-Menendez V, Lipton JW, Sisodia SS, Mufson EJ (2005) Nigrostriatal dysfunction in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} transgenic

mice. *J Neurosci* 25:10220–10229.

Perier C, Bové J, Vila M (2012) Mitochondria and programmed cell death in Parkinson's disease: apoptosis and beyond. *Antioxid Redox Signal* 16:883–895.

Perry G, Castellani RJ, Smith MA, Harris PL, Kubat Z, Ghanbari K, Jones PK, Cordone G, Tabaton M, Wolozin B, Ghanbari H (2003) Oxidative damage in the olfactory system in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 106:552–556.

Pitt D, Werner P, Raine CS (2000) Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 6:67–70.

Pizarro N, Magí F, Pujadas M, Peiró AM, Roset PN, Joglar J, de la Torre R (2004) Stereochemical analysis of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type Drug Metab Dispos 32:1001–1007.

Portet F, Scarmeas N, Cosentino S, Helzner EP, Stern Y (2009) Extrapiramidal signs before and after diagnosis of incident Alzheimer disease in a prospective population study. *Arch Neurol* 66:1120–1126.

Prince M, Wimo A, Guerchet M, Gemma-Claire A, Wu Y-T, Prina M (2015) World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. *Alzheimer's Dis Int*:84.

Pu L, Liu Q, Poo M (2006) BDNF-dependent synaptic sensitization in midbrain dopamine neurons after cocaine withdrawal. *Nat Neurosci* 9:605–607.

Pubill D, Canudas AM, Pallàs M, Camins A, Camarasa J, Escubedo E (2003) Different glial response to methamphetamine- and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 367:490–499.

Puerta E, Hervias I, Goñi-Allo B, Zhang SF, Jordán J, Starkov AA, Aguirre N (2010) Methylenedioxymethamphetamine inhibits mitochondrial complex I activity in mice: A possible mechanism underlying neurotoxicity. *Br J Pharmacol* 160:233–245.

Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kyin M, Tsien JZ (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 3:238–244.

Rangaraj N, Harold K (1978) Effects of ethanol withdrawal, stress and amphetamine on rat brain (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochem Pharmacol* 27:1139-1144.

Reger ML, Hovda DA, Giza CC (2009) Ontogeny of Rat Recognition Memory measured by the novel object recognition task. *Dev Psychobiol* 51:672–678.

Reiman EM, Caselli RJ (1999) Alzheimer's disease. *Maturitas* 31:185–200.

Reneman L, Booij J, de Bruin K, Reitsma JB, de Wolff FA, Gunning WB, den Heeten GJ, van den Brink W (2001) Effects of dose, sex, and long-term abstinence from use on toxic effects of MDMA (ecstasy) on brain serotonin neurons. *Lancet* 358:1864–1869.

Reneman L, Booij J, Lavalaye J, De Bruin K, Reitsma JB, Gunning BW, Den Heeten GJ, Van den Brink W (2002) Use of amphetamine by recreational users of ecstasy (MDMA) is associated with reduced striatal dopamine transporter densities: A [¹²³I]β-CIT SPECT study - preliminary report. *Psychopharmacology (Berl)* 159:335–340.

Ribak CE, Tong WMY, Brecha NC (1996) GABA plasma membrane transporters, GAT-1 and GAT-3, display different distributions in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 367:595–606.

Richner M, Bach G, West MJ (2009) Over expression of amyloid beta-protein reduces the number of neurons in the striatum of APP^{swe}/PS1^{DeltaE9}. *Brain Res* 1266:87–92.

Robertson HA (1992) Immediate-early genes , neuronal plasticity , and memory *Biochem. Cell Biol.* 70:729-737.

Robinson TE, Kolb B (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33–46.

Rodsiri R, Spicer C, Green AR, Marsden CA, Fone KCF (2011) Acute concomitant effects of MDMA binge dosing on extracellular 5-HT, locomotion and body temperature and the long-term effect on novel object discrimination in rats. 213:365–376.

Ros-Simó C, Moscoso-Castro M, Ruiz-Medina J, Ros J, Valverde O (2013) Memory impairment and hippocampus specific protein oxidation induced by ethanol intake and 3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice. *J Neurochem* 125:736–746.

Rozas C, Loyola S, Ugarte G, Zeise ML, Reyes-Parada M, Pancetti F, Rojas P, Morales B (2012) Acutely applied MDMA enhances long-term potentiation in rat hippocampus involving D1/D5 and 5-HT₂ receptors through a polysynaptic mechanism. *Eur Neuropsychopharmacol* 22:584–595.

Sakhi S, Bruce A, Sun N, Tocco G, Baudry M, Schreiber SS (1994) P53 Induction Is Associated With Neuronal Damage in the Central Nervous System. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7525–7529.

Sanchez V, Camarero J, Esteban B, Peter MJ, Green a R, Colado MI (2001) The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. *Br J Pharmacol* 134:46–57.

Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M (1998) Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* 71:2349–2364.

Sattler R, Tymianski M (2000) Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med (Berl)* 78:3–13.

Scanzello CR, Hatzidimitriou G, Martello AL, Katz JL, Ricaurte GA (1993) Serotonergic recovery after (+/-)3,4-(methylenedioxy) methamphetamine injury: observations in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 264:1484–1491.

Schmidt CJ, Wu L, Lovenberg W (1986) Methylenedioxymethamphetamine: A potentially neurotoxic amphetamine analogue. *Eur J Pharmacol* 124:175–178.

Schmidt R, Schmidt H, Fazekas F (2000) Vascular risk factors in dementia. *J Neurol* 247:81–87.

Schmued LC (2003) Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat forebrain following a single exposure to MDMA. *Brain Res* 974:127–133.

Schreiber SS, Tocco G, Najm I, Thompson RF, Baudn M (1993) Cycloheximide Prevents Kainate-Induced Neuronal Death and C-Fos Expression in Adult Rat Brain. *4*:149–159.

Selden N, Mesulam MM, Geula C (1994) Human striatum: the distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Res* 648:327–331.

Selkoe DJ (2001) Alzheimer's Disease : Genes , Proteins and Therapy. *Perspective* 81:741–767.

Semple david M, Ebmeier KP, Glabus MF, O'Carroll RE, Johnstone EC (1999) Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the

BIBLIOGRAFIA

cerebral cortex of MDMA ("ecstasy") users. *Br J psychiatry* 175:63–69.

Serres F, Carney SL (2006) Nicotine regulates SH-SY5Y neuroblastoma cell proliferation through the release of brain-derived neurotrophic factor. *Brain Res* 1101:36–42

Sharkey J, McBean DE, Kelly PA (1991) Alterations in hippocampal function following repeated exposure to the amphetamine derivative methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)* 105:113–118.

Sharp FR, Liu J, Bernabeu R (2002) Neurogenesis following brain ischemia. *Dev Brain Res* 134:23–30.

Shulgin A, Nichols DE (1978) Characterization of Three New Psychotomimetics. *Psychopharmacol Hallucinog, Oxford*. 74–83

Simantov R (2004) Multiple molecular and neuropharmacological effects of MDMA (Ecstasy). *Life Sci* 74:803–814.

Sloviter RS (1989) Calcium-binding protein (calbindin-D28k) and parvalbumin immunocytochemistry: localization in the rat hippocampus with specific reference to the selective vulnerability of hippocampal neurons to seizure activity. *J Comp Neurol* 280:183–196.

Smeyne R, Vendrell M, Michael H, Suzanne B, Linda R, Tom C, I MJ (1993) Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Letter to Nature* 363:166-169.

Soetens E, D'Hooge R, Hueting JE (1993) Amphetamine enhances human-memory consolidation. *Neurosci Lett* 161:9–12.

Sonn K, Pankratova S, Korshunova I, Zharkovsky A, Bock E, Berezin V, Kiryushko D (2010) A metallothionein mimetic peptide protects neurons against kainic acid-induced excitotoxicity. *J Neurosci Res* 88:1074–1082.

Soria Fregozo C, Pérez Vega MI (2012) Participación de las proteínas de unión a la actina y vías de señalización asociadas a la formación y mantenimiento de las espinas dendríticas. *Neurologia* 27:421–431.

Sowell ER, Delis D, Stiles J, Jernigan TL (2001) Improved memory functioning and frontal lobe maturation between childhood and adolescence: a structural MRI study. *J Int Neuropsychol Soc* 7:312–322.

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

Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci biobehav rev* 24:417-463.

Sprague JE, Nichols DE (1995) The monoamine oxidase-B inhibitor L-deprenyl protects against 3,4-methylenedioxyamphetamine-induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits. *J Pharmacol Exp Ther* 273:667–673.

Sprague JE, Nichols DE, On SN, Eve LX, Nicholsz D (1998) An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-Methylenedioxyamphetamine *Neurotoxicology* 74:29-42.

Sprague JE, Preston AS, Leifheit M, Woodside B (2003) Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): effects on spatial learning. *Physiol Behav* 79:281–287.

Squire LR, Zola-Morgan S (1991) The medial temporal lobe memory system. *Science* 253:1380–1386.

Stanfield BB and Cowan WM (1988). The Development of the Hippocampal Region. En *Cerebral Cortex*. Vol. 7: Development and Maturation of Cerebral Cortex. Ed. Peters y Jones. Pags. 91-131.

Stephenson CP, Hunt GE, Topple AN, McGregor IS (1999) The

distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine “Ecstasy”-induced c-fos expression in rat brain. *Neuroscience* 92:1011–1023.

Stone DM, Stahl DC, Hanson GR, Gibb JW (1986) The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 128:41–48.

Storga D, Vrecko K, Birkmayer JGD, Reibnegger G (1996) Monoaminergic neurotransmitters, their precursors and metabolites in brains of Alzheimer patients. *Neurosci Lett* 203:29–32.

St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R, Spiegelman BM (2006) Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* 127:397–408.

Sugimoto Y, Ohkura M, Inoue K, Yamada J (2001) Involvement of serotonergic and dopaminergic mechanisms in hyperthermia induced by a serotonin-releasing drug, p-chloroamphetamine in mice. *Eur J Pharmacol* 430:265–268.

Swann AC, Crawley JN, Grant SJ, Maas JW (1980) Noradrenergic stimulation in vivo increase (Na⁺, K⁺)-Adenosine triphosphatase activity. *J Chem Inf Model* 28:251–256.

Sweatt JD (2004) Hippocampal function in cognition. *Mech Mem* 174:99–110.

Swerdlow RH, Khan SM (2004) A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer’s disease. *Med Hypotheses* 63:8–20.

Swerdlow RH, Khan SM (2009) The Alzheimer’s disease mitochondrial cascade hypothesis: an update. *Exp Neurol* 218:308–315.

Szydłowska K, Tymianski M (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47:122–129.

The human memory: What it is, How it works and How can it go wrong. (18/Feb/ 2016) Available at: <http://www.human-memory.net/>

Thomasius R, Petersen K, Buchert R, Andersen B, Zapletalova P, Wartberg L, Nebeling B, Schmolst A (2003) Mood , cognition and serotonin transporter availability in current and former ecstasy (MDMA) users. *Psychopharmacol* 167:85–96.

Thompson VB, Heiman J, Chambers JB, Benoit SC, Buesing WR, Norman MK, Norman AB, Lipton JW (2009) Long-term behavioral consequences of prenatal MDMA exposure. *Physiol Behav* 96:593–601.

Tischmeyer W, Grimm R (1999) Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 55:564–574.

Trigo JM, Cabrero-Castel A, Berrendero F, Maldonado R, Robledo P (2008) MDMA modifies active avoidance learning and recall in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 197:391–400.

Tsay D, Yuste R (2004) On the electrical function of dendritic spines. *Trends Neurosci* 27:77–83.

Tsien JZ (2000) Building a brainier mouse. *Sci Am* 282:62–68.

UNODC (2015) World drug report

Van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* 10:272–282.

Vann SD, Brown MW, Erichsen JT, Aggleton JP (2000) Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *J Neurosci* 20:2711–2718.

Varadarajan S, Yatin S, Aksenova M, Butterfield DA (2000) Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J Struct Biol* 130:184–208.

Vassar R et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735–741.

Victor Nadler J (1981) Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. *Life Sci* 29:2031–2042.

Vilalta-Franch J, Calvó-Perxas L, Garre-Olmo J, Turró-Garriga O, López-Pousa S (2013) Apathy syndrome in Alzheimer's disease epidemiology: Prevalence, incidence, persistence, and risk and mortality factors. *J Alzheimer's Dis* 33:535–543.

Vincent P, Mulle C (2009) Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience* 158:309–323.

Von Bohlen Und Halbach O (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329:409–420.

Wallace CS, Lyford GL, Worley PF, Steward O (1998) Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci* 18:26–35.

Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY (2005) Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31:3–16.

Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351:742–744.

Westlund KN, Krakower TJ, Kwan S-W, Abell CW (1993) Intracellular distribution of monoamine oxidase A in selected regions of rat and monkey brain and spinal cord. *Brain Res* 612:221–230.

White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ (1996) The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “Ecstasy”) on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 49:455–479.

Wiedenmann B, Franke WW (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41:1017–1028.

Wiig KA, Whitlock JR, Epstein MH, Carpenter RL, Bear MF (2009) The levo enantiomer of amphetamine increases memory consolidation and gene expression in the hippocampus without producing locomotor stimulation. *Neurobiol Learn Mem* 92:106–113.

Willoughby J, Glover V, Sandier M (1988) Histochemical localisation of monoamine oxidase A and B in rat brain. *J Neural Transm* 74:29-42.

Wisden W, Seeburg PH (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13:3582–3598.

World Health Organization W (2004) Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence. *Addiction*:286

Worley PF, Bhat R V, Baraban JM, Erickson C a, McNaughton BL, Barnes C a (1993) Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* 13:4776–4786.

Xie H, Guan J, Borrelli LA, Xu J, Serrano-Pozo A, Bacskai BJ (2013) Mitochondrial alterations near amyloid plaques in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci* 33:17042–17051.

Yang Q, Wang S, Hamberger A, Celio MR, Haglid KG (1997) Delayed decrease of calbindin immunoreactivity in the granule cell- mossy fibers after kainic acid-induced seizures. *Brain Res Bull* 43:551–559.

Yañez M, Gil-Longo J, Campos-Toimil M (2012) Chapter 19 Calcium Binding Proteins. Ed Springle

Ying S-W, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TVP, Bramham CR (2002) Brain-Derived Neurotrophic Factor Induces Long-Term Potentiation in Intact Adult Hippocampus: Requirement for ERK Activation Coupled to CREB and Upregulation of Arc Synthesis. *J Neurosci* 22:1532–1540.

Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990) Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9:3545–3550.

Zagnoni PG, Albano C (2002) Psychostimulants and epilepsy. *Epilepsia* 43:28–31.

Zheng R, Dragomir A-C, Mishin V, Richardson JR, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD (2014) Differential metabolism of 4-hydroxynonenal in liver, lung and brain of mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 279:43–52.

Zheng XY, Zhang HL, Luo Q, Zhu J (2011) Kainic acid-induced neurodegenerative model: Potentials and limitations. *J Biomed Biotechnol* 2011. 2011:457079.

“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar,
pero el mar sería menos si le faltara una gota”

M. Teresa de Calcuta

