

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



**IMPLICACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES EN LA
NEURODEGENERACIÓN INDUCIDA POR 3,4-
METILENODIOXIMETANFETAMINA (MDMA)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Esther O'Shea Gaya

Bajo la dirección de la doctora

María Isabel Colado Megía

Madrid, 1998

ISBN: 84-669-1375-0

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

Examinador: Sr. Dr. Rocio Muñoz Calvo

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Pedro Lorente Cortés

Vocal: Sr. Dr. José María de los Angeles

Vocal: Sr. Dr. Emilio Andrés Barber

Vocal: Sr. Dr. José Luis Rey de Villalón Rodríguez

Secretario: Sr. Dr. José Ángel Fuentes Cuervo

IMPLICACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES EN LA
NEURODEGENERACIÓN INDUCIDA POR
3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA (MDMA)

TESIS DOCTORAL

M^a ESTHER O'SHEA GAYA

MADRID, 1998

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

IMPLICACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES EN LA
NEURODEGENERACIÓN INDUCIDA POR
3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA (MDMA)

TESIS DOCTORAL

Directora:

M^a Isabel Colado Megía

Profesora Titular

Departamento de Farmacología

Facultad de Medicina

Tutora:

Rocío Muñoz Calvo

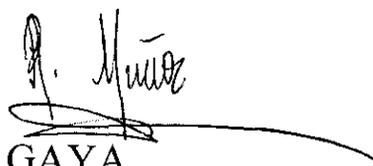
Profesora Titular

Departamento de Fisiología

Facultad de Farmacia



M^a ESTHER O'SHEA GAYA



Madrid, 1998

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que, de una u otra forma, han facilitado la consecuencia de esta Tesis Doctoral.

Al Prof. Dr. Pedro Lorenzo por su calurosa acogida en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UCM, el cual con su gran categoría humana y profesional es un ejemplo para todos aquellos que nos iniciamos en el campo de la Investigación.

A la Dra. M^a Isabel Colado, a quien gracias a su excelente labor investigadora debo mi formación académica y profesional. Su gran amistad y confianza me han servido de apoyo en todo momento.

A la Dra. Rocío Muñoz, del Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, por haber aceptado ser la Tutora de esta Tesis Doctoral, y al Prof. Dr. Mariano Illera por haberme permitido presentar esta Tesis Doctoral en el departamento del cual es Director.

A mis compañeras de equipo, Raquel Granados, Blanca Esteban, Ana Belén Martín y M^a Teresa de Fuentes las cuales con su amistad y ayuda han hecho muy agradable y más fácil mi labor diaria.

Al Prof. Dr. Richard Green por su colaboración y consejos ofrecidos durante el desarrollo de este trabajo. Así como a Dra. Tracey Murray y Anil Misra quienes amablemente me transmitieron sus conocimientos sobre algunas de las técnicas necesarias para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

A todos mis compañeros del Departamento de Farmacología quienes desde el principio hicieron que me sintiera muy a gusto y plenamente integrada en el mismo gracias a su amistad y apoyo. Hemos pasado buenos momentos dentro y fuera del trabajo de los que siempre me acordaré.

A M^a Soledad Alonso por su gran amistad y ayuda a lo largo de este trabajo.

A M^a Elena Vicente, a quien debo agradecerle su cariño y disponibilidad en todo momento.

A la Dra. Pilar Bringas, Manolo y Oscar, así como al resto del personal del Animalario de la UCM por su desinteresada colaboración. A Rubén, Manolo, M^a Luisa y Mari por su asistencia diaria a lo largo de este tiempo.

Al Servicio de Restricción de Estupefacientes del Ministerio de Sanidad y Consumo, el cual ha proporcionado la 3,4-metilenodioximetanfetamina necesaria para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Así como a Astra Arcus, Suecia por haber contribuido a la financiación de este proyecto.

Al Ministerio de Educación y Cultura por haberme concedido una beca de Formación de Personal Investigador.

ABREVIATURAS

AMPT	α -metil- <i>p</i> -tirosina
B _{max}	número total de lugares de recaptación
°C	grados centígrados
Ca ²⁺	iones de calcio
Cl ⁻	iones de cloro
cm	centímetros
CYP2D6	enzima debrisoquina hidroxilasa
DA	dopamina
DEA	Drug Enforcement Agency
2,3-DHBA	ácido 2,3-dihidroxibenzoico
2,5-DHBA	ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DL ₅₀	dosis letal 50
DOPAC	ácido 3,4-dihidroxifenilacético
FDA	Food and Drug Administration
fmol	fentomol
g	gramos
GABA	ácido γ -aminobutírico
GABA _A	receptor _A del ácido γ -aminobutírico
h	horas
H ⁺	iones de hidrógeno
HBr	ácido bromhídrico
5-HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
h.p.l.c.	<i>high pressure liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de alta resolución)
5-HT	5-hidroxitriptamina; serotonina
5-HT _{1A}	receptor _{1A} de serotonina
5-HT ₂	receptor ₂ de serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptófano
HVA	ácido homovanílico
i.c.v.	intracerebroventricular
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
K _D	constante de disociación
kg	kilogramos
LCR	líquido cefalorraquídeo
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenil alanina
M	molar
MAO	monoaminoxidasa
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar

mV	milivoltios
μ A	microamperios
μ l	microlitros
μ M	micromolar
N	normal
ng	nanogramos
nm	nanometros
nM	nanomolar
\cdot OH	radical hidroxilo
PBN	α -fenil- <i>N</i> -ter-butil nitrona
PCA	<i>p</i> -cloroanfetamina
pg	picogramos
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
s.c.	subcutáneo
TH	tirosina hidroxilasa
TPH	triptófano hidroxilasa
V	voltios

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
I.1	La 3,4-metilenodioximetanfetamina: Información general	2
I.1.1	Drogas de diseño o síntesis	2
I.1.2	Química	3
I.1.3	Síntesis e ilegalización	4
I.1.4	Presentación	7
I.1.5	Farmacocinética	7
I.2	Estudios de consumo	8
I.2.1	Los primeros estudios de consumo	8
I.2.2	Estudios en España	8
I.3	Farmacología	9
I.3.1	Acciones farmacológicas	9
I.3.2	Efectos tóxicos	12
I.3.2.1	Complicaciones agudas	12
I.3.2.1.1	Efectos generales	12
I.3.2.1.2	Efectos psiquiátricos	13
I.3.2.2	Complicaciones crónicas	14
I.3.2.2.1	Efectos generales	14
I.3.2.2.2	Efectos psiquiátricos	14
I.3.2.3	Tratamiento	15
I.4	Serotonina y el sistema serotoninérgico	16
I.4.1	La serotonina	16
I.4.1.1	Síntesis	16
I.4.1.2	Liberación	16
I.4.1.3	Metabolismo	16
I.4.2	El sistema serotoninérgico	17
I.4.2.1	Localización	17
I.4.2.2	Morfología	17
I.5	Efectos agudos y a largo plazo de la MDMA en animales de experimentación	18
I.5.1	Efectos agudos	18
I.5.1.1	Efectos sobre sistemas de neurotransmisión	18
I.5.1.1.1	El sistema serotoninérgico	18
I.5.1.1.2	El sistema dopaminérgico	20
I.5.1.1.3	El sistema noradrenérgico	20
I.5.1.2	Efectos sobre el comportamiento	20
I.5.1.3	Otros efectos	21
I.5.2	Efectos a largo plazo	22
I.5.2.1	En roedores	22
I.5.2.1.1	Sistema serotoninérgico	22
I.5.2.1.2	Sistema dopaminérgico	23
I.5.2.2	En primates no humanos	23
I.5.2.2.1	Sistema serotoninérgico	23

I.5.2.2.2	Sistema dopaminérgico	24
I.5.2.2.3	Sistema noradrenérgico	24
I.5.2.3	Regeneración neuronal	25
I.5.3	Factores que afectan la neurotoxicidad	26
I.5.3.1	Dosis y protocolo de administración	26
I.5.3.2	Vías de administración	27
I.5.3.3	Diferencias entre especies	27
I.5.3.4	Parámetros estereoquímicos	28
I.5.4	Mecanismos de neurotoxicidad	28
I.5.4.1	Posible formación de un metabolito tóxico de MDMA	29
I.5.4.2	Posible formación de un metabolito tóxico de 5-HT	30
I.5.4.3	Posible formación de un metabolito tóxico de DA	32
I.5.5	Protección frente a la neurotoxicidad producida por MDMA	34
I.5.5.1	Bloqueantes selectivos de la recaptación de 5-HT	34
I.5.5.2	Antagonistas del receptor 5-HT ₂	35
I.5.5.3	Facilitadores de la función gabaérgica	36
I.5.5.4	Antagonistas de los receptores <i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato (NMDA)	38
I.5.5.5	Compuestos atrapadores de radicales libres	39
I.6	Neurotoxicidad producida por otros derivados anfetamínicos	40
I.6.1	Fenfluramina	40
I.6.2	<i>p</i> -Cloroanfetamina	43
I.7	Hipertermia y neurotoxicidad por derivados anfetamínicos	44
II	OBJETIVOS	48
III	MATERIAL Y MÉTODOS	50
III.1	Animales	51
III.2	Protocolos de administración	51
III.3	Determinación de parámetros neuroquímicos en tejido cerebral	52
III.3.1	Determinación de niveles de monoaminas y metabolitos	52
III.3.1.1	Extracción y preparación de muestras	52
III.3.1.2	Cuantificación de la concentración de monoaminas y metabolitos	52
III.3.2	Determinación de los lugares de recaptación de 5-HT	53
III.3.2.1	Extracción y preparación de muestras	54
III.3.2.2	Fijación de [³ H]paroxetina	54
III.3.2.3	Determinación de proteínas	55
III.4	Microdiálisis intracerebral <i>in vivo</i>	55
III.4.1	La técnica	55
III.4.1.1	Factores que influyen en el desarrollo de la técnica	55
III.4.1.2	Ventajas de la microdiálisis	58
III.4.2	Fabricación de sondas	58
III.4.3	Determinación de radicales hidroxilo en el dializado de hipocampo	60
III.4.3.1	Implantación de sondas	60
III.4.3.2	Método atrapador de salicilato	60
III.4.3.3	Fracción de extracción de las sondas	63

III.4.3.4 Microdiálisis	63
III.4.3.5 Cuantificación de la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA	64
III.4.4 Determinación de DA y sus metabolitos en el dializado estriatal	64
III.4.4.1 Implantación de sondas	64
III.4.4.2 Fracción de extracción de las sondas	65
III.4.4.3 Microdiálisis	65
III.4.4.4 Cuantificación de la concentración de DA y sus metabolitos	65
III.5 Medición de la temperatura rectal de ratas	66
III.6 Fármacos y reactivos químicos	66
III.7 Estadística	67
IV RESULTADOS	69
IV.1 Efecto de la α -fenil- <i>N</i> -ter-butil nitrona (PBN) sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA	70
IV.1.1 Efecto de MDMA sobre la concentración cerebral de 5-HT y 5-HIAA	70
IV.1.2 Efecto de MDMA sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en corteza cerebral	70
IV.1.3 Efecto de MDMA sobre la concentración estriatal de DA y DOPAC	71
IV.1.4 Efecto de PBN sobre la disminución del contenido indólico inducido por MDMA	71
IV.1.5 Efecto de PBN sobre la disminución de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT inducida por MDMA	71
IV.1.6 Efecto de PBN sobre la concentración estriatal de DA y DOPAC en ratas tratadas con MDMA	72
IV.2 Efecto de PBN sobre la toxicidad aguda de la MDMA	77
IV.2.1 Efecto de MDMA sobre la concentración cerebral de 5-HT y 5-HIAA	77
IV.2.2 Efecto de MDMA sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en corteza cerebral	77
IV.2.3 Efecto de MDMA sobre la concentración estriatal de DA y sus metabolitos	77
IV.2.4 Efecto de MDMA sobre la temperatura rectal	78
IV.2.5 Efecto de PBN sobre la disminución del contenido indólico inducido por MDMA	78
IV.2.6 Efecto de PBN sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral de ratas tratadas con MDMA	78
IV.2.7 Efecto de PBN sobre la concentración estriatal de DA y sus metabolitos en ratas tratadas con MDMA	79
IV.2.8 Efecto de PBN sobre la hipertermia inducida por MDMA	79
IV.3 Formación de radicales hidroxilo inducida por MDMA: efecto de PBN	85
IV.3.1 Efecto de MDMA sobre la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo	85
IV.3.2 Efecto de MDMA sobre la temperatura rectal de ratas sometidas a microdiálisis	85

IV.3.3	Efecto de PBN sobre la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado	86
IV.3.4	Efecto de PBN sobre la hipertermia inducida por MDMA en ratas sometidas a microdiálisis	86
IV.3.5	Efecto de MDMA sobre la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo de ratas pretratadas con fenfluramina	86
IV.3.6	Efecto de MDMA sobre la temperatura rectal de ratas pretratadas con fenfluramina	87
IV.4	Formación de radicales hidroxilo inducida por otros derivados anfetamínicos	94
IV.4.1	Efecto de fenfluramina sobre la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo	94
IV.4.2	Efecto de fenfluramina sobre la temperatura rectal de ratas sometidas a microdiálisis	94
IV.4.3	Efecto de <i>p</i> -cloroanfetamina sobre la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo	94
IV.4.4	Efecto de <i>p</i> -cloroanfetamina sobre la temperatura rectal de ratas sometidas a microdiálisis	95
IV.5	Neurotoxicidad inducida por otros derivados anfetamínicos a largo plazo	100
IV.5.1	Efecto de fenfluramina sobre la concentración cerebral de 5-HT y 5-HIAA	100
IV.5.2	Efecto de fenfluramina sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en corteza cerebral	100
IV.5.3	Efecto de fenfluramina sobre la concentración estriatal de DA y DOPAC	100
IV.5.4	Efecto de fenfluramina sobre la temperatura rectal	101
IV.5.5	Efecto de <i>p</i> -cloroanfetamina sobre la concentración cerebral de 5-HT y 5-HIAA	101
IV.5.6	Efecto de <i>p</i> -cloroanfetamina sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT	101
IV.5.7	Efecto de <i>p</i> -cloroanfetamina sobre la concentración estriatal de DA y DOPAC	101
IV.5.8	Efecto de <i>p</i> -cloroanfetamina sobre la temperatura rectal	102
IV.6	Efecto de L-3,4-dihidroxifenil alanina (L-DOPA) en ratas tratadas con MDMA	109
IV.6.1	Efecto de L-DOPA sobre la formación de 2,3- y 2,5-DHBA inducida por MDMA en el hipocampo	109
IV.6.2	Efecto de L-DOPA sobre los efectos neurotóxicos inducidos por MDMA	109
IV.6.3	Efecto de L-DOPA sobre la concentración de DA y sus metabolitos en el dializado estriatal de ratas tratadas con MDMA	110
IV.6.4	Efecto de L-DOPA sobre la hipertermia inducida por MDMA	110
IV.6.5	Efecto de la administración de L-DOPA con una dosis no tóxica de MDMA	110
IV.6.5.1	Efecto de L-DOPA sobre diversos parámetros	

serotoninérgicos en ratas tratadas con MDMA	111
IV.6.5.2 Efecto de L-DOPA sobre la concentración de DA y sus metabolitos en el dializado estriatal de ratas tratadas con MDMA	111
IV.6.5.3 Efecto de L-DOPA sobre la hipertermia inducida por MDMA	111
V DISCUSIÓN	124
V.1 Radicales libres y neurodegeneración por MDMA	125
V.2 Dopamina y neurodegeneración por MDMA	137
VI CONCLUSIONES	144
VII BIBLIOGRAFÍA	146

I. INTRODUCCIÓN

I.1. LA 3,4-METILENODIOXIMETANFETAMINA: INFORMACIÓN GENERAL

La 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, “éxtasis”) es un derivado anfetamínico con actividad estimulante y alucinógena perteneciente al grupo denominado drogas de síntesis. El “éxtasis” también es popularmente conocido en los Estados Unidos con los nombres de XTC, M&M, Essence, Adam, y con la letra "E" en el Reino Unido.

A partir de la última década el “éxtasis” se ha venido empleando cada vez con más frecuencia como droga recreacional de abuso en nuestro entorno social, principalmente por sectores de la población juvenil. A finales de los años 80 el consumo era esporádico y aquellos que lo consumían regularmente lo utilizaban a una dosis de 75-150 mg (1-2 comprimidos) una o dos veces en un fin de semana, y generalmente no más de dos veces al mes. En los últimos 7 años el consumo se ha asociado con un nuevo género de fiestas - aquellas que en inglés se denominan “raves” - que duran toda la noche y durante las cuales la gente baila frenéticamente al ritmo de la música “techno” o “house” bajo un juego de luces laser en aforos de mil o más personas. En este ambiente se puede llegar a consumir hasta 8 comprimidos de MDMA en una sola noche, repitiendo el protocolo todos los fines de semana (McCann y col., 1996).

I.1.1 DROGAS DE DISEÑO O SÍNTESIS

El “éxtasis” pertenece a un grupo de drogas denominadas “drogas de diseño” o “síntesis”.

El término *designer drugs* que se ha traducido al español como “drogas de diseño” fue introducido en los años sesenta por Gary Henderson, un farmacéutico de la Universidad de California. Ideó este término para denominar sustancias de origen sintético cuyo consumo y tráfico, por tratarse de novedades químicas no podían ser perseguidos por vía legal (Capdevila, 1995; Gamella y Roldán, 1997).

Según Gamella y Roldán (1997), hoy en día se considera que este término no es muy preciso o riguroso ni química ni farmacológicamente y se tiende a usar el término “drogas de síntesis” que se refiere a “drogas sintéticas conocidas para las que en un cierto momento se

encuentra mercado, satisfaciendo nuevas demandas o sustituyendo a psicofármacos controlados.”

En la actualidad, la mayor parte del interés científico sobre la MDMA está orientado a la investigación de la neurotoxicidad en animales de experimentación, si bien recientemente la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana ha aprobado la realización de ensayos clínicos limitados en humanos. En este sentido, en los últimos cinco años se vienen realizando algunos de estos estudios en centros de investigación suizos, cuyos resultados aún no han sido publicados.

1.1.2 QUÍMICA

La MDMA (3,4-metilenodioximetanfetamina; N-metil-1-(3,4-metilaenodioxifenil)-2-amino-propano) es una base sintética derivada de la feniletilamina.

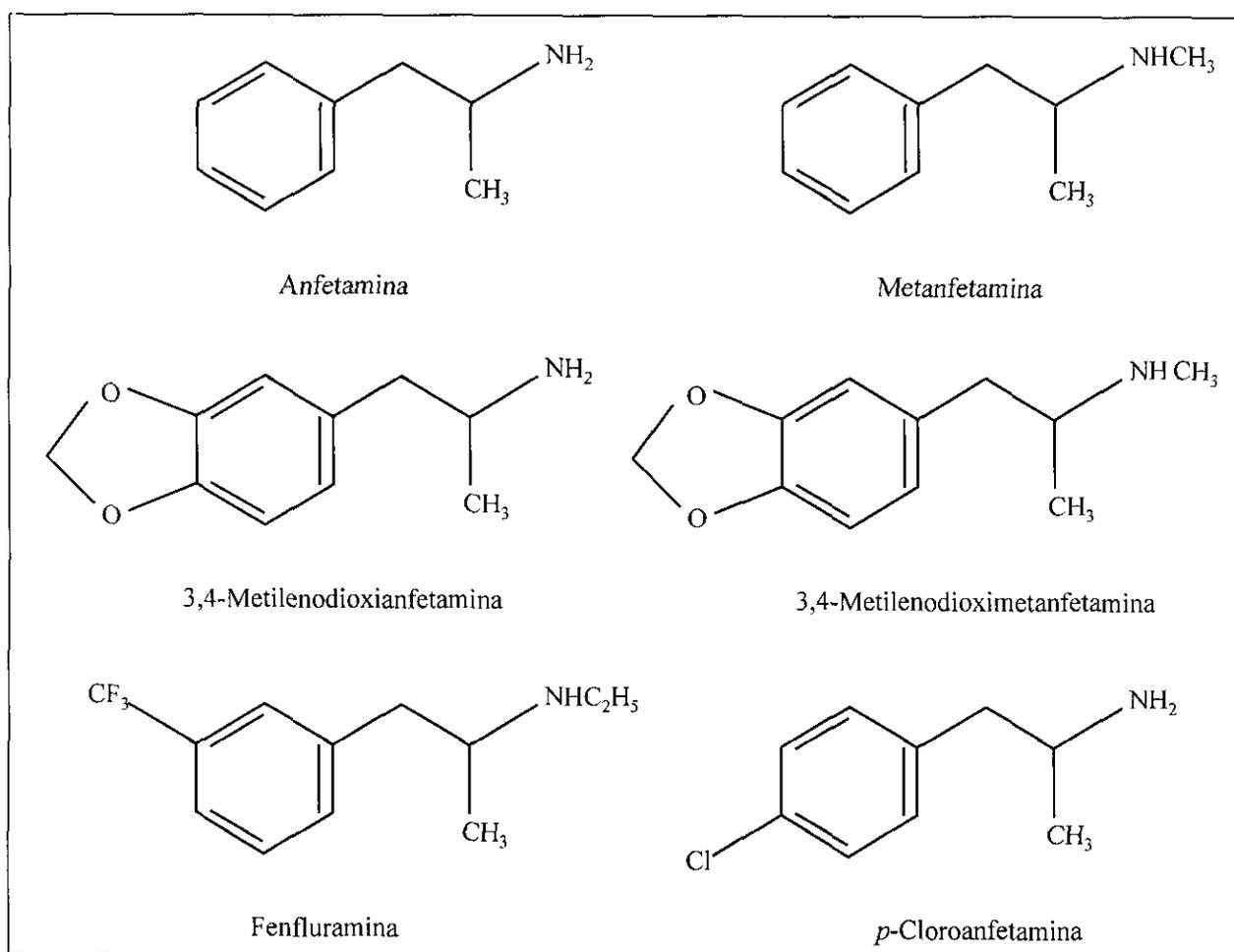


Figura 1. Anfetamina y algunos derivados anfetamínicos.

Está relacionada estructuralmente con la sustancia estimulante psicomotora, anfetamina y la sustancia alucinógena, mescalina, compartiendo propiedades de ambos compuestos.

La MDMA tiene un centro quiral en el carbono alfa con un par de isómeros ópticos, S-(+)-dextrorrotatorio y R-(-)-levorotatorio, ejerciendo mayor actividad en el sistema nervioso central el isómero dextrorrotatorio (Anderson y col., 1978; Schmidt, 1987a).

1.1.3 SÍNTESIS E ILEGALIZACIÓN

La 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA, “píldora de amor”) fue sintetizada por primera vez en 1910 por los químicos alemanes G. Mannish y W. Jacobsen, de la compañía Merck de Darmstadt (Alemania), aunque por aquel entonces no llegó a ser administrada a ningún ser humano o animal. Entre 1910 y 1912 la misma compañía aisló accidentalmente la MDMA, aunque no se conoce ni el nombre del químico ni la fecha de su síntesis. El primer documento público referente a la preparación y propiedades de esta droga corresponde a una patente solicitada en 1912. Dos años más tarde, en 1914, la patente fue otorgada con el propósito de usar la MDMA como supresor del apetito (Shulgin, 1986) y como intermediaria en la síntesis de compuestos con actividad terapéutica (Merck, 1914).

En aquel momento no se realizaron estudios farmacológicos sobre el “éxtasis” y la “píldora del amor” (MDA), y ambas sustancias cayeron en el olvido hasta que, en 1953, el ejército norteamericano decidió probarlas en distintas especies animales para observar su toxicidad (Hardman y col, 1973).

En 1957, en un congreso se describieron por primera vez los efectos psicoactivos de la MDA: aumento de la percepción, alucinaciones y una sensación de hallarse fuera de su cuerpo. A partir de los años sesenta se empezó a popularizar la droga en Estados Unidos, con los nombres de *hug-drug* (droga del abrazo), *the love drug* (la droga del amor), *the mellow drug of America* (la droga suave de América), o bien *amphetamine for lovers* (anfetamina para amantes). A finales de la década, la “píldora del amor” era ya una de las drogas más consumidas, situándose en la Lista I del *Controlled Substances Act* de EE.UU. en 1970.

También en los años setenta la MDMA comenzó a ser utilizada por psiquiatras por su capacidad para producir alteraciones del estado de la conciencia, con elevación del tono emocional y sensual, y para incrementar sentimientos de empatía (Greer y Tolbert, 1986). Estas propiedades incitaron al uso de esta droga como coadyuvante de la psicoterapia, como

un elemento de ayuda al desbloqueo emocional y la comunicación personal (Shulgin, 1986, 1990; Peroutka, 1987; Eisner, 1989; Greer y Tolbert, 1990). En 1978 se publicó el primer informe sobre la psicoactividad de la MDMA en el ser humano, escrito por Alexander Shulgin (profesor de toxicología forense en la Universidad de Berkeley y descubridor de los efectos psicoactivos de la MDMA) y David E. Nichols (Shulgin y Nichols, 1978). A principios de la década de los ochenta el consumo de la MDMA se generalizó y se empezó a conocer por sus numerosos nombres callejeros.

En 1984, la Organización Mundial de la Salud (OMS) revisó los informes sobre incautaciones de drogas e identificó a la MDMA como la única feniletilamina que había sido confiscada varias veces. Esto indicaba un incremento en su fabricación, distribución y consumo. A raíz de este descubrimiento la Drug Enforcement Agency (DEA) manifestó su propósito de incluir la MDMA en la Lista I del *Controlled Substances Act* (Mullen, 1984). Esta lista incluye las sustancias cuya venta está prohibida y que son juzgadas como carentes de utilidad terapéutica. En esta lista se encuentran sustancias como la heroína, la dietilamida del ácido lisérgico (LSD) y la cocaína. El aviso de la DEA creó una polémica sobre todo en el mundo de la psicoterapia donde la MDMA se venía usando para incrementar la comunicación, la empatía y para reducir el miedo. Aunque la polémica no sirvió para cambiar la clasificación legal de la MDMA sí lo hizo para llevar a la luz pública esta droga de síntesis y fue a partir de este momento cuando hubo un aumento en la fabricación y consumo de la droga. En 1985, la DEA incluyó la MDMA provisionalmente en la Lista I del *Controlled Substances Act*. Dos razones parecen ser las que provocaron esta decisión. Primero, un estudio que, en aquel momento, aún no se había publicado en el que se asociaba el uso de altas dosis de MDA por vía intravenosa en ratas con neurotoxicidad serotoninérgica (Ricaurte y col., 1985) y segundo, un incremento repentino en el volumen de MDMA producido y distribuido desde el estado de Tejas (United States Department of Justice, 1985).

Finalmente, pese a los intentos realizados por varios grupos de forzar a la DEA a cambiar la clasificación de la MDMA a una lista de sustancias menos controlada, la MDMA fue incluida definitivamente en la Lista I en marzo 1988 (Capdevila, 1995).

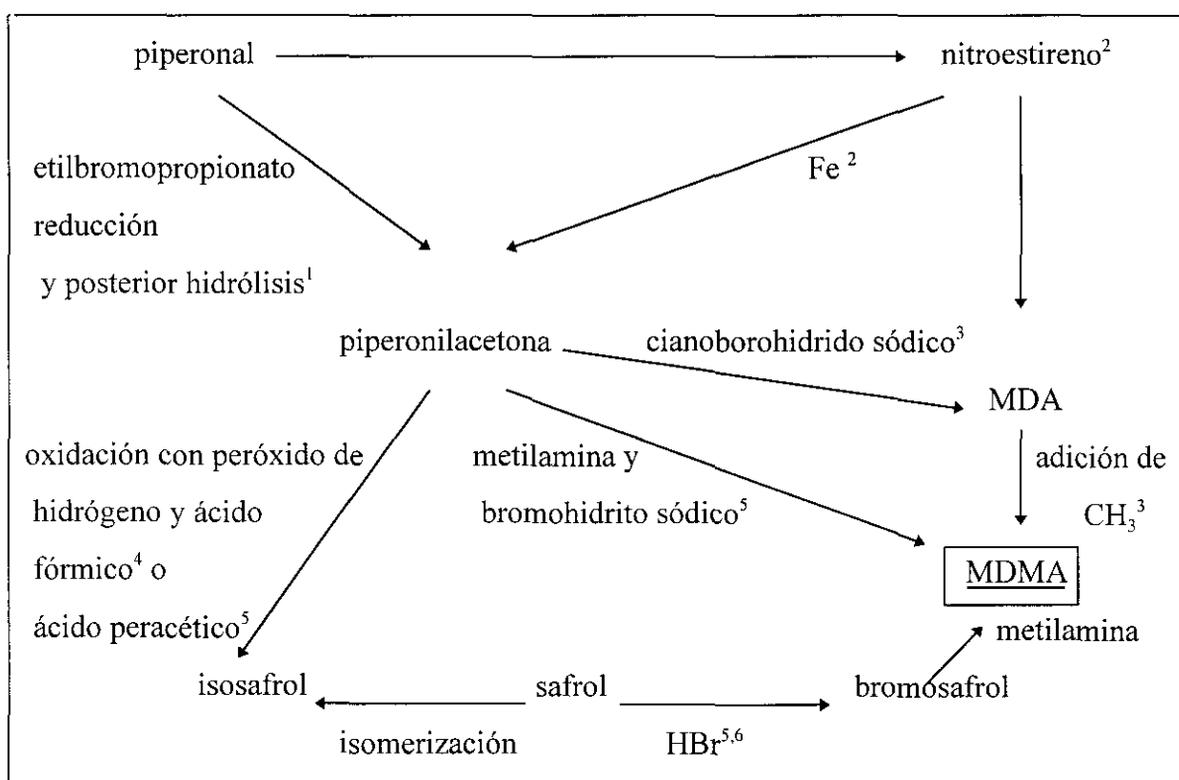
Tras su ilegalización en Estados Unidos, los esfuerzos del sector médico que apoyaba el uso de la droga en psicoterapia se orientaron a conseguir que la OMS situara a la MDMA en una clasificación de menos control y así hacer posible la fabricación y uso legal por parte de terapeutas profesionales. No obstante en 1986, la Comisión de Estupefacientes de la

Organización de las Naciones Unidas acordó incluir la MDMA y otros productos, en la Lista I del Convenio sobre Psicotrópicos de 1971 convirtiendo a la MDMA en droga ilegal en todo el mundo (Capdevila, 1995).

España, en una orden ministerial en mayo 1986, prohibió “el uso, fabricación, importación, tránsito, comercio y tenencia de dicha sustancia, así como lo preparados que la contengan.” (Capdevila, 1995).

Actualmente la MDMA no se sintetiza de forma legal con la excepción de firmas comerciales autorizadas para ello o grupos de investigación a los que se les ha concedido una licencia especial. En ambos casos se utiliza para la identificación de sustancias en el control de estupefacientes y para la investigación.

La MDMA se puede sintetizar a partir de varios compuestos:



¹ Elks y Hey, 1943.

² Binierki, col., 1962.

³ Braun y col., 1980.

⁴ Fujisawa y Deguchi, 1954.

⁵ Hansson, 1987.

⁶ Binierki y Krajewski, 1960.

Los compuestos utilizados para la fabricación de MDMA están controlados por la Directiva 92/109/EEC de la Unión Europea.

I.1.4 PRESENTACIÓN

En su forma pura se presenta como un polvo blanco de sabor amargo. Suele, sin embargo, presentarse en forma de clorhidrato. En la calle se encuentra normalmente en forma de comprimido y ocasionalmente en forma de cápsula. Al comienzo de su consumo la cápsula era la forma más producida pero durante el periodo de popularización, alrededor de la segunda mitad de los años ochenta, las cápsulas dieron paso a las pastillas ya que este material era más resistente a la manipulación y al traslado y, por lo tanto, más fácil de producir y manejar. Este cambio dio lugar a la creencia entre los usuarios de que las cápsulas eran más puras y potentes y, por lo tanto, su precio era mayor (Gamella y Roldán, 1997).

Los comprimidos son en general pequeños redondos y en muchos casos de colores. En su gran mayoría llevan un dibujo que suele dar lugar a su nombre común como puede ser “delfines”, “toros” o “soviéticas”.

Los comprimidos incluyen otras sustancias aparte de la MDMA e incluso se han dado casos de comprimidos que no contenían MDMA. Estas sustancias incluyen lactosa o manitol y en menor medida otras sustancias psicoactivas como la cafeína, efedrina u otras anfetaminas. También se han encontrado casos de comprimidos que contenían, safrol o isosafrol procedentes, sin duda, de inadecuados procesos de síntesis (ver I.1.4. Síntesis)

I.1.5 FARMACOCINÉTICA

La MDMA se absorbe muy bien por todas las vías de administración, si bien su eficacia farmacológica parece ser mayor cuando se administra por vía parenteral, según las investigaciones llevadas a cabo en distintas especies animales (Ricaurte y col., 1988a; McKenna y Peroutka, 1990). Su distribución es amplia, atraviesa bien las barreras orgánicas por su liposolubilidad y especialmente la barrera hematoencefálica.

El metabolismo de la MDMA ha sido estudiado ampliamente *in vivo* e *in vitro* en varias especies animales, siendo estas investigaciones de particular interés por la posible implicación de algunos metabolitos en las acciones farmacológicas y tóxicas del compuesto original (ver apartado I.5. Efectos agudos y a largo plazo de la MDMA en animales de experimentación.)

I.2. ESTUDIOS DE CONSUMO

I.2.1 LOS PRIMEROS ESTUDIOS DE CONSUMO

En 1988 Peroutka realizó un estudio retrospectivo a través de un cuestionario en la Universidad de Stanford, California. El cuestionario se distribuyó entre 100 estudiantes de edades comprendidas entre 18 y 25 años que consumían la droga con fines recreativos. Se les preguntaba sobre los efectos subjetivos agudos (<24 h) y subagudos (>24 h) inducidos por la MDMA. El promedio de dosis consumidas fue de 5.4 y la cantidad de droga ingerida por dosis osciló entre 60 y 250 mg (1 - 4 mg kg⁻¹, aproximadamente). Durante la fase aguda de los efectos de la MDMA el 90% de los individuos mostraron una sensación exagerada de intimidad con la gente, que se manifestaba por una mayor capacidad verbal y por una mayor facilidad para interactuar con los demás. El estado de alerta aumentó en un 50 % de los sujetos, mientras un 38 % mostró mayor dificultad para la concentración. Aparecieron además una gran variedad de efectos fisiológicos indicativos de las acciones simpaticomiméticas de esta droga: taquicardia (72 %), sequedad de boca (61 %), temblor (42 %), palpitaciones (41 %), diaforesis (38 %) y parestesias (35 %). Trismo y bruxismo aparecieron en un 75 % y 65 % de los sujetos, respectivamente. Alteraciones visuales, que no llegaron a ser verdaderas alucinaciones, aparecieron en un 20 % de los encuestados (Peroutka, 1988).

I.2.2 ESTUDIOS EN ESPAÑA

Hay ya varios trabajos nacionales que incluyen encuestas poblacionales, algunos datos sobre la extensión, la demografía y ecología del uso, pero son muy escasos los estudios que analizan las características del uso y de los usuarios de estas sustancias en nuestro país, los problemas derivados del consumo o incluso el contenido mismo de las “pastillas” consumidas.

Gamella y Roldán realizaron uno de los estudios antropológicos más amplios llevado a cabo paralelamente en cinco comunidades autónomas (Gamella y Roldán, 1997) en el cual se ha estudiado la evolución del consumo de “éxtasis” en España; la demografía y pautas de uso del “éxtasis”; motivaciones y efectos.

I.3. FARMACOLOGÍA

Entre 1953 y 54 se realizó un estudio toxicológico en la Universidad de Michigan, bajo contrato del ejército norteamericano, sobre ocho feniletilaminas, entre ellas MDMA, en cinco especies de animales. Los resultados se publicaron en 1973 por el grupo de Hardman (Hardman y col., 1973). El estudio proporcionó las DL₅₀ de MDMA en las distintas especies (Tabla 1).

Tabla 1

Animal	Vía de Administración	DL ₅₀ MDMA (mg kg ⁻¹)
Ratón	i.p.	97
Rata (Sprague-Dawley)	i.p.	32
Cobayo	i.p.	98
Perro	i.v.	14
Mono (<i>Macaca mulatta</i>)	i.v.	22

También se observó que la inyección intravenosa producía convulsiones, rigidez, temblor y actitudes grotescas de los animales con un comportamiento interpretado como análogo al de las alucinaciones, así como un conjunto de signos característicos de la estimulación simpática: midrasis, piloerección, hipertermia y aumento de la frecuencia cardíaca.

I.3.1 ACCIONES FARMACOLÓGICAS

El primer informe sobre las acciones farmacológicas de la MDMA en humanos apareció en 1978 (Shulgin y Nichols, 1978) pero este no hacía referencia al uso experimental que se llevaba a cabo desde ya hacía dos años en el mundo de psicoterapia. Se limitaba a una descripción de la acción de la MDMA y la comparaba con la acción de MDA en dosis bajas. Posteriormente, se describió a la MDMA como una sustancia capaz de ocasionar " un estado de consciencia modificado de fácil control, con acentos emocionales y sensuales...y escaso efecto alucinatorio." (Shulgin, 1986), "Dentro del rango de dosis eficaces, 75-150 mg por vía

oral, sus efectos aparecen rápidamente, normalmente durante los 30 primeros minutos de su administración, alcanzando una fase de meseta 30-60 min después. Aparece una euforia leve, aumento de la empatía, del estado de alerta y de la actividad mental y alteraciones visuales que no llegan a ser verdaderas alucinaciones. Los síntomas se disipan gradualmente 2 horas después, quedando solo una ligera estimulación residual..."(Shulgin, 1990).

El único estudio fisiológico sobre la MDMA publicado hasta el momento fue dirigido por el psiquiatra Joseph Downing. Se realizó en el transcurso de un congreso sobre la MDMA que tuvo lugar en 1985 en el Instituto Esalen de Big Sur, California, poco antes de que el éxtasis fuese prohibido (Downing, 1986). Se administraron dosis de 1.7 mg kg^{-1} de MDMA por vía oral a consumidores experimentados en la sustancia que no padecían trastornos físicos o psíquicos de importancia. Las edades de los individuos estaban comprendidos entre los 20 y 58 años, con una media de 31 y un total de 21 sujetos. Durante la ingestión se analizaron varios parámetros físicos, se hicieron análisis de sangre y en algunos casos se realizaron ensayos neurológicos y electrocardiogramas. A los 30-60 min de la ingestión se produjeron algunas respuestas cardiovasculares en todos los individuos, incluyendo una subida de la presión sanguínea sistólica y diastólica, y un aumento del ritmo cardíaco.

A las seis horas de ingerir MDMA, la presión sanguínea había llegado a unos valores menores a los previos al suministro de la droga. A menudo, la presión sanguínea aún era menor 24 horas después, observándose, incluso, hipotensión.

Dieciséis consumidores experimentaron una contracción de las mandíbulas, catorce cierto dolor pasajero de cabeza y otros tantos sacudidas rítmicas de los párpados. Todos tenían las pupilas dilatadas y casi la mitad sufrieron nistagmus. Uno de los sujetos presentó alteraciones en coordinación motora, por lo que se sugirió que pudiera ser peligroso conducir bajo los efectos de MDMA. En todos los consumidores, el apetito decreció durante las 24 horas posteriores a la administración.

La ingestión de MDMA no produjo ningún tipo de daño psicológico o fisiológico, ni durante el periodo de veinticuatro horas del estudio, ni durante los tres meses de investigación posterior.

Existen en la literatura numerosos estudios en los que se describen los efectos psicoactivos de la MDMA como droga auxiliar de la psicoterapia. Dada la naturaleza de los efectos estudiados, estos estudios suelen estar basados principalmente en autoinformes retrospectivos o clínicos de los usuarios (Downing, 1986; Greer y Tolbert, 1986; Siegal, 1986;

Beck., 1986; Peroutka y col., 1988; Liester y col., 1992; Solowij y col., 1992). Estos informes atribuyen a la MDMA tres tipos de propiedades: estimulantes, psicodélicas y “entactógenas”. La mayoría de estos trabajos coinciden en señalar que la MDMA comparte con las anfetaminas algunas propiedades estimulantes, mientras que tiene en común con los alucinógenos cierta capacidad para alterar la percepción de la realidad, que puede llegar incluso a producir alucinaciones, normalmente cuando se ingiere en dosis elevadas. La tercera propiedad de la droga es la supuesta cualidad que tiene esta sustancia para facilitar las relaciones interpersonales y permitir el acceso al mundo interior del individuo. Debido a la capacidad de MDMA y sus análogos para inducir empatía e intensificar la comunicación, en 1983, Metzner les dió a este grupo de fenilaminas el nombre de “empatógenas” (Capdevila, 1995). Tres años más tarde David Nichols propuso el término “entactógeno”, a partir de la raíz latina *tactus* (tacto) y las raíces griegas *en* (dentro) y *gen* (producir), para designar la capacidad que parecen tener estas sustancias para permitir el acceso a la experiencia interior de los individuos (Nichols, 1986).

Greer y Tolbert (Greer y Tolbert, 1990) supervisaron diversas sesiones clínicas desde 1981 hasta 1985, cuando la MDMA fue incluida en la Lista I. Describen que la MDMA, en circunstancias adecuadas, reduce o de alguna manera elimina la respuesta provocada por el miedo a una amenaza percibida contra la integridad emocional del paciente. Esto da lugar a una experiencia emocional correctiva que probablemente reduce los efectos patológicos de experiencias traumáticas previas. La MDMA también produce un aumento en la capacidad de comunicación sobre todo con la familia. Además reduce la sensación de ser amenazado y los síntomas somáticos primarios de miedo: la opresión torácica, de la garganta y del abdomen. Se manifiesta también una mejora del autoconocimiento; como sugiere el nombre entactógenos. Ya que la MDMA no altera ni la percepción, ni el pensamiento ni la memoria (excepto a dosis elevadas) los efectos de MDMA sobre el miedo y la capacidad de comunicación continúan durante mucho tiempo después de la ingesta (Greer y Tolbert, 1990).

En 1992 se publicó un estudio retrospectivo realizado por Liester y col. con 20 psiquiatras que habían tomado MDMA previamente. Los sujetos, mediante entrevistas, manifestaron los siguientes efectos: alteración del tiempo de percepción (90 %), aumento de la capacidad para comunicarse (85 %), disminución del estado de alerta (80 %), disminución del miedo (65 %), disminución del sentido de alejamiento de los demás (60 %), cambios en la percepción visual (50 %), aumento de la conciencia emocional (50 %) y disminución de la

agresividad (50 %). Más del 25 % de los sujetos del estudio manifestaron alteraciones del lenguaje, disminución de la capacidad de obsesionarse, cambios cognitivos y atenuación de los estados de inquietud e impulsividad. Otros efectos referidos fueron: disminución de las ganas de llevar a cabo tareas físicas o mentales (70 %), disminución del apetito (65 %) y trismo (50 %) (Steele y col., 1994).

La MDMA ha sido objeto de recientes debates científicos y legales basados en los informes de varios especialistas en salud mental que consideran que la MDMA puede producir alteraciones del estado de la conciencia, con elevación del tono emocional y sensual (Shulgin y Nichols, 1978), y sentimientos de empatía (Greer y Tolbert, 1986). Son precisamente estas propiedades las que han incitado a usar esta droga como coadyuvante de la psicoterapia (Greer y Tolbert, 1990).

I.3.2 EFECTOS TÓXICOS

El consumo de “éxtasis” se ha asociado en la literatura médica con varias patologías orgánicas y psicógenas. Las complicaciones asociadas con la ingesta de MDMA se pueden dividir en agudas y crónicas dependiendo de si remiten o no en las 48 h después de la ingesta. Además en cada categoría, las complicaciones se pueden dividir en efectos generales y efectos psiquiátricos.

I.3.2.1 Complicaciones agudas

I.3.2.1.1 Efectos generales

Tras la ingesta de MDMA pueden aparecer diversos efectos fisiológicos como náuseas, vómitos, sequedad de boca, trismo, bruxismo, hipertensión, palpitaciones, cefaleas, hiperreflexia, dificultad para caminar y deficiencia en la coordinación motora, tensión o dolor muscular, urgencia urinaria, diaforesis, paraestésias, anorexia, brotes de calor o frío, nistagmus, visión borrosa, desmayos, respiración deprimida y alucinaciones visuales (Downing, 1986; Greer y Tobert, 1986; Peroutka y col., 1988; Leister y col., 1992; Solowij y col., 1992).

Además de estos efectos de menor gravedad existe una serie de reacciones adversas graves que incluyen alteraciones del sistema cardiovascular como arritmias y asistoles (Dowling y col., 1987; Henry y col., 1992) y colapso cardíaco (Suárez y Reimersma, 1988), accidentes cerebrovasculares como hemorragias, trombosis e infartos cerebrales (Harries y De Silva, 1992; Henry y col., 1992; Gedhill y col., 1993; Manchanda y Conolly, 1993; Rothwell y Grant, 1993), hiponatremias y el síndrome de secreción inadecuada de hormona antidiurética (Maxwell y col., 1993; Satchell y Connaughton, 1994), y hepatotoxicidad (Gorard y col., 1992; Henry y col., 1992; Shearman y col., 1992).

También existe un cuadro que se ha asociado con el consumo de MDMA en lugares cerrados y calurosos acompañado por ejercicio físico excesivo. Esto ocurre fundamentalmente en las discotecas o bailes “rave”. Los síntomas asociados con este cuadro son la deshidratación, la hipertermia (la acción de la MDMA sobre la serotonina en algunas zonas cerebrales puede provocar alteraciones en el centro termorregulador que se traducen en un aumento de la temperatura corporal), ataques de tipo epilépticos, rabdomiólisis, coagulación intravascular diseminada e insuficiencia renal aguda (Brown y Osterloh, 1987; Chadwick y col., 1991; Campkin y Davies, 1992; Henry, 1992; Barrett y Taylor, 1993; Roberts y Wright, 1993; Padkin, 1994; Walsh, 1994; Lehmann y col., 1995; Wake, 1995).

I.3.2.1.2 Efectos psiquiátricos

Las patologías psiquiátricas más comúnmente asociadas a la ingesta de MDMA y análogos incluyen trastornos de ansiedad (Downing, 1986; Greer y Tolbert, 1986), angustia (McCann y Ricaurte, 1992; Pallanti y Mazzi, 1992; McGuire y col., 1994), miedo, paranoia, fatiga y confusión mental (Downing, 1986; Greer y Tobert, 1986), depresiones (Benazzi y Mazzoli, 1991; McGuire y col., 1994; Schifano y Magni, 1994) y trastornos psicóticos (Creighton y col., 1991; McGuire y Fahy, 1991, Schifano, 1991; McGuire y col., 1994; Schifano y Magni, 1994).

1.3.2.2 Complicaciones crónicas

1.3.2.2.1 Efectos generales

Como en el caso de las complicaciones agudas, las complicaciones crónicas pueden ser de mayor o menor gravedad.

Los efectos agudos trismo y bruxismo dan lugar a la aparición del síndrome de la unión temporomandibular, erosión dental y dolor miofacial (Duxbury, 1993) que son efectos de menor gravedad aunque el uso de inhibidores de la monoaminaoxidasa para tratar el síndrome de la unión temporomandibular puede producir, en combinación con MDMA u otras anfetaminas, una reacción grave caracterizada por hipertensión, confusión, taquicardia y en algunos casos coma y muerte (Smilkstein y col., 1987).

Efectos más graves incluyen trastornos hematológicos como anemia aplásica (Marsh y col., 1994) y hepatotoxicidad (Henry, 1992; Henry y col., 1992; Dykhuizen y col., 1995).

1.3.2.2.2 Efectos psiquiátricos

Estos incluyen ataques de pánico (McCann y Ricaurte, 1992; Pallanti y Mazzi, 1992; Schifano y Magni, 1994; McGuire y col., 1994), psicosis (Creighton y col., 1991; McGuire y Fahy, 1991; Schifano, 1991; Schifano y Magni, 1994; McGuire y col., 1994), reiteradas manifestaciones de agresividad (Schifano y Magni, 1994), trastorno depresivo mayor (Benazzi y Mazzoli, 1991; McCann y Ricaurte, 1991; Schifano y Magni, 1994) además de alteraciones cognitivas y de la memoria (McCann y Ricaurte, 1991; Schifano y Magni, 1994).

Cabe resaltar que según algunos autores que observaron estos efectos (McCann y Ricaurte, 1991; McGuire y col., 1994) existen factores genéticos que influyen en las enfermedades psiquiátricas y en algunos casos existía un problema psiquiátrico previo a la aparición de los efectos relacionados con la ingesta de MDMA (McCann y col., 1996).

1.3.2.3 Tratamiento

Una de las prioridades en el caso de toxicidad por MDMA consiste en la prevención o reversión de la hipertermia. Ya en algunas discotecas o bailes “rave” existen cuartos especiales destinados a proporcionar un ambiente menos caluroso que en el área de baile (Green y col., 1995). En la clínica en algunos casos puede que sea necesario envolver el cuerpo en hielo (Green y col., 1995). Henry (1992) recomienda el uso de dantroleno, aunque Barrett (1992) afirma que al ser un relajante muscular periférico y no tener efectos centrales, no actúa en el lugar donde existe el problema. Sin embargo es eficaz (Green y col., 1995) y otros autores recomiendan su uso (Singarajah y Lavies, 1992; Tehan, 1993).

Basándose en estudios procedentes de animales, se ha sugerido que clometiazol (Colado y col., 1993; Hewitt y Green, 1994), haloperidol (Hewitt y Green, 1994), ritanserina (Nash y col., 1988; Schmidt y col., 1990a) o metisergida podrían tener un posible valor terapéutico en el control de la hipertermia (Green y col., 1995). Sin embargo el uso de neurolépticos no está recomendado ya que existe una asociación entre la administración de neurolépticos y la aparición de hipertermia en el síndrome neuroléptico maligno (Kaufmann y Wyatt, 1987).

Se ha comprobado que la clorpromazina antagoniza las acciones tóxicas de la MDMA, provocando un retorno veloz a parámetros normales en situaciones de hipertermia, taquicardia, hipertensión arterial, aumento de la resistencia vascular periférica y del gasto cardíaco (Davis y col., 1986).

Las benzodiacepinas se han utilizado para el control de la excitación y convulsiones. (Green y col., 1995) producidas por MDMA pero también se ha empleado clometiazol intravenoso (Bedford-Russell y col., 1992).

Por otra parte, la excreción urinaria de la MDMA varía mucho según el pH. La acidificación de la orina favorece la eliminación de la MDMA, por lo que se considera como un tratamiento adecuado en casos de sobredosis (Mascaro y col., 1991).

I.4. SEROTONINA Y EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO

I.4.1 LA SEROTONINA

La 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina) es una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino. Se localiza y sintetiza en las células enterocromafines de tracto gastrointestinal y en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central. En plaquetas la 5-HT es almacenada por un mecanismo de transporte activo (Pazos, 1997).

I.4.1.1 Síntesis

La 5-HT es sintetizada a partir del aminoácido L-triptófano. Este es oxidado por la triptófano hidroxilasa dando lugar al 5-hidroxitriptófano (5-HTP) que posteriormente es descarboxilado, mediante la L-aminoácido aromático descarboxilasa, y convertido en 5-hidroxitriptamina. La 5-HT formada queda almacenada en vesículas que la protegen de la acción de la monoaminoxidasa (MAO) intraneuronal (Pazos, 1997).

I.4.1.2 Liberación

En condiciones fisiológicas es liberada del terminal nervioso por despolarización y entrada de Ca^{2+} en el terminal sináptico. La 5-HT liberada tiene tres posibles destinos, o bien actúa sobre receptores, o difunde al espacio extracelular o es recaptada por la propia terminación nerviosa (Pazos, 1997).

I.4.1.3 Metabolismo

La 5-HT es metabolizada por la MAO sobre todo del subtipo A y a continuación por la aldehído deshidrogenasa dando lugar al ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) que difunde al espacio extracelular y al líquido cefalorraquídeo (Pazos, 1997).

I.4.2 EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO

I.4.2.1 Localización

Las vías serotoninérgicas tienen su origen en los núcleos del rafe, localizados en la región medial y paramedial a lo largo del mesencéfalo, la protuberancia y el bulbo. Existen 9 núcleos, B1 a B9, según su distribución en la rata.

Las principales vías son las siguientes (Flórez y Pazos, 1997):

- a) La gran vía serotoninérgica ascendente ventral que nace en los núcleos B6, B7 y B8 e inerva la sustancia negra, el núcleo caudado, el putamen, el neocórtex, el núcleo *accumbens* y el hipocampo.
- b) La vía serotoninérgica ascendente dorsal que tiene su origen en los núcleos B3, B5 y B6 e inerva principalmente la sustancia gris central mesencefálica.
- c) Una vía serotoninérgica con origen en los núcleos B5 y B6 que inerva la corteza cerebelosa.
- d) La vía descendente propiobulbar que desde los núcleos B3 a B8 proyecta a otros núcleos del tronco.
- e) La vía descendente bulboespinal que nace en los núcleos B1 a B3 y llega hasta las astas anteriores y posteriores de la médula espinal.

La inervación serotoninérgica de la corteza cerebral y del hipocampo se origina en los núcleos dorsal y medio del rafe (Flórez y Pazos, 1997).

I.4.2.2 Morfología

Existen dos clases de axones serotoninérgicos. El denominado sistema D que está compuesto de axones cuyo origen se sitúa principalmente en el núcleo dorsal del rafe. Este sistema está formado por fibras finas, muy ramificadas que poseen varicosidades fusiformes. El sistema M tiene su origen en el núcleo medio del rafe y consiste en ramas más gruesas que sólo se ramifican en su porción terminal. En esta última porción presentan varicosidades gruesas y esféricas (Flórez y Pazos, 1997).

I.5. EFECTOS AGUDOS Y A LARGO PLAZO DE LA MDMA EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El primer trabajo aparecido en la literatura referente a los efectos neurotóxicos de la MDMA data de 1986 y fue publicado por el grupo de Schmidt. Estos autores demostraron que la administración aguda de MDMA por vía subcutánea, a una dosis cuatro veces superior a la dosis oral humana, que es 1-3 mg kg⁻¹, provoca en el núcleo neostriado de rata una disminución selectiva y significativa de 5-HT y de su metabolito, 5-HIAA, que persiste una semana después de la administración de MDMA a dosis de 10 mg kg⁻¹ o superiores (Schmidt y col., 1986).

Posteriormente diversos laboratorios han confirmado que la MDMA, al igual que otros derivados anfetamínicos, es tóxica para el cerebro de diversas especies animales. Así, se ha comprobado que produce una degeneración selectiva de terminales serotoninérgicos en la rata, cobayo y mono tras la administración única o múltiple (Schmidt y col., 1986; Stone y col., 1986; Battaglia y col., 1987; Commins y col., 1987a; Schmidt y col., 1987; Battaglia y col., 1988; Finnegan y col., 1988; Ricaurte y col., 1988a,b; Slikker y col., 1988, 1989; revisión: McKenna y Peroutka, 1990; Ali y col., 1993)

En un estudio llevado a cabo por Stone y col. (1987a) orientado a investigar las acciones producidas por este derivado anfetamínico en función del tiempo, se observó que la administración de MDMA en ratas producía unas alteraciones neuroquímicas características de tipo bifásico sobre diversos marcadores serotoninérgicos. Estos efectos se pueden dividir en efectos agudos o inmediatos que son reversibles y efectos a largo plazo que son irreversibles y, por lo tanto, se consideran efectos neurotóxicos.

I.5.1 EFECTOS AGUDOS

I.5.1.1 Efectos sobre sistemas de neurotransmisión

I.5.1.1.1 El sistema serotoninérgico

MDMA, inmediatamente después de su administración, produce un marcado descenso de las concentraciones cerebrales de 5-HT y de su metabolito, 5-HIAA, que puede llegar a ser

de un 80 %, 3 h después de su administración en la rata (Schmidt y col., 1986, 1987; Stone y col., 1986; Stone y col., 1987a). A la vez que este descenso en el contenido indólico se observa una disminución de la actividad de la triptófano hidroxilasa (TPH; enzima limitante de la síntesis de 5-HT) en corteza cerebral, estriado e hipocampo, fundamentalmente (Schmidt y Taylor, 1987; Stone y col., 1987a).

Esta rápida y pronunciada disminución del contenido indólico cerebral se debe a que la MDMA incrementa masivamente la liberación de 5-HT de las vesículas presinápticas (Nichols y col., 1982; Fitzgerald y col., 1993; Hekmatpanah y Peroutka, 1990) y se ha relacionado con los efectos que esta droga ejerce sobre la psique y el comportamiento. Los parámetros serotoninérgicos afectados recuperan gradualmente sus niveles basales y a las 24 h de la administración de MDMA las concentraciones cerebrales de 5-HT y 5-HIAA se aproximan a los de ratas inyectados con suero salino (Schmidt, 1987a; Stone y col., 1987a; Stone y col., 1988; Schmidt y Taylor, 1988). Sin embargo la actividad de la TPH continúa disminuida en el estriado, hipocampo y corteza hasta 2 semanas después del tratamiento (Schmidt y Taylor, 1987; Stone y col., 1987a). Este efecto sobre la enzima no parece ser mediado por una inhibición directa ya que en estudios *in vitro* no se ha observado efecto alguno de MDMA sobre la actividad enzimática (Schmidt y Taylor, 1987). *In vivo* se observa una reducción al 50 % del V_{max} en animales tratados con MDMA pero la afinidad de la enzima para sus dos sustratos, el triptófano y el 6-metil-5,6,7,8-tetra hidropterina, permanece inalterada.

Es posible que la MDMA produzca la inactivación de TPH mediante un proceso de oxidación de la enzima y que esta inactivación sea un proceso reversible que no implique la formación de proteína enzimática nueva. En un estudio llevado a cabo por el grupo de Stone (Stone y col., 1989) se evaluó la capacidad de reactivación *in vitro* de la TPH tras su inactivación por MDMA. El tejido se incubó en un medio anaerobio y reductor (ditiotreitól y Fe^{2+}). Los autores observaron que si esta incubación se realizaba a las 3 h de la administración de MDMA, se producía una reactivación completa, en cambio después la reactivación era solamente de un 50 %.

Se ha demostrado, también, que la MDMA es un potente liberador de 5-HT de sinaptosomas (Nichols y col., 1982 y Hekmatpanah y Peroutka, 1990) y de rebanadas cerebrales impregnadas con [3H]5-HT (Johnson y col., 1986; Sprouse y col., 1989 y Fitzgerald y Reid, 1993).

I.5.1.1.2 El sistema dopaminérgico

La administración de una dosis única de MDMA (10 mg kg^{-1}) produce un incremento de la concentración de dopamina (DA) en el estriado de rata 3 h después de su administración. Este efecto no parece deberse a que la MDMA aumente la síntesis de DA puesto que la actividad de la tirosina hidroxilasa (enzima limitante de la síntesis de DA) no está alterada. MDMA no modificó la concentración estriatal de ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) aunque incrementó los niveles de ácido homovanílico (HVA) (Schmidt y col., 1986; Stone y col., 1986). El efecto producido por MDMA sobre la concentración de DA estriatal podría ser atribuido a la capacidad que tiene este compuesto para aumentar, inmediatamente después de su administración, la liberación de DA en los núcleos caudado y *accumbens* (Yamamoto y Spanos, 1988).

Cuando se administran dosis múltiples de MDMA (10 mg kg^{-1} , cada 6 h, 5 dosis, s.c.) no se detectan cambios en los niveles históricos de DA y DOPAC ni en la actividad de la tirosina hidroxilasa en el estriado a las 18 h de la finalización del tratamiento. Se observa sin embargo, un incremento de la concentración estriatal de HVA (Stone y col., 1986).

I.5.1.1.3 El sistema noradrenérgico

Existen pocos estudios sobre los efectos agudos de MDMA sobre el sistema noradrenérgico. En 1987, Steele y col., observaron que la MDMA era capaz de prevenir la recaptación de noradrenalina al interior de sinaptosomas del hipotálamo, hipocampo y estriado del cerebro de rata.

I.5.1.2 Efectos sobre el comportamiento

La administración de MDMA a ratas provoca la aparición del síndrome serotoninérgico (Slikker y col., 1989; Spanos y Yamamoto, 1989; Callaway y col., 1992; Colado y col., 1993) el cual ha sido extensamente estudiado desde el punto de vista de su etiología y con el propósito de investigar el efecto que ejercen diversas drogas psicoactivas sobre dicho síndrome (Green y Grahame-Smith, 1976; Green y Heal, 1985). El síndrome fue descrito por primera vez en ratas por Grahame-Smith (1971) y consiste en una serie de comportamientos complejos que incluyen un incremento en la actividad locomotora, pisoteo repetido con las patas

delanteras (“forepaw treading”), movimiento de la cabeza de un lado a otro (“head weaving”) y postura baja del cuerpo (“low body posture”) (Green y Heal, 1985; Spanos y Yamamoto, 1989).

Callaway y col., (1990) estudiaron la posible relación existente entre la liberación de 5-HT inducida por MDMA y los efectos sobre la actividad locomotora provocados por la droga. Observaron que la administración de un inhibidor de la recaptación de 5-HT (flouxetina) o de un inhibidor de la síntesis de 5-HT (*p*-clorofenilalanina) atenuaba la hiperactividad locomotora producida por MDMA. La inhibición de la síntesis de catecolaminas, mediante la administración de α -metil-*p*-tirosina (AMPT), no modificaba la estimulación locomotora inducida por MDMA. No obstante, la inyección en la región mesolímbica de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), una neurotoxina de las vías dopaminérgicas, atenuaba parcialmente el efecto de la MDMA sobre la locomoción. Estos datos indican que no solamente el sistema serotoninérgico está implicado en la respuesta locomotora subsiguiente a la MDMA, sino que también el sistema dopaminérgico podría desempeñar un importante papel.

En monos rhesus (*Macaca mulatta*) se ha llevado a cabo un estudio para evaluar el efecto de la MDMA sobre diversos signos comportamentales (Federick y col., 1995a). Los síntomas que se estudiaron fueron la estimación del tiempo, memoria a corto plazo y atención, motivación al trabajo para obtener comida, aprendizaje y discriminación de color y posición. Estos estudios son de particular interés ya que la respuesta en monos entrenados se parece a la respuesta en niños (Paule y col., 1988). MDMA alteró la respuesta a los ensayos de estimación del tiempo, aprendizaje y motivación aunque este último resultado, según los autores, pudo ser debido al efecto anorexígeno de la MDMA. No afectó los ensayos de memoria a corto plazo y atención ni la discriminación de color y posición. Los cambios producidos fueron temporales. Las dosis utilizadas (0.1, 0.3, 1 mg kg⁻¹) aunque administradas dos veces a la semana no produjeron cambios permanentes en las respuestas comportamentales ya que los cambios producidos por MDMA revirtieron al suprimir el tratamiento. Según los autores el tratamiento afectó a los comportamientos que reflejan la adquisición de información nueva y no a aquellos que reflejan la retención de información previamente adquirida. Los animales demostraron tolerancia en los ensayos comportamentales después de dosis repetidas o al incrementar la dosis (Frederick y col., 1995b).

1.5.1.3 Otros efectos

En ratas, la administración de MDMA incrementa el ritmo cardíaco y la temperatura corporal (Gordon y col., 1991). En perros y monos se ha observado midriasis, salivación y piloerección (Hardman y col., 1973). Todos estos efectos parecen reflejar la activación del sistema simpático.

La administración intraperitoneal (i.p.) de MDMA da lugar a un incremento rápido en los niveles séricos de corticosterona y prolactina (Nash y col., 1988). El incremento en corticosterona es bloqueado por la administración de ketanserina y mianserina, ambos antagonistas del receptor 5-HT₂, pero no por antagonistas del receptor 5-HT_{1A} o antagonistas no selectivos de los receptores 5-HT. Esto sugiere que esta elevación en la concentración de corticosterona está mediada por los receptores 5-HT₂. El incremento en prolactina no parece estar mediado ni por los receptores 5-HT_{1A} ni por los receptores 5-HT₂.

1.5.2 EFECTOS A LARGO PLAZO

1.5.2.1 EN ROEDORES

1.5.2.1.1 Sistema serotoninérgico

Como se ha descrito en el apartado 1.6.1.1.1. la MDMA produce una disminución del contenido indólico a las 3 h de su administración pero este parámetro se recupera gradualmente de tal manera que a las 24 h el contenido indólico es similar a aquel en ratas tratadas con suero salino. Sin embargo, esta recuperación es transitoria y a partir de las 24 h el contenido indólico vuelve a disminuir, esta vez progresivamente. A las 2 semanas del tratamiento los niveles regionales de 5-HT y de 5-HIAA y la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT, son significativamente menores en el cerebro de ratas tratadas con MDMA comparado con aquellos en ratas tratadas con suero salino (Battaglia y col., 1987, 1988; O'Hearn y col., 1988; Slikker y col., 1988).

Mediante técnicas bioquímicas e inmunocitoquímicas se ha comprobado que los cambios a largo plazo producidos por MDMA sobre los niveles hísticos de 5-HT y de su metabolito son una consecuencia de la destrucción de axones y/o terminales serotoninérgicos y

no de una supresión prolongada de la función serotoninérgica en neuronas intactas estructuralmente. Así Battaglia y col. (1987) demostraron que la administración de MDMA produce una marcada reducción (50 - 75 %) de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en corteza cerebral, hipocampo, estriado, hipotálamo y mesencéfalo de rata, 2 semanas después de su administración. Se demostró en este estudio que la MDMA alteraba el número de lugares de recaptación y, por lo tanto, la densidad (B_{max}) pero no la afinidad de los lugares de recaptación (K_D).

En 1988, O'Hearn y col., utilizando técnicas de inmunocitoquímica específicas para 5-HT demostraron que la MDMA producía una degeneración selectiva de los terminales axónicos serotoninérgicos que pertenecen a fibras finas provenientes del núcleo dorsal del rafe mientras que los axones provenientes del núcleo medio del rafe que son más gruesos y con varicosidades, no se ven alterados. Axones preterminales, fibras de paso y los cuerpos celulares en el rafe tampoco son afectados (O'Hearn y col., 1988).

I.5.2.1.2 Sistema dopaminérgico

La administración de MDMA no altera a largo plazo diversos parámetros dopaminérgicos. Niveles históricos de DA, DOPAC y HVA además de la densidad de los lugares de recaptación de dopamina se ven inalterados por el tratamiento con MDMA (Stone y col., 1986; Battaglia y col., 1987,1988; O'Hearn y col., 1988).

I.5.2.2 EN PRIMATES NO HUMANOS

I.5.2.2.1 Sistema serotoninérgico

Los efectos a largo plazo producidos por MDMA en primates no humanos son similares cualitativamente a los efectos observados en la rata. Se observa igualmente una disminución de los niveles de 5-HT y 5-HIAA así como una disminución de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT (Battaglia y col., 1988; Ricaurte y col., 1988a; Ricaurte y col., 1988b; Slikker y col., 1988; Insel y col., 1989; Slikker y col., 1989; Ricaurte y col., 1992; Ali y col., 1993; Frederick y col., 1995b).

En 1989, Wilson y col. demostraron que existe una vulnerabilidad selectiva de los terminales de axones serotoninérgicos provenientes del núcleo dorsal del rafe en el mono (*Macaca fascicularis* y *Macaca mulatta*)

Se ha demostrado además que los primates no humanos son de 4 a 8 veces más sensibles a los efectos neurotóxicos de la MDMA que los roedores (Ricaurte y col., 1988b).

En un estudio realizado por Ricaurte y col. en 1988(c), evaluaron los niveles del metabolito de 5-HT, el 5-HIAA, en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de monos ardilla. Los investigadores observaron que la administración de MDMA en un régimen previamente demostrado como neurotóxico, es decir 5 mg kg⁻¹, dos veces al día, durante 4 días, produjo una disminución del 60 % en la concentración de 5-HIAA en el LCR, 2 semanas después de su administración. Asimismo, produjo una disminución en el contenido indólico de varias estructuras cerebrales. Esto indica que, en el mono, la disminución en el contenido indólico en el sistema nervioso central está relacionada con una marcada disminución en los niveles de 5-HIAA en el LCR. Teniendo en cuenta esta relación los autores propusieron que la concentración de 5-HIAA en el LCR podría ser utilizada como un indicador de neurotoxicidad en humanos, si bien especifican que una disminución de los niveles de 5-HIAA en el LCR podría subestimar el grado de lesión neuronal.

I.5.2.2.2 Sistema dopaminérgico

Al igual que en ratas, el sistema dopaminérgico no es afectado a largo plazo por la administración de MDMA (Ricaurte y col., 1987, 1988b).

En 1988(c), Ricaurte y col., observaron que los niveles de HVA en el LCR de monos ardilla tratados 2 semanas antes con MDMA en un régimen neurotóxico eran normales. También observaron que la concentración de dopamina en el estriado no era diferente de aquella observada en monos tratados con salino.

I.5.2.2.3 Sistema noradrenérgico

En el mismo estudio mencionado en los apartados I.5.2.2.1 y I.5.2.2.2 los investigadores evaluaron los niveles de noradrenalina en el hipocampo y de su metabolito, el 3-metoxi-4-hidroxifenil glicol (MHPG) en el LCR de monos ardilla. Observaron que ninguno de los dos parámetros noradrenérgicos estaba alterado (Ricaurte y col., 1987 y 1988c).

1.5.2.3 Regeneración neuronal

Aunque el potencial neurotóxico de la MDMA está bien establecido, hay relativamente poca información respecto al destino de las neuronas serotoninérgicas lesionadas. En particular, se desconoce si se produce la regeneración de los axones serotoninérgicos de tal forma que se restablezcan los contactos sinápticos originales. Algunos autores han sugerido que al menos en roedores se produce una recuperación sustancial de la función serotoninérgica tras las lesiones inducidas por MDMA (Battaglia y col., 1988, 1990; De Souza y Battaglia, 1989, 1990; Molliver y col., 1990 y Scanzello y col., 1993).

Scanzello y col. (1993) realizaron un estudio donde administraban MDMA 10 mg kg⁻¹ a ratas, cada 2 h, 4 veces y observaban los efectos sobre el contenido indólico y la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT. A las 2 semanas había una disminución significativa en todos los parámetros estudiados. A las 16 semanas había señales de recuperación y a las 32 semanas la recuperación era casi total. La recuperación seguía siendo evidente a las 52 semanas del tratamiento. Los autores observaron diferencias temporales en la recuperación de diferentes estructuras. Las estructuras se recuperaron siguiendo la dirección rostral-caudal. Este patrón de recuperación también fue observado por Sabol y col. (1996) y Lew y col. (1996). Según estos autores el patrón de recuperación refleja la distancia a la que se encuentra la estructura cerebral de los núcleos del rafe y de los cuerpos celulares.

Sin embargo, aunque los efectos de la MDMA en roedores parecen ser parcialmente reversibles, en primates son probablemente permanentes (Insel y col., 1989 y Ricaurte y col., 1992). Monos ardilla sometidos a la administración repetida de MDMA continúan mostrando una pronunciada disminución de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en corteza frontal, núcleo caudado e hipocampo 18 meses después de la administración de la droga (Ricaurte y col., 1992).

Fischer y col. (1995) llevaron a cabo un estudio comparativo entre ratas y monos ardilla. Observaron que en ratas, 52 semanas después de la administración de MDMA, había una recuperación de los parámetros serotoninérgicos evaluados en ciertas áreas cerebrales. Los niveles de 5-HT, 5-HIAA, la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT y la densidad de los axones 5-HT inmunoreactivos habían llegado a niveles controles en la corteza prefrontal, frontal y parietal y en estriado. Sin embargo, en hipotálamo la densidad de lugares de

recaptación de 5-HT era mayor que en controles mientras que en hipocampo todavía se observaban signos de lesión neuronal.

En monos ardilla, 72 semanas después de la administración de un régimen neurotóxico de MDMA que a las 2 semanas había provocado marcadas disminuciones en los parámetros serotoninérgicos, se detectaron disminuciones persistentes en la densidad de lugares de recaptación de 5-HT y en la densidad de axones 5-HT inmunoreactivos en hipocampo y neocortex (hipoinervación). En el hipotálamo, por el contrario, se observaban signos de recuperación completa e incluso hiperinervación. Los autores concluyeron que, tras la lesión neuronal inducida por MDMA, se había producido una reorganización de los axones serotoninérgicos ascendentes, de tal manera que los axones distantes de los núcleos del rafe mostraban poca o ninguna regeneración mientras que los situados en áreas más próximas mostraban signos de regeneración completa. Esta reorganización irregular ocurre más frecuentemente en primates no humanos que en roedores. Según los autores esta diferencia entre especies se puede deber a varios factores: la gravedad de la lesión inicial, la longitud de los axones serotoninérgicos, el grado de mielinación del axón, la implicación del cuerpo celular, la composición de la matriz extracelular, la generación de factores del crecimiento y la respuesta de la glia al daño producido por MDMA.

I.5.3 FACTORES QUE AFECTAN LA NEUROTOXICIDAD

I.5.3.1 Dosis y protocolo de administración

Los efectos neurotóxicos de la MDMA se ven afectados por la dosis administrada y el protocolo de administración, es decir el número de dosis y la frecuencia de administración. Dosis únicas bajas pueden dar lugar a los efectos agudos pero sólo dosis mayores (Schmidt y col., 1986, 1987; Schmidt, 1987a,b) o múltiples dosis bajas (Stone y col., 1986; Battaglia y col., 1987; Commins y col., 1987a) producen neurotoxicidad.

Así, una dosis de 5 mg kg⁻¹ en la rata puede producir efectos agudos (Schmidt y Taylor, 1987), no efectos a largo plazo. En cambio, esta misma dosis administrada de forma repetida, 2 veces al día durante 4 días resulta en una reducción de 5-HT de 45-80 % y aproximadamente de un 14 % en los lugares de recaptación de 5-HT en corteza cerebral de rata a las 18 h de su administración (Battaglia y col., 1990). En un estudio realizado por Insel y col., (1989) se

observó que incluso una dosis de 2.5 mg kg⁻¹, 2 veces al día durante 4 días fue capaz de disminuir la concentración de 5-HT y 5-HIAA en varias estructuras cerebrales.

1.5.3.2 Vías de administración

Diversos grupos han estudiado el efecto de diferentes vías de administración; oral, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal sobre la neurotoxicidad de la MDMA (Ricaurte y col., 1988a,b; Insel y col., 1989; Kleven y col., 1989; Colado y col., 1993). En 1988, Finnegan y col., no encontraron diferencias entre la reducción dosis-dependiente de los niveles de 5-HT originada por la administración oral de MDMA a ratas y aquella originada por la administración subcutánea.

Sin embargo, Ricaurte y col., (1988a) observaron que en el mono ardilla la administración subcutánea de MDMA (8 x 5 mg kg⁻¹) era 3 veces más tóxica que la administración oral. En cambio en el mono rhesus la administración oral da lugar a una reducción más pronunciada en el contenido indólico y en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT que la administración subcutánea (Kleven y col., 1989).

1.5.3.3 Diferencias entre especies

Parecen existir diferencias entre la sensibilidad de varias especies. Así se han observado diferencias entre los efectos neurotóxicos de la MDMA en ratas, ratones, monos *rhesus*, monos ardilla y cobayos (Stone y col., 1987b; Battaglia y col., 1988; Finnegan y col., 1988; Logan y col., 1988; Ricaurte y col., 1988 y Slikker y col., 1988).

Stone y col. (1987b) observaron que así como una dosis de MDMA de 10 mg kg⁻¹ produjo una depresión aguda y a largo plazo de la actividad de la triptófano hidroxilasa y una reducción del contenido indólico en la rata, esto no ocurrió en ratones con una dosis de 15 mg kg⁻¹, aunque si se vieron afectados por un protocolo de administración múltiple (6 x 15 mg kg⁻¹). Este hecho lo atribuyeron los autores a la diferencia en el metabolismo de la MDMA entre las dos especies. En la rata, la vía metabólica de mayor importancia es la para-hidroxilación del anillo de MDMA. Esta vía metabólica puede ser impedida por el grupo metilendioxi de la molécula. El menor grado de metabolización de la MDMA por esta vía daría lugar a niveles altos de MDMA en cerebro. Los ratones en cambio tienen dos vías de metabolismo

importantes: desaminación de la cadena e hidroxilación del anillo, y así la MDMA tiene una vía alternativa por la que puede ser eliminada del cerebro.

El cobayo también es sensible a los efectos tóxicos de la MDMA (Commins y col., 1987a). Una dosis única de 20 mg kg⁻¹ produjo una disminución en los niveles de 5-HT en el estriado, hipocampo, corteza e hipotálamo. La concentración de DA disminuyó en el estriado y la concentración de noradrenalina fue normal en todas las estructuras estudiadas.

Como ya se ha mencionado en el apartado I.5.2.2.1 los primates no humanos son más sensibles a los efectos de MDMA que las ratas por vía oral y por vía subcutánea (Ricaurte y col., 1988a; Slikker y col., 1988).

I.5.3.4 Parámetros estereoquímicos

Las propiedades estereoquímicas son importantes en los efectos neurotóxicos de la MDMA. Ambos estereoisómeros producen una reducción en la concentración de 5-HT a las 3 h de su administración pero sólo (+)-MDMA produce una disminución en la concentración de 5-HT cortical y estriatal a los 7 días de su administración (Schmidt y col., 1987). Además (+)-MDMA es más potente como liberador de 5-HT de sinaptosomas (Nichols y col., 1982) y de rebanadas estriatales (Schmidt y col., 1987). Johnson y col. (1988) también observaron que el isómero S(+)-MDMA era más potente como neurotóxico y como depresor de la actividad de la triptófano hidroxilasa en la corteza cerebral, hipocampo y neostriado de ratas a las 18 h de la administración repetida de MDMA.

El requerimiento de un isómero para los efectos neurotóxicos, pero no para los efectos agudos, indica que los dos efectos son independientes y que los efectos agudos no dan lugar necesariamente a los efectos a largo plazo.

I.5.4 MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD

A pesar de que está bien establecido que la MDMA a dosis altas y en administración única o múltiple produce una degeneración neuronal de las vías serotoninérgicas, los mecanismos de acción subyacentes son desconocidos. Aunque se han propuesto varias teorías, las 3 hipótesis más extendidas que podrían explicar la neurotoxicidad inducida por MDMA son las siguientes (Colado, 1998):

1.5.4.1 Posible formación de un metabolito tóxico de MDMA

Esta hipótesis esta basada en el hecho de que la administración intracerebral directa de MDMA no produce ninguna evidencia de una respuesta neurotóxica, mientras que, por el contrario, la administración sistémica produce déficits serotoninérgicos prolongados asociados con neurodegeneración (Molliver y col., 1986 y Paris y Cunningham, 1991).

Lim y Foltz (1988; 1991a y b) llevaron a cabo una serie de estudios extensos sobre el metabolismo de la MDMA demostraron la existencia de 17 metabolitos formados por N-desmetilación, O-deaquilación, hidroxilación aromática, desaminación y conjugación. Se ha evaluado la capacidad para producir neurotoxicidad de algunos de ellos (Johnson y col., 1992), pero no se ha llegado a ninguna conclusión definitiva, puesto que algunos de ellos no son neurotóxicos y otros producen un patrón de neurotoxicidad diferente a aquel producido por la MDMA, como por ej. 2,4,5-trihidroximetanfetamina, que produce neurotoxicidad tanto en el sistema dopaminérgico como en el serotoninérgico (Johnson y col., 1992).

La 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) ha sido identificada como uno de los principales metabolitos de la MDMA tanto *in vivo* como *in vitro* (Cho y col., 1990 y Yousif y col., 1990), habiéndose detectado en orina y en plasma de rata (Fitzgerald y col., 1989). La MDA también es selectivamente tóxica para las neuronas serotoninérgicas del cerebro de la rata, originando una reducción de la concentración indólica y de la actividad de la triptófano hidroxilasa similar a la inducida por MDMA a igualdad de dosis (Stone y col., 1986). Se ha sugerido que sería necesario el metabolismo de MDMA a MDA para que hubiera una destrucción de las neuronas serotoninérgicas (Schmidt, 1987b). No obstante, la administración intracerebral de MDA no causa neurotoxicidad serotoninérgica, lo cual indica que la MDA es metabolizada en la periferia dando lugar al compuesto neurotóxico definitivo, el cual no ha sido aun identificado (McCann y Ricaurte, 1991).

Recientemente Tucker y col. (1994), demostraron la enzima debrisoquina hidroxilasa (CYP2D6) cataliza la principal vía de metabolismo de la MDMA *in vitro*, la demetilenación, convierte la MDMA en un derivado catecólico reactivo inestable (3,4-dihidroximetanfetamina, DHMA) que posteriormente por oxidación se transforma en la correspondiente quinona (Kumagai y col., 1994 y Tucker y col., 1994). Tanto catecoles como quinonas por autooxidación ocasionan la formación de radicales libres.

Esta enzima, presente en el hígado y el cerebro, es un miembro polimórfico de la superfamilia de enzimas citocromo P₄₅₀ y está ausente en un 5 - 9 % de los caucásicos como consecuencia de herencia de mutaciones génicas autosómicas recesivas (González y Meyer, 1991). Se ha especulado con la posibilidad de que estos individuos pudieran ser menos susceptibles a cualquier efecto crónico neurológico de la droga al tener una menor concentración de metabolitos de la MDMA. Sin embargo, estos individuos tendrían un riesgo aumentado de toxicidad aguda a causa del metabolismo lento de la MDMA, y por tanto los niveles plasmáticos más altos. En concreto, tendrían una respuesta hipertérmica exagerada, puesto que la hipertermia se atribuye a la rápida liberación de 5-HT que sigue a la administración de la droga y que es provocada por la MDMA *per se*.

Estudios realizados en ratas "Dark Agouti" han revelado que las hembras, en las cuales la demetilenación de la MDMA es deficiente, son más sensibles a los efectos agudos de la MDMA que los machos (Colado y col., 1995). Las hembras mostraron un mayor grado de hipertermia que los machos. A los 45 min después de la administración de la droga (coincidiendo con la respuesta máxima a la temperatura), los niveles plasmáticos de la MDMA en las hembras son aproximadamente un 60 % más altos que en los machos. Sin embargo, no se observa una diferencia relacionada con el sexo en la neurotoxicidad inducida por esta droga (Colado y col., 1995).

Se podría decir, por tanto, que en el caso de que la velocidad de formación de metabolitos tóxicos sea más baja en animales deficientes en debrisoquina hidroxilasa, tiene poca importancia a efectos de neurotoxicidad o que la demetilenación no es la vía principal para la producción de posibles neurotoxinas (Colado y col., 1995).

1.5.4.2 Posible formación de un metabolito tóxico de 5-HT

La administración de MDMA produce una marcada liberación de 5-HT del terminal nervioso (Yamamoto y Spanos, 1988; Hiramatsu y Cho, 1990; Nash, 1990; Gough y col., 1991; Brodtkin y col., 1993; White y col., 1994). Esta liberación se ha observado *in vivo* mediante microdiálisis (Gough y col., 1991; Brodtkin y col., 1993) e *in vitro* mediante la liberación de [³H]5-HT de sinaptosomas (Nichols y col., 1982; McKenna y col., 1991; Berger y col., 1992), rebanadas de cerebro (Johnson y col., 1986; Sprouse y col., 1989; Fitzgerald y Reid, 1993) y neuronas de cultivo (Azmitia y col., 1990; Gu y Azmitia, 1993). La liberación

de 5-HT por MDMA ocurre en dos fases. MDMA entra en el terminal de forma pasiva o a través del transportador de 5-HT. Después entra en la vesículas de alguna forma que consume iones H^+ intravesiculares y así cambia el pH del interior de la vesícula (incluso la entrada misma de MDMA, que es una base débil, eleva el pH). Este cambio del pH causa la liberación de 5-HT al citoplasma donde ocurre un intercambio entre la MDMA extracelular y la 5-HT intracelular a través del transportador de 5-HT.

Wichems y col. (1995) investigaron el mecanismo de liberación de 5-HT *in vitro* en cultivos de neuronas serotoninérgicas fetales del rafe y concluyeron que MDMA libera 5-HT del citoplasma a través de un mecanismo que es Ca^{2+} independiente y sensible a fluoxetina. En cambio, Azmitia y col. (1990) observaron en sus estudios en cultivos de neuronas serotoninérgicas primarias disociadas que tanto B-HT 920, un agonista específico de los receptores α_2 (Pifl y col., 1988), como SKF-38393, un agonista específico de los receptores D_1 (Benkirane y col., 1987), ambos receptores presinápticos en el terminal 5-HT, atenuaron la toxicidad producida por MDMA y concluyeron que la liberación de 5-HT a través de mecanismos Ca^{2+} -dependientes era parcialmente responsable de la toxicidad de MDMA.

Resultados *in vitro* indican que la MDMA interacciona con el transportador de 5-HT (Steele y col., 1987; Johnson y col., 1991a; Rudnick y Wall, 1992). La liberación de 5-HT *in vitro* es prevenida por compuestos que bloquean el transportador de 5-HT (Hekmatpanah y Peroutka, 1990; Gu y Azmitia, 1993).

De acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro* Gudelsky y Nash (1996), utilizando la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo*, observaron que la administración de fluoxetina era capaz de atenuar la liberación de 5-HT inducida por MDMA en el estriado. Esto sugiere que la 5-HT utiliza para su liberación al transportador de 5-HT. El hecho de que la fluoxetina bloquee la liberación de 5-HT y también proteja frente a la neurotoxicidad inducida por MDMA (ver apartado 1.5.5.1. Bloqueantes selectivos de la recaptación de 5-HT) sugiere la posible formación de un metabolito tóxico de la 5-HT como mediador de la toxicidad producida por MDMA.

Sin embargo existen datos indicativos de que un incremento en la liberación de 5-HT no aumenta la neurotoxicidad inducida por MDMA. La administración de 5-hidroxi-L-triptófano (5-HTP) y carbidopa incrementa la liberación basal de 5-HT y aumenta la liberación de 5-HT inducida por MDMA (Gudelsky y Nash, 1996). Si la 5-HT estuviera directamente implicada en la neurotoxicidad producida por MDMA entonces un aumento en su liberación

daría lugar a un aumento en la neurotoxicidad. Sin embargo la administración de 5-HTP atenúa los efectos tóxicos producidos por MDMA a largo plazo (Sprague y col., 1995). Los autores interpretan que la 5-HT, liberada masivamente por MDMA en presencia de 5-HTP, podría competir con la captación de dopamina al terminal serotoninérgico. La captación de dopamina al terminal serotoninérgico ha sido propuesto como uno de los mecanismos subyacentes de la neurotoxicidad de la MDMA (Schmidt y Lovenberg, 1985; Sprague y Nichols, 1995).

También se ha considerado la posibilidad de que la 5-HT liberada inmediatamente después de la administración de MDMA se oxidara a una neurotoxina como la 5,6 o la 5,7-dihidroxitriptamina, ya que tales compuestos pueden formarse a partir de la 5-HT misma (Wrona y Dryhurst, 1991; Wrona y col., 1992). Incluso algunos autores (Commins y col., 1987b,c) han detectado la presencia de 5,6-dihidroxitriptamina en el cerebro de la rata tras la administración de anfetaminas sustituidas. Sin embargo, los fármacos que proporcionan neuroprotección frente a la toxicidad de la MDMA son ineficaces para prevenir la disminución de 5-HT producida por 5,7-dihidroxitriptamina (Snape y col., 1994).

1.5.4.3 Posible formación de un metabolito tóxico de DA

Existen varios estudios que implican a la dopamina en los efectos neurotóxicos producidos por MDMA.

1.- La administración de AMPT o reserpina previene parcialmente la disminución de la triptófano hidroxilasa en estriado inducida por MDMA a las 3 h de su administración (Stone y col., 1988). Es interesante mencionar que el efecto de reserpina fue mayor que el de AMPT y que la combinación de AMPT y reserpina no potencia el efecto ejercido por la administración de reserpina únicamente. Ambos compuestos actúan sobre reservas diferentes de DA, reserpina vacía las vesículas de reserva de monoaminas (Dahlström y col., 1965) y AMPT disminuye las reservas de neurotransmisores de nueva formación. Los derivados anfetamínicos liberan DA a partir de esta última reserva (Raiteri y col., 1979; Fischer y Cho., 1979), de tal manera que se ha demostrado que AMPT atenúa la liberación de DA inducida por anfetaminas (Parker y Cubeddu, 1986; Butcher y col., 1988) mientras que reserpina no la modifica (Niddam y col., 1985; Butcher y col., 1988). Si la liberación de DA inducida por MDMA fuera la responsable de los efectos tóxicos de la droga sería esperable que proporcionara protección AMPT pero no

reserpina. Una posible explicación es que el efecto protector de AMPT y reserpina no esté relacionado únicamente con la capacidad de ambos compuestos para disminuir la liberación de DA. Es conocido, que reserpina también disminuye los niveles de otros neurotransmisores tales como 5-HT y que estos otros neurotransmisores pudieran modular la toxicidad de la droga.

Stone y col. (1988) también demostraron que AMPT protegía frente a la neurotoxicidad inducida por la administración única o repetida de MDMA puesto que previno la disminución de la actividad de la triptófano hidroxilasa y del contenido indólico inducido por MDMA en estriado, hipocampo y corteza frontal 3 días después de su administración.

2.- La co-administración de L-3,4-dihidroxifenil alanina (L-DOPA) con MDMA potencia los efectos neurotóxicos inducidos por MDMA sobre el contenido indólico del hipocampo, corteza y estriado. La L-DOPA aumenta la síntesis de DA y, por tanto, la cantidad de DA disponible para ser liberada (Schmidt y col., 1991).

3.- MDMA aumenta la liberación de DA *in vitro* (Schmidt y col., 1987a) e *in vivo* (Yamamoto y Spanos, 1988; Nash y Nichols, 1991; Gudelsky y col., 1994; White y col., 1994). Utilizando la técnica de voltametría *in vivo*, se ha demostrado que la MDMA incrementa la liberación de DA en los núcleos caudado y *accumbens* de manera dosis- y tiempo-dependiente (Yamamoto y Spanos, 1988). Cuando se administraron dosis bajas de MDMA (2.5 ó 5 mg kg⁻¹) el incremento en la liberación de DA es similar en ambos núcleos, sin embargo tras la administración de dosis más altas de MDMA (10 mg kg⁻¹) la liberación de DA es más acusada en el núcleo caudado. Estudios realizados sobre los efectos comportamentales producidos por la liberación de DA, han demostrado que la liberación de DA en el núcleo *accumbens* da lugar a un incremento en la actividad locomotora, mientras que la liberación de DA en el estriado produce un comportamiento estereotipado y cambios posturales (Kelly y col., 1975; Freed y Yamamoto, 1985; Yamamoto y Spanos, 1988).

Estos datos relativos al efecto de la MDMA sobre la liberación de DA fueron confirmados y extendidos por otros autores mediante la técnica de la microdiálisis intracerebral *in vivo* (Hiramatsu y Cho, 1990; Nash, 1990). El pretratamiento con ketanserina, un antagonista de los receptores 5-HT₂, atenúa el incremento de la concentración extracelular de DA inducido por MDMA (Nash, 1990) y proporciona neuroprotección puesto que previene la disminución del contenido indólico y de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT inducida por MDMA varios días después de su administración (Nash y col., 1990, 1991).

La administración de MDMA directamente en el estriado anterolateral a través de una sonda de microdiálisis también produce un aumento de la concentración extracelular de DA que es dosis- y tiempo-dependiente (Nash y Brodtkin, 1991). La administración sistémica de inhibidores de la recaptación de DA, tales como mazindol y GBR 12909, 30 min antes de iniciar la perfusión de MDMA a través de la sonda, atenúa parcialmente la liberación de DA inducida por MDMA. GBR 12909, además, proporciona protección frente a la neurotoxicidad sobre el sistema serotoninérgico producida por MDMA a los 3 días de su administración (Stone y col., 1988).

Se podría especular con la posibilidad de que la DA liberada masivamente tras la administración de MDMA fuera recaptada en los terminales axónicos serotoninérgicos donde podría ser oxidada originando metabolitos citotóxicos capaces de producir lesiones prolongadas en los terminales axónicos. Esta hipótesis, sin embargo, no sería suficiente para explicar el daño neuronal que produce la MDMA en ciertas regiones cerebrales que carecen prácticamente de innervación dopaminérgica, como es el caso del hipocampo y la corteza cerebral.

1.5.5 PROTECCIÓN FRENTE A LA NEUROTOXICIDAD PRODUCIDA POR MDMA

Existe una gran variedad de compuestos que han demostrado ser protectores frente a la toxicidad producida por MDMA. Entre ellos destacan los bloqueantes selectivos de la recaptación de 5-HT, los antagonistas de los receptores 5-HT₂, los facilitadores de la función gabaérgica, los antagonistas de los receptores *N*-metil-D-aspartato (NMDA) y los compuestos atrapadores de radicales libres.

1.5.5.1 Bloqueantes selectivos de la recaptación de 5-HT.

Tanto la fluoxetina (Schmidt, 1987a) como el citalopram (Schmidt y col., 1987) ambos bloqueantes selectivos de la recaptación de 5-HT, han demostrado ser protectores frente a los efectos agudos y la neurotoxicidad producida por MDMA. La administración de fluoxetina junto con MDMA previno completamente la disminución de la concentración de 5-HT en la corteza cerebral inducida por MDMA (Schmidt, 1987a). Cuando la fluoxetina se administró 3

h después de la administración de la MDMA siguió protegiendo completamente. Sin embargo, cuando la fluoxetina se administró a las 6 h de la administración de MDMA ya no era capaz de proteger completamente y administrada a las 12 h no ejerció ninguna protección. Esto demuestra que la neurotoxicidad empieza a desarrollarse entre las 3 y 6 h de la administración de MDMA de tal manera que a las 12 h los efectos son irreversibles (Schmidt, 1987a). El autor sugiere que la formación de un metabolito de MDMA podría ser responsable de la neurotoxicidad de la MDMA. La formación de este metabolito tendría lugar durante las primeras 12 h. Este metabolito, no MDMA, podría ser un sustrato para el sistema de recaptación de 5-HT. La MDMA entra en el terminal por difusión (Schmidt y col., 1987) y por tanto un inhibidor de la recaptación de 5-HT no afectaría la entrada de MDMA en el terminal.

El efecto neuroprotector de los inhibidores de la recaptación de 5-HT se podría deber también a que estos compuestos bloquean algunas acciones inducidas por MDMA. Inhiben la liberación de 5-HT *in vivo* e *in vitro* (Johnson y col., 1986; Schmidt y col., 1987; Battaglia y col., 1988; Bradberry y col., 1990; Hekmatpanah y Peroutka, 1990) y bloquean la captación de DA al interior del terminal serotoninérgico en sinaptosomas estriatales (Schmidt y Lovenberg, 1985)

1.5.5.2 Antagonistas del receptor 5-HT₂

La administración de antagonistas del receptor 5-HT₂, tales como ritanserina, MDL 11,939 o ketanserina, previene la neurotoxicidad inducida por MDMA (Schmidt y col., 1990a; Nash y col., 1990, 1991). En un estudio llevado a cabo por el grupo de Schmidt, ritanserina o MDL 11, 939, fueron administrados simultáneamente con MDMA 20 mg kg⁻¹ en ratas y el efecto sobre los niveles de 5-HT y la actividad de la TPH en hipocampo, corteza y estriado fue evaluado una semana después. En la corteza la concentración de 5-HT tras la administración de MDMA fue de un 48 % de los valores control. En cambio con la co-administración de ritanserina o MDL 11,939 los niveles fueron de un 71 y 80 % respectivamente. La protección en hipocampo y estriado fue similar o incluso mayor en el caso de la ritanserina. Además MDL 11,939 fue capaz de atenuar la neurotoxicidad producida por múltiples dosis de MDMA (20 mg kg⁻¹ cada 6 h, 5 dosis). En el hipocampo dosis tan bajas como 1 mg kg⁻¹ de MDL 11,939 fueron capaces de proteger alrededor de un 50 % siendo la protección dosis-dependiente.

No obstante, MDL 11,939 únicamente proporciona neuroprotección cuando se administra simultáneamente con MDMA. La administración de MDL 11,939 1 h después de MDMA sólo fue capaz de atenuar ligeramente la disminución de 5-HT en el hipocampo. Esto indica que existe un margen estrecho de tiempo dentro del cual MDL 11,939 puede prevenir los efectos tóxicos producidos por MDMA (Schmidt y col., 1990a).

Por otra parte la administración de MDL 11,939 con MDMA (5 ó 10 mg kg⁻¹) no afectó la disminución aguda de los niveles de 5-HT y 5-HIAA producida por MDMA, a las 3 h de la administración. Esto indica que los efectos agudos de MDMA son independientes de los efectos a largo plazo y que los antagonistas de los receptores 5-HT₂ únicamente interfieren con los efectos a largo plazo (Schmidt y col., 1990a).

Lo que aún se desconoce es el mecanismo por el cual los antagonistas de los receptores 5-HT₂ ejercen protección frente a la neurotoxicidad inducida por MDMA. La co-administración de MDL 11,939 o ketanserina con MDMA previno el incremento en la concentración de DA estriatal inducido por MDMA a las 3 h de su administración (Schmidt y col., 1990a; Nash, 1990). Esto sugiere que los receptores 5-HT₂ podrían influir en el sistema dopaminérgico. Se sabe que proyecciones serotoninérgicas, procedentes de los núcleos dorsal y medio del rafe, inervan la sustancia negra (Dray y col., 1978). Los terminales hacen contacto sináptico directo con dendritas dopaminérgicas (Nedergaard y col., 1988) y la activación de estas vías serotoninérgicas reduce la frecuencia de disparos en las vías dopaminérgicas (Fibiger y Miller, 1977; Dray y col., 1978; Ugedo y col., 1989).

La infusión de MDL 100,907 directamente en el estriado atenuó la liberación de dopamina inducida por MDMA en el estriado, en cambio la infusión en el mesencéfalo no afectó la liberación de dopamina en el estriado. Este resultado indica que los receptores 5-HT₂ implicados en la inhibición de la liberación de DA inducida por MDMA están presentes en el estriado (Schmidt y col., 1992a).

1.5.5.3 Facilitadores de la función gabaérgica

La administración de clometiazol (50 mg kg⁻¹, i.p.) 5 min antes y 55 min después de MDMA previno completamente la disminución en el contenido indólico del hipocampo y corteza inducida por MDMA (20 mg kg⁻¹, i.p.) 4 días más tarde (Colado y col., 1993). Sin embargo, no fue capaz de prevenir la disminución de 5-HT en el hipocampo y corteza

producida a las 4 h de la administración de MDMA (Colado y Green, 1994). Estos datos indican que el clometiazol previene los efectos neurotóxicos de la MDMA pero no los agudos.

La administración de clometiazol (100 mg kg^{-1}) en una sola dosis 20 min después de la administración de MDMA también fue capaz de proteger frente a la disminución en la concentración de 5-HT en el hipocampo pero no en la corteza (Colado y col., 1993). En 1994, Hewitt y Green observaron que la administración de clometiazol (100 mg kg^{-1}) 10 min antes de cada una de dos dosis de MDMA (20 mg kg^{-1} , cada 6 h) prevenía tanto la pérdida en lugares de fijación de [^3H]paroxetina como la disminución en la recaptación de [^3H]serotonina inducida por MDMA. El clometiazol también se ha demostrado protector frente a la neurotoxicidad producida por metanfetamina (Baldwin y col., 1993).

El clometiazol es un fármaco utilizado en la clínica como sedante, hipnótico y anticonvulsivante (Evans y col., 1986; Ogren, 1986; Green y Murray, 1989). Este compuesto interacciona con el receptor GABA_A en una forma similar pero no idéntica a pentobarbital (Cross y col., 1989). Modula directamente la apertura del canal de Cl^- (Harrison y Simmonds, 1983). Sin embargo, el clometiazol no afecta ni la concentración del ácido γ -amino butírico (GABA) en el cerebro (Cross y col., 1989; Vincens y col., 1989), ni la velocidad de síntesis de GABA (Cross y col., 1989) ni la recaptación de GABA (Vincens y col., 1989). Se ha demostrado que el clometiazol disminuye el volumen de daño isquémico en ratones en los que la síntesis de GABA había sido inhibida un 70 % (Green y col., 1992a), es posible, por tanto, que el clometiazol sea capaz de sustituir de alguna forma al GABA, y proteger frente a la degeneración producida por aminoácidos excitatorios.

Aunque se ha visto que el clometiazol no interacciona directamente con el complejo receptorial *N*-metil-D-aspartato (NMDA, Cross y col., 1993a; Addae y Stone, 1988) si parece que de alguna forma indirecta puede inhibir algunas funciones mediadas por el receptor NMDA en el cerebro (Cross y col., 1993b; Thorén y Sjölander, 1993) ya que inhibe las convulsiones tónicas inducidas por la inyección de *N*-metil-DL-aspartato.

El pentobarbital también se ha demostrado neuroprotector frente a la neurotoxicidad producida por MDMA y metanfetamina (Green y col., 1992b; Colado y Green, 1994). La administración de pentobarbital (25 mg kg^{-1}) 5 min antes y 55 min después de MDMA atenuó la disminución en la concentración de 5-HT en el hipocampo y corteza y la disminución en la concentración de 5-HIAA en el hipocampo, inducida por MDMA. Al igual que el clometiazol,

pentobarbital no tuvo efecto sobre la disminución en las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA a las 4 h de la administración de MDMA.

El pentobarbital se une a un receptor específico para barbitúricos en el complejo macromolecular del receptor GABA que está cerca del lugar de unión de clometiazol (Ogren, 1986; Cross y col., 1989) y prolonga la apertura del canal de Cl⁻. El pentobarbital es, por tanto, un potenciador de la función gabérgica.

Las neuronas gabaérgicas pueden ejercer un efecto modulador sobre las vías dopaminérgicas (Dray, 1979) y así disminuir la liberación de dopamina la cual podría actuar como potencial mediador de la neurotoxicidad producida por MDMA. Así, se ha observado que la administración de clometiazol atenuó la liberación de dopamina producida por metanfetamina (Baldwin y col., 1993).

Por otra parte, Colado y Green (1994) demostraron que clometiazol y pentobarbital no alteran la masiva disminución del contenido indólico inducido por MDMA inmediatamente después de su administración. Parece, por tanto, poco probable que los efectos neurotóxicos de la MDMA se deban a la liberación de 5-HT inducida por la droga y subsiguiente formación de un metabolito tóxico de 5-HT.

1.5.5.4 Antagonistas de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)

La administración de dizocilpina (1 mg kg⁻¹) 5 min antes y 55 min después de la administración de MDMA atenuó la disminución de la concentración de 5-HT y de 5-HIAA producidos por MDMA en el hipocampo, 4 días más tarde (Colado y col., 1993). Sin embargo, no modificó la disminución en la concentración de 5-HT producida por MDMA a las 4 h de su administración (Colado y Green, 1994). No obstante fue capaz de antagonizar algunos comportamientos asociados con el síndrome serotoninérgico y la hiperlocomoción que se suelen asociar con la liberación masiva de 5-HT que ocurre tras la administración de MDMA (Colado y col., 1993).

La dizocilpina también fue capaz de atenuar la disminución en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT inducida por MDMA (Hewitt y Green, 1994).

La dizocilpina es un antagonista no competitivo de los receptores NMDA (Wong y col., 1986), es decir modula de alguna forma la acción de los aminoácidos excitatorios sobre el complejo NMDA.

Farfel y Seiden (1995a) observaron que el CGS 19755, un antagonista competitivo de los receptores NMDA proporcionaba protección frente a los efectos neurotóxicos inducidos por MDMA. El dextrorfan, un antagonista no competitivo de los receptores NMDA, también fue capaz de proteger frente a MDMA (Carpenter y col., 1988; Finnegan y col., 1989)

La hiperactividad de los aminoácidos excitatorios ha sido asociado con la patofisiología de varias enfermedades neurodegenerativas incluyendo isquemia tras un infarto cerebral (Simon y col., 1984).

La infusión de agonistas de los aminoácidos excitatorios tales como kainato o el NMDA en determinadas áreas cerebrales tales como la corteza (Choi y col., 1987), el hipocampo (Kohler, 1993) y el estriado (Coyle y Schwarcz, 1976) produce neurodegeneración en esa área cerebral.

Se ha sugerido que la MDMA podría causar un exceso de actividad en las vías glutamatergica corticoestriatales y ya que existen importantes interacciones sinápticas entre los terminales que contienen DA y aquellos que contienen aminoácidos excitatorios en el neostriado, y que la vía glutamatergica es una de las principales que inervan el estriado (Fonnun, 1988), este exceso de actividad podría dar lugar a una masiva liberación de DA estriatal (Clow y Jhamandas, 1989; Bowyer y col., 1991). Se ha demostrado que el glutamato es capaz de liberar DA *in vitro* en tejido estriatal (Jones y col., 1993) y que *in vivo*, agonistas de glutamato administrados en el estriado también liberan dopamina (Clow y Jhamandas, 1989). Esta excesiva liberación de dopamina podría ser la responsable de la neurotoxicidad ya que la dopamina podría ser captada por el terminal serotoninérgico y ser metabolizada a un metabolito tóxico.

1.5.5.5 Compuestos atrapadores de radicales libres

Datos recientes indican que la formación de radicales libres podría desempeñar un importante papel en la degeneración de los terminales nerviosos serotoninérgicos inducida por MDMA y otros derivados anfetamínicos:

1. El compuesto atrapador de radicales libres, α -fenil-N-ter-butyl nitrona (PBN), administrado 10 min antes y 120 min después de MDMA es capaz de atenuar la degeneración de neuronas serotoninérgicas inducida por MDMA (Colado y Green, 1995) y p-cloroanfetamina, pero no la de fenfluramina (Murray y col., 1996). PBN, también es capaz

de prevenir la neurotoxicidad sobre el sistema dopaminérgico inducida por metanfetamina (Cappon y col., 1996).

2. La administración de metanfetamina en ratas tratadas con ácido salicílico produce un incremento en la concentración estriatal de los ácidos 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoicos (Giovanni y col., 1995). Estos ácidos se consideran un índice de la formación de radicales hidroxilo.

Los radicales libres están claramente implicados en la degeneración neuronal subsiguiente a un proceso de isquemia cerebral transitoria (Kirsch y col., 1987; Cao y col., 1988; Oliver y col., 1990):

1. Utilizando la técnica de la microdiálisis y el método atrapador del salicilato, se ha observado que ratas sometidas a un proceso de isquemia global en el cerebro anterior muestran una concentración elevada de los ácidos 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoicos en estriado (Globus y col., 1995). Resultados similares han sido obtenidos en el cerebro del gerbo tras un periodo de isquemia (Cao y col., 1988; Hall y col., 1988).
2. La administración de compuestos atrapadores de radicales libres ha resultado eficaz para atenuar el volumen de la lesión tras un proceso isquémico *in vivo* (Oliver y col., 1990; Phillis y Cough-Helman, 1990; Yue y col., 1992). El pretratamiento con PBN 30 min antes de la oclusión bilateral de las carótidas en el gerbo, previno casi completamente la degeneración de las neuronas CA1 del hipocampo (Yue y col., 1992). Cuando el PBN se administra después de la lesión isquémica también proporciona protección puesto que incrementa la supervivencia de las neuronas CA1 del hipocampo. PBN es igualmente protector en otros modelos experimentales de isquemia, por ejemplo la oclusión de la arteria media cerebral de la rata (Zhao y col., 1994).

I.6. NEUROTOXICIDAD PRODUCIDA POR OTROS DERIVADOS ANFETAMÍNICOS

I.6.1 FENFLURAMINA

La fenfluramina es un derivado anfetamínico halogenado que se utiliza en el tratamiento médico de la obesidad como un supresor del apetito (Rowland y Carlton, 1986). El efecto anorexígeno de la fenfluramina se debe a que produce la liberación masiva de 5-HT que

a su vez actúa sobre receptores 5-HT₂ en el hipotálamo que controlan el apetito (Fuxe y col., 1975; Trulson y Jacobs, 1976; Fuller y col., 1988). La fenfluramina también bloquea la recaptación de 5-HT, efecto que también contribuye a aumentar los niveles extracelulares de 5-HT.

Al igual que la MDMA y a dosis similares, la fenfluramina se comporta como una toxina selectiva del sistema serotoninérgico en diversas áreas del cerebro de la rata. La administración de fenfluramina produce a largo plazo una disminución en las concentraciones de 5-HT y de su metabolito, 5-HIAA, una disminución de la actividad de la triptófano hidroxilasa (Duhault y Verdavainne, 1967; Opitz, 1967; Steranka y Sanders-Bush, 1979; Murray y col., 1996) y una reducción de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT (Appel y col., 1989) en el cerebro de ratas.

Zaczek y col. (1990) también estudiaron los efectos de fenfluramina sobre el sistema dopaminérgico y noradrenérgico y observaron cambios transitorios en los niveles de noradrenalina, dopamina y sus metabolitos. Estos cambios revirtieron a la semana y, por tanto, se pueden considerar como alteraciones en la neurotransmisión y no efectos neurotóxicos.

Molliver y Molliver (1990) realizaron un estudio para evaluar los efectos de fenfluramina a corto y a largo plazo sobre neuronas serotoninérgicas en el cerebro de rata. Se observó una marcada disminución en el número de axones serotoninérgicos inmunoreactivos en varias estructuras cerebrales incluyendo la corteza, el estriado y el hipocampo, a las 2 semanas de la administración de fenfluramina (5 ó 10 mg kg⁻¹). Este efecto de la fenfluramina, al igual que en el caso de la MDMA se observó solamente en la población de axones finos. La otra población de axones, aquellos más gruesos y con varicosidades (Kleven y col., 1988) no fueron afectadas por la administración de fenfluramina.

Fenfluramina, como MDMA, produce inmediatamente después de su administración un aumento en la concentración extracelular de 5-HT *in vivo* (Auerbach y col., 1989; Schwartz y col., 1989; Sabol y col., 1992a; Kreiss y col., 1993; Series y col., 1994) e *in vitro* (Fuxe y col., 1975; Kannengiesser y col., 1976; Mennini y col., 1978; Maura y col., 1982; Sabol y col., 1992b; Mennini y col., 1985; Bonanno y col., 1994).

En 1994, Series y col. estudiaron el efecto del pretratamiento con *p*-cloroanfetamina, MDMA y d-fenfluramina sobre la liberación de 5-HT inducida por d-fenfluramina. Las ratas fueron tratadas 2 semanas antes con un régimen neurotóxico de *p*-cloroanfetamina, MDMA o d-fenfluramina. El pretratamiento con los tres derivados anfetamínicos fue capaz de disminuir

la liberación de 5-HT por d-fenfluramina y en menor grado la liberación de 5-HT inducida por una concentración alta de potasio. Estos datos sugieren que d-fenfluramina libera 5-HT exclusivamente de los axones finos, que son los dañados selectivamente por PCA, MDMA y d-fenfluramina. Sin embargo, el potasio, a concentraciones altas libera 5-HT también de aquellos axones no afectados por PCA, MDMA o d-fenfluramina, es decir de los más gruesos con varicosidades.

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han demostrado que inhibidores de la recaptación de 5-HT, tales como fluoxetina, clorimipramina y citalopram inhiben la liberación de 5-HT inducida por fenfluramina (Maura y col., 1982; Hekmatpanah y Peroutka, 1990; Sabol y col., 1992a; Kreiss y col., 1993). Estos datos sugieren que el sistema transportador de 5-HT interviene en la liberación de 5-HT inducida por fenfluramina.

La fenfluramina, inmediatamente después de su administración, también produce un aumento en la concentración extracelular de DA en estriado (De Deurwaerdère y col., 1995). Este efecto es independiente de las vías serotoninérgicas ya que la destrucción de estas vías con 5,7-dihidroxitriptamina no modifica la liberación de DA inducida por la infusión intraestriatal de dl-fenfluramina (De Deurwaerdère y col., 1995). La liberación de DA inducida por fenfluramina es independiente del transportador de dopamina ya que la infusión intraestriatal de nomifensina, un inhibidor de la recaptación de DA, no modificó el aumento en la liberación de DA tras la infusión intraestriatal de dl-fenfluramina. Sin embargo el citalopram, un inhibidor de la recaptación de 5-HT si fue capaz de disminuir la liberación de DA inducida por la administración intraestriatal de dl-fenfluramina. Es decir, tanto la liberación de 5-HT como la liberación de DA inducidas por fenfluramina son moduladas por el transportador de 5-HT.

Los efectos neurotóxicos de la fenfluramina pueden ser atenuados por la administración de inhibidores de la recaptación de 5-HT (Garattini y col., 1975; Harvey y McMaster, 1975; Clineschmidt y col., 1978; Fuller y col., 1978; Steranka y Sanders-Bush, 1979). Se ha sugerido que estos compuestos bloquean la entrada de fenfluramina en el terminal serotoninérgico previniendo de esta manera la toxicidad (Garattini y col., 1975).

Debido a que los inhibidores de la recaptación de 5-HT, previenen la neurotoxicidad de fenfluramina e inhiben la liberación de 5-HT inducida por este derivado anfetamínico, se ha sugerido que fenfluramina actúa a través del sistema de recaptación de 5-HT.

Colado y col. (1993) estudiaron el efecto de dizocilpina y clometiazol sobre los efectos neurotóxicos inducidos por fenfluramina y observaron que ninguno de los dos compuestos era capaz de proteger frente a la neurotoxicidad. Esto indica que la fenfluramina tiene un mecanismo de acción diferente de la MDMA y metanfetamina ya que ambos compuestos, dizocilpina y clometiazol, protegen frente a la neurotoxicidad inducida por estos dos derivados amfetamínicos (Green y col., 1992b; Baldwin y col., 1993; Colado y Green, 1994; Hewitt y Green, 1994).

Además en otro estudio, Murray y col. (1996) observaron que el atrapador de radicales libres PBN no era capaz de proteger frente a la neurodegeneración inducida por fenfluramina, lo que indica que la fenfluramina, a diferencia de MDMA y *p*-cloroanfetamina (ver apartado I.6.2) produce neurotoxicidad por un mecanismo que no implica la formación de radicales libres.

I.6.2 P-CLOROAFENTAMINA

La *p*-cloroanfetamina (PCA) es una potente y selectiva neurotoxina del sistema serotoninérgico (Fuller, 1985). Su administración resulta en una selectiva degeneración de los terminales serotoninérgicos (Harvey y col., 1977; Masseri y col., 1978) que se manifiesta en una disminución en la concentración de 5-HT y 5-HIAA cerebral (Fuller y col., 1975; Ross, 1976; Sanders-Bush y Steranka, 1978). Los efectos que produce sobre el sistema dopaminérgico son transitorios (Sanders-Bush y Steranka, 1978; Fuller, 1985).

Al igual que MDMA, es un potente y selectivo liberador de 5-HT *in vitro* e *in vivo*, asociándose la liberación *in vivo* con un incremento en la actividad locomotora de las ratas (Frey y Magnussen, 1968; Lassen, 1974; Ogren y Johansson, 1985). La administración de 5-hidroxi-triptófano a ratas tratadas con PCA incrementa la liberación de 5-HT inducida por PCA pero disminuye su neurotoxicidad (Iyer y col., 1994) por lo que se puede descartar a la 5-HT liberada como mediador de la toxicidad.

Se ha especulado con la posibilidad de que la toxicidad de PCA se deba a su conversión en un metabolito reactivo (Sherman y col., 1975; Gal, 1976; Ames y col., 1977).

En estudios de neuroprotección se ha observado que los inhibidores de la recaptación de 5-HT protegen frente a la neurotoxicidad de PCA (Ross, 1976) aunque la administración de dextrometorfan, que es, además de un bloqueante de los canales de Ca^{2+} del complejo NMDA

(Jaffe y col., 1989), un inhibidor del transportador de 5-HT (Ahtee, 1975; Henderson y Fuller, 1992), no produce protección (Farfel y Seiden, 1995b).

Colado y col. (1993) observaron que clometiazol (50 mg kg^{-1}) y dizocilpina (1 mg kg^{-1}) administrados 5 min antes y 55 min después de PCA (2.5 ó 5 mg kg^{-1}) no fueron capaces de proteger frente a la toxicidad producida por PCA. Ambos compuestos se muestran eficaces para prevenir la degeneración neuronal inducida por MDMA.

Murray y col. (1996) observaron que el compuesto atrapador de radicales libres, PBN si era capaz de proteger frente a la neurotoxicidad producida por PCA lo que indica que los radicales libres podrían estar implicados en los efectos neurodegenerativos inducidos por este compuesto.

1.7. HIPERtermIA Y NEUROtoxicIDAD POR DERIVADOS ANFETAMÍNICOS

El papel que desempeña la hipertermia en la neurotoxicidad inducida por MDMA es materia de controversia. La administración de MDMA produce una marcada hipertermia en animales de experimentación (Nash y col., 1988; Schmidt y col., 1990b; Gordon y col., 1991; Colado y col., 1993; Dafters, 1994) que es dependiente de la temperatura ambiental. En 1990, Schmidt y col., estudiaron el papel de la temperatura ambiental en la toxicidad subsiguiente a la administración de MDMA. Ratas tratadas con MDMA (20 mg kg^{-1} , s.c.) fueron divididas en dos grupos, uno se mantuvo a temperatura ambiente (24 - $26 \text{ }^\circ\text{C}$) y el otro grupo se mantuvo a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ durante las 6 h posteriores a la administración de la MDMA. En el caso del grupo sometido a una temperatura ambiental baja, la MDMA no causó hipertermia, incluso hubo hipotermia. En estos animales la neurotoxicidad producida por MDMA a la semana estaba atenuada. Sin embargo, la baja temperatura ambiental no previno los efectos agudos (3 h) sobre la concentración de 5-HT en el hipocampo y corteza inducidos por MDMA. Estos datos sugieren de nuevo que los efectos agudos de la MDMA son independientes de la hipertermia y de los efectos a largo plazo. Dafters (1994) observó que en ratas expuestas (24 h) a una temperatura baja ($11 \text{ }^\circ\text{C}$) la inyección de MDMA (5 ó 7.5 mg kg^{-1}) provocaba una respuesta hipotérmica.

Existen agentes protectores frente a los efectos neurotóxicos inducidos por MDMA que producen hipotermia o al menos previenen la hipertermia producida por MDMA. Farfel y Seiden (1995a,b) han realizado una serie de estudios para dilucidar el papel que desempeña la hipotermia en la protección ejercida por numerosos compuestos neuroprotectores frente a la toxicidad de la MDMA en ratas. Observaron que la administración de dizocilpina (2.5 mg kg^{-1} , i.p.) 15 min antes de MDMA (40 mg kg^{-1} , s.c.) produjo una marcada hipotermia en las ratas. Esta dosis también produjo protección frente a la neurotoxicidad inducida por MDMA en hipocampo y estriado. Sin embargo, cuando la respuesta hipotérmica se revirtió utilizando una manta homeotérmica, la protección ejercida por dizocilpina desapareció. Los autores concluyeron que la protección ejercida por este antagonista no competitivo del receptor NMDA se debe únicamente a su capacidad para disminuir la temperatura corporal de los animales.

Estudios similares fueron llevados a cabo por Malberg y col. (1996). Los autores observaron que la ketanserina (6 mg kg^{-1} , i.p.) y la α -metil-p-tirosina (75 mg kg^{-1} , i.p.) disminuyeron la temperatura corporal de las ratas cuando se administraron antes que MDMA (40 mg kg^{-1} , s.c.). La aparición de la hipotermia fue inmediata y duró entre 180 y 240 min. A las dos semanas analizaron las concentraciones indólicas en el cerebro de rata y observaron protección frente a las disminuciones en las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en la corteza, estriado e hipocampo inducidas por MDMA. Cuando las ratas fueron mantenidas a una temperatura ambiente alta para prevenir la hipotermia, la protección desapareció.

Estos datos considerados en conjunto indican que algunos compuestos protegen frente a la neurotoxicidad producida por MDMA debido a su capacidad para provocar hipotermia o por lo menos, para prevenir la hipertermia inducida por MDMA.

La hipotermia podría enlentecer la entrada de MDMA en el terminal nervioso serotoninérgico, y así disminuir la cantidad de 5-HT disponible en el citosol para ser liberada (Farfel y Seiden, 1995a) o podría enlentecer la conversión de MDMA en un metabolito tóxico (Paris y Cunningham, 1991).

No obstante, existen compuestos que protegen frente a la neurotoxicidad inducida por MDMA por mecanismos que no implican una disminución de la temperatura corporal de los animales. Schmidt y col. (1990b) estudiaron el efecto de un antagonista de los receptores 5-HT₂, el MDL 11,939, sobre el efecto hipertérmico y la neurotoxicidad producidos por MDMA. MDL 11,939 (5 mg kg^{-1} , s.c.) no fue capaz de prevenir la hipertermia producida por MDMA

(30 mg kg⁻¹) y sin embargo, atenuó la disminución en la concentración de 5-HT en la corteza, el hipocampo y el estriado inducida por MDMA una semana después de su administración. Es decir, este compuesto protege frente a la toxicidad inducida por MDMA sin modificar la respuesta hipertermica subsiguiente a la administración de MDMA.

Efectos similares se observaron en el mismo estudio (Schmidt y col., 1990b) con un inhibidor de la recaptación de 5-HT, el MDL 27,777.

Malberg y col. (1996) confirmaron este resultado utilizando otro inhibidor de la recaptación de 5-HT, la fluoxetina. Observaron que la fluoxetina no afectó la temperatura corporal de los animales y, sin embargo, ejerció protección frente a la neurotoxicidad producida por MDMA.

Recientemente Colado y col. (1997a) han observado que clometiazol (50 mg kg⁻¹, i.p.) administrado 5 min antes y 55 min después de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.), protege frente a la neurotoxicidad inducida por MDMA a la vez que previene la hipertermia inducida por la droga. Cuando las ratas tratadas con clometiazol y MDMA fueron situadas a una temperatura ambiental alta para mantener su temperatura corporal similar a la observada en ratas tratadas con MDMA únicamente, clometiazol protegió parcialmente frente a la neurotoxicidad producida por MDMA. Esto indica que el clometiazol ejerce un efecto neuroprotector por 2 vías, previniendo la hipertermia producida por MDMA y por un mecanismo, no conocido, que es independiente de los cambios en la temperatura corporal de los animales.

Por otra parte, existen compuestos que previenen la hipertermia producida por derivados anfetamínicos y sin embargo no protegen frente a su neurotoxicidad. Colado y col. (1993) observaron que clometiazol a una dosis que protege frente a la toxicidad inducida por MDMA, no previene la neurotoxicidad inducida por PCA aunque si bloquea la hipertermia inducida por este derivado anfetamínico. Resultados similares fueron obtenidos por Farfel y Seiden (1995b), los cuales observaron que dextrometorfan (75 mg kg⁻¹, i.p., un bloqueador de receptores NMDA, canales de Ca²⁺ voltaje dependientes y del transportador de 5-HT) previno la hipertermia inducida por PCA (10 mg kg⁻¹, i.p.) pero no fue capaz de proteger frente a la neurotoxicidad inducida por este compuesto.

Aunque en muchos casos la hipertermia va unida a los efectos neurotóxicos de los derivados anfetamínicos, no es, sin embargo, un factor indispensable para la neurotoxicidad. Fenfluramina, otro derivado anfetamínico que ejerce efectos tóxicos sobre el sistema serotoninérgico comparables a los inducidos por MDMA, no altera la temperatura corporal de

los animales (Colado y col., 1993 y Farfel y Seiden, 1995b). Además, Colado y col. (1993) observaron que la administración de una dosis de PCA que no produce hipertermia, es capaz de producir efectos neurotóxicos en el sistema serotoninérgico.

Aunque algunos autores han sugerido que el grado de hipertermia podría de alguna forma determinar el grado de neurotoxicidad (Broening y col., 1995) es importante resaltar que la hipertermia *per se* no causa efectos neurotóxicos. Broening y col. (1995) demostraron que ratas a las que se les había administrado salino y mantenido a una temperatura ambiente de 40 °C (causando así una hipertermia similar a la observada en ratas tratadas con MDMA 40 mg kg⁻¹ y mantenidas a una temperatura ambiente de 25 °C) no mostraban ninguna alteración en la concentración cerebral de 5-HT.

II. OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral se ha propuesto contribuir a dilucidar el mecanismo de la degeneración de terminales serotoninérgicos producida por la 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), estudiando concretamente la participación de los radicales hidroxilo en el proceso neurodegenerativo y la procedencia de los mismos.

Los objetivos concretos perseguidos fueron los siguientes:

- Estudiar el efecto de MDMA sobre la generación *in vivo* de radicales hidroxilo en el hipocampo de la rata, utilizando microdiálisis con perfusión intracerebral de ácido salicílico.
- Evaluar el efecto de un compuesto atrapador de radicales libres, α -fenil-*N*-ter-butyl nitrona, sobre la formación de radicales libres y sobre la neurodegeneración.
- Comprobar si la formación de radicales hidroxilo se produce en los terminales serotoninérgicos lesionados selectivamente por la MDMA.
- Evaluar la formación de radicales hidroxilo en el hipocampo tras la administración de otros derivados anfetamínicos: *p*-cloroanfetamina y fenfluramina.
- Investigar la posible relación entre la hipertermia y la neurotoxicidad inducida por MDMA.
- Evaluar la posible relación entre las alteraciones agudas producidas por MDMA sobre el metabolismo de la dopamina y el proceso neurodegenerativo inducido por la droga a largo plazo. Para ello, se estudió el efecto de la L-DOPA, precursor de la síntesis de dopamina, sobre la respuesta hipertérmica, la generación de radicales hidroxilo y la neurotoxicidad de la MDMA.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 ANIMALES

Se utilizaron ratas macho Dark Agouti (Interfauna, Barcelona) de peso comprendido entre 180 y 200 g. Las ratas fueron mantenidas en jaulas estándar en grupos de seis en condiciones de temperatura y humedad constante (21°C, 50-55 %), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y libre acceso a comida y agua (Animalario de U.C.M.).

III.2 PROTOCOLOS DE ADMINISTRACIÓN

Para evaluar los efectos a largo plazo o neurotóxicos de diversos derivados anfetamínicos, se administró 3,4 metilendioximetanfetamina (MDMA, 5,10 y 15 mg kg⁻¹, i.p.), fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) o *p*-cloroanfetamina (PCA, 5 mg kg⁻¹, i.p.) a tiempo cero y se monitorizó la temperatura rectal de los animales durante 5 h. Siete días después se determinaron diversos parámetros indicativos de neurotoxicidad.

Para evaluar los efectos agudos de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) la droga se administró a tiempo cero evaluándose la toxicidad a las 4 h de la administración.

En los experimentos de microdiálisis intracerebral *in vivo* se administró MDMA, fenfluramina o PCA a tiempo cero y se efectuó la medición de distintos parámetros bioquímicos en el dializado durante las 6.5 h siguientes.

En los estudios de neuroprotección, PBN (α -fenil-*N*-ter-butyl nitrona, 120 mg kg⁻¹, i.p.) se administró 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA.

En los estudios con L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p.) este compuesto se administró conjuntamente con benserazida (6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 120 min después de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o 30 min antes de una dosis no tóxica de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.).

Las dosis de los diversos compuestos se expresan como ácido o base libre. Todos los compuestos se disolvieron en salino (0.9 % *p/v* NaCl en agua desionizada) y se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de 1 ml kg⁻¹ excepto PBN que se inyectó en un volumen de 6 ml kg⁻¹. El agua desionizada utilizada se obtuvo de un sistema Milli-Q (Millipore Ibérica S.A.).

III.3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS NEUROQUÍMICOS EN TEJIDO CEREBRAL

III.3.1 Determinación de niveles cerebrales de monoaminas y metabolitos

III.3.1.1 Extracción y preparación de muestras

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitados. Una vez abierto el cráneo y extraído el encéfalo, se diseccionaron sobre hielo picado el hipocampo, la corteza y el estriado. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance ER-182A, A&D Company, Japón). El tejido fue homogeneizado durante 15 s utilizando un homogeneizador de varilla (Ultra-Turrax, Janke & Kunkel, velocidad máxima) en diferentes volúmenes (1.5 ml para hipocampo y estriado; 2 ml para corteza) de ácido perclórico 0.2 M conteniendo cisteína 0.1 %, metabisulfito sódico 0.1 % y EDTA 0.01 % (Green y col., 1992). El homogeneizado se centrifugó a 12000 rpm (Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giralt, EE.UU.) durante 20 min a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue decantado y congelado a -80°C hasta su posterior análisis.

III.3.1.2 Cuantificación de la concentración de monoaminas y metabolitos

La cuantificación de serotonina (5-HT), dopamina (DA) y sus metabolitos se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (h.p.l.c.) con detección amperométrica. El sistema de h.p.l.c. utilizado incluye una bomba (Waters 510) conectada a un inyector automático con refrigerador (Capacidad máxima de inyección = 200 µl, Waters 712 WISP), una columna de fase reversa (Spherisorb ODS2, 5 µm, 150 x 3.9 mm, Waters) con precolumna (Nova-Pak C18, Waters) un detector amperométrico (Waters M460) conectado a una unidad de integración (Waters M745). La fase móvil para aminas estaba compuesta por KH₂PO₄ (0.05 M), ácido octanosulfónico (0.2 mM), EDTA (0.1 mM) y metanol 16 % en agua para h.p.l.c. ajustada a pH 3 (654 pH Meter, Metrohm, Suiza) con ácido ortofosfórico (H₃PO₄). La fase móvil fue filtrada (filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0.2 µm, Waters) y desgasificada al vacío. El flujo fue de 1 ml min⁻¹ y el potencial del electrodo de

trabajo fue 0.85 V. El electrodo de trabajo utilizado fue de carbono vidrioso y el electrodo de referencia fue llenado con NaCl 3 M. Los estándares utilizados para la identificación y cuantificación de picos fueron 5-HT, ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA), DA, ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA). Las soluciones madres a una concentración de 1 mg ml⁻¹ se hicieron en la mezcla de ácido perclórico anteriormente descrita (ver apartado III.3.1.1). La solución final contenía 50 ng ml⁻¹ de 5-HT y 5-HIAA, 100 ng ml⁻¹ de DOPAC y HVA y 500 ng ml⁻¹ de DA en ácido perclórico (ver apartado III.3.1.1). La concentración de 5-HT, DA o de los metabolitos correspondientes se expresó en ng g⁻¹ tejido.

Tiempos de retención y límite de detección en las condiciones utilizadas

	Tiempo de retención (min)	Límite de detección (pg)
DA	4.8	70
DOPAC	7.7	20
5-HT	11.6	50
5-HIAA	13.3	80
HVA	20.4	1000

III.3.2 Determinación de los lugares de recaptación de 5-HT

La cuantificación de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT fue llevado a cabo por el método descrito por Hewitt y Green (1994) mediante la medida de la B_{max} (la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT) del proceso de fijación de [³H]paroxetina (un inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT). Estudios previos habían demostrado que la MDMA provoca cambios sobre la B_{max} pero no altera la K_D (la afinidad de los lugares de recaptación de 5-HT) (Battaglia y col., 1987; Nichols y col., 1990). Esto nos permitió el uso de una sola concentración de saturación de [³H]paroxetina (Battaglia y col., 1988; Johnson y col., 1990). Puesto que estos lugares se encuentran en los terminales nerviosos que contienen 5-HT, su disminución es indicativa de la pérdida de terminales y/o axones serotoninérgicos (revisión Green y col., 1995).

III.3.2.1 Extracción y preparación de muestras

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y decapitados. Una vez abierto el cráneo y extraído el encéfalo, se diseccionaron sobre hielo picado el hipocampo y la corteza. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance ER-182A, A&D Company, Japón). El tejido cerebral fue homogeneizado durante 15 s usando un homogeneizador de varilla (Ultra-Turrax, Janke & Kunkel, velocidad máxima) en 5 ml de tampón Tris (50 mM; conteniendo NaCl (120mM) y KCl (5mM) y ajustado a pH 7.4 con ácido clorhídrico). El homogeneizado fue centrifugado a 30.000 g (17.000 rpm, Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giralte, EE.UU.) durante 10 min a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue desechado y este proceso de lavado fue repetido dos veces. El precipitado fue finalmente resuspendido en tampón Tris-HCl a una concentración de 100 mg de tejido ml⁻¹ y diluido a una concentración de 10 mg kg⁻¹ con el mismo tampón.

III.3.2.2 Fijación de [³H]paroxetina

Alícuotas de esta solución fueron colocadas en tubos que contenían [³H] paroxetina 1 nM en ausencia y en presencia de 5-HT 10 μM (fijación total y fijación inespecífica, respectivamente). Las muestras fueron incubadas durante 60 min a 22 °C. Posteriormente las muestras se filtraron (Semiautomatic Cell Harvester, Skatron, Noruega) a través de filtros de fibra de vidrio de borosilicato (GF/B, Skatron) previamente tratados con 0.05 % polietiliminina. Una vez secados los filtros fueron transferidos a viales a los que se añadieron 2 ml de líquido de centelleo (Emulsifier-Safe, Packard Instrument BV, Holanda). La radioactividad fue medida mediante un contador de centelleo (Tricarb® Liquid Scintillation Analyzer, Model 2500 TR, Packard Instrument Company, EE.UU.) usando como estándar tubos que contenían 100 μl de [³H]paroxetina (10 nM) y 2 ml de líquido de centelleo. La fijación específica (fijación total — fijación inespecífica) fue expresada como fmol de [³H]paroxetina unida por mg de proteína (para determinación de proteínas ver siguiente apartado).

III.3.2.3 Determinación de proteínas

Para determinar el contenido proteico del tejido se siguió el método descrito por Lowry y col. (1951). Se pipetearon 20 μl del homogeneizado (preparado para la determinación de lugares de recaptación de 5-HT, 10 mg ml^{-1}) y 180 μl de agua desionizada. Se añadió a cada tubo 2 ml de una solución previamente preparada conteniendo sulfato de cobre 0.04 %, tartrato sódico 0.07 %, sodio duodecil sulfato 0.69 % y carbonato sódico 1.96 %, en hidroxido sódico 0.1 N. Pasados 10 min, se añadieron 200 μl del reactivo de Folin (previamente diluido al 50 % con agua desionizada). Este proceso fue realizado para cada muestra de tejido y en triplicado. A la vez una curva de concentración de estándares fue preparada siguiendo el mismo método pero en lugar de homogeneizado se utilizó suero de albúmina bovina (1 mg ml^{-1}). Las muestras y la curva de estándares se incubaron a 22°C durante 55 min y se analizaron en un espectrofotómetro (Milton Roy Spectronic 601, Reino Unido) a una longitud de onda $\lambda = 750$ nm.

III.4 MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL *IN VIVO*

III.4.1 La técnica

La técnica de microdiálisis intracerebral permite determinar *in vivo*, con exactitud y en tiempo real los niveles intersticiales de compuestos no macromoleculares. En este sentido la microdiálisis representa la culminación de técnicas anteriores como la “push-pull” canula que tenía menor grado de efectividad y causaban más daño hístico.

Hoy en día la sonda más utilizada es una sonda concéntrica (esquema en Fig. 2) con una entrada para el líquido de perfusión que pasa a un área de membrana tubular donde ocurre el intercambio de compuestos y posteriormente fluye a través de un tubo de salida.

III.4.1.1 Factores que influyen en el desarrollo de la técnica

Aunque en principio la técnica se basa en un proceso sencillo existen muchos factores que influyen en el desarrollo de la microdiálisis y sus resultados.

- Daño hístico

Existe un periodo inicial de alteración funcional en los tejidos tras la implantación de la sonda. Esta alteración entre otras cosas se manifiesta por un incremento en el metabolismo de la glucosa, disminución del flujo sanguíneo y alteración de la liberación de neurotransmisores. Este periodo dura entre 30 min y 24 h (Benveniste y col., 1987; Drew y col., 1989; Osborne y col., 1990, 1991). También al comienzo de la perfusión existe un periodo de alteración. Este periodo se caracteriza por una caída en la concentración de la mayoría de compuestos, dura alrededor de 30 min y está causado por la lesión inicial en el tejido. Según Ungerstedt (1991) el grado de lesión inicial puede estar influenciado por el procedimiento quirúrgico.

- Difusión y extracción

El intercambio de compuestos a través de la membrana ocurre en ambas direcciones. Los compuestos difunden a través de la membrana siguiendo un gradiente de concentración. La composición del medio de perfusión es muy importante ya que determina la composición del ambiente más próximo a la sonda. Por lo tanto, el líquido de perfusión debe parecerse lo más posible al medio en el que va a implantarse la sonda. Es decir, en la microdialísis del cerebro el medio de perfusión debe parecerse al líquido cefalorraquídeo (LCR). La concentración de los iones es muy importante ya que ciertos iones pueden influir en la apertura y cierre de canales. Por ejemplo, la concentración de Ca^{2+} influye en los niveles basales así como en la respuesta farmacológica de la dopamina, en el dializado de estriado (Westerink y De Vries, 1988; Moghaddam y Bunney, 1989).

Existen dos tipos de extracción:

1. Fracción de extracción o extracción relativa
2. Extracción absoluta

La fracción de extracción corresponde a la concentración de un compuesto en el dializado como porcentaje de la concentración del compuesto en el medio que rodea la sonda. *In vivo* este valor no debería variar a lo largo del periodo de recogida de muestras.

La extracción absoluta corresponde a la cantidad total del compuesto recogido en un tiempo definido. *In vivo* este valor puede variar según la producción o liberación del compuesto.

Factores que influyen la extracción:

- Flujo de perfusión

Existe una relación inversa entre el flujo de perfusión y la fracción de extracción

- Tiempo después del comienzo de perfusión

Nada más comenzar la perfusión la fracción de extracción es muy alta pero disminuye rápidamente y aunque sigue disminuyendo, a partir de los 60 min esta disminución representa menos de un 1 % por hora (Benveniste, 1989).

- Coeficiente de difusión

Este valor varía según el compuesto. También influye el ambiente en el que está la sonda ya que las membranas celulares dificultan la difusión de compuestos hacia la sonda.

- Concentración de la sustancia

La fracción de extracción es independiente de la concentración en el medio exterior (Ungerstedt y col., 1982; Tossman y Ungerstedt, 1986; Kendrick, 1988) pero la extracción absoluta es proporcional a la concentración. Esto es precisamente lo que permite la medida de los cambios de concentración extracelular de las sustancias.

- Interacción con la membrana de diálisis

Ciertas sustancias pueden interaccionar con la membrana dependiendo de la membrana utilizada (Ungerstedt, 1984). Por lo tanto es recomendable utilizar una de diálisis y no de ultrafiltración. Debe ser biocompatible e inerte para así no interferir con el paso de moléculas. Normalmente está compuesta de polímeros orgánicos como la celulosa.

- Temperatura

Grandes cambios en la temperatura pueden influir en la fracción de extracción. Cambios de 22 a 37 °C pueden incrementar un 30 % la fracción de extracción de ciertos compuestos *in vitro* (Wages y col., 1986; Benveniste y col., 1989; Lindefors y col., 1989)

- Área de la membrana

Ambos tipos de extracción aumentan en proporción al área de la membrana de diálisis.

- Composición del medio de perfusión y drenaje

Para permitir que una sustancia difunda al interior de la sonda, la sustancia no debe estar presente en el medio de perfusión. Sin embargo el continuo drenaje de la sustancia al interior de la sonda disminuye la concentración en el medio exterior. Estos cambios en la concentración pueden influir su subsiguiente difusión.

III.4.1.2 Ventajas de la microdiálisis

- refleja la composición del líquido extracelular.
- se puede llevar a cabo en animales *in vivo*, en animal consciente, con libre movimiento.
- se puede llevar a cabo en áreas/estructuras específicas del cerebro adaptando la longitud de la membrana al tamaño de la estructura.
- causa mínimo daño al tejido y a la barrera hematoencefálica (Benveniste y col., 1984; Tossman y Ungerstedt, 1986).
- permite la recogida continua de muestras a lo largo de horas e incluso días lo cual proporciona información inmediata sobre cambios en los niveles extracelulares de diferentes compuestos.
- permite la extracción de compuestos específicos con la exclusión de otros compuestos como las proteínas que no difunden a través de la membrana debido a su peso molecular.
- permite la obtención de muestras limpias que se pueden analizar directamente.

III.4.2 Fabricación de sondas

Las sondas utilizadas se hicieron en el laboratorio (Fig. 2). Consistían de una pieza en acero inoxidable central de 10 mm (Cooper's Needle Works, Ltd, Reino Unido) en cuyo interior se situaron dos piezas de tubo de silica (Vitreous Silica, Scientific Glass Engineering, Reino Unido) de 20 mm de longitud. Uno, la entrada de la sonda, sobresalía 5 mm por cada extremo del tubo central y el otro, la salida de la sonda sobresalía 15 mm por un solo extremo. Los tubos de silica se fijaron al tubo de acero inoxidable con un epoxi-pegamento (Adhesivo "Epoxy" de fraguado rápido, RS Components, Reino Unido) por el extremo donde sobresalían los dos tubos. Se cortaron los tubos de silica de entrada y salida a 5 y 7 mm respectivamente. Se colocaron sobre los tubos de silica de entrada y salida de la sonda unos tubos de acero inoxidable de 5 y 7 mm respectivamente que estaban unidos a tubos de politeno de 2 y 3 cm respectivamente (diámetro interior = 0.28 mm, diámetro exterior = 0.61 mm, Portex Ltd, Reino Unido). Se fijaron con epoxi-pegamento que una vez seco se cubrió con cemento dental (Duralay, Reliance, Dental Manufacturing Company, EE.UU.). En el otro extremo se cortó el tubo de silica que sobresalía a una longitud de 4 mm. A este se le puso una membrana de diálisis (Cuprophan® dialysis membrane GFE9, Gambro, Reino Unido) que se introdujo 2 mm

por el tubo de acero y se fijó en este punto con epoxi-pegamento. El otro extremo de la membrana se selló a 1 mm del tubo de silica con epoxi-pegamento (Fig. 2).

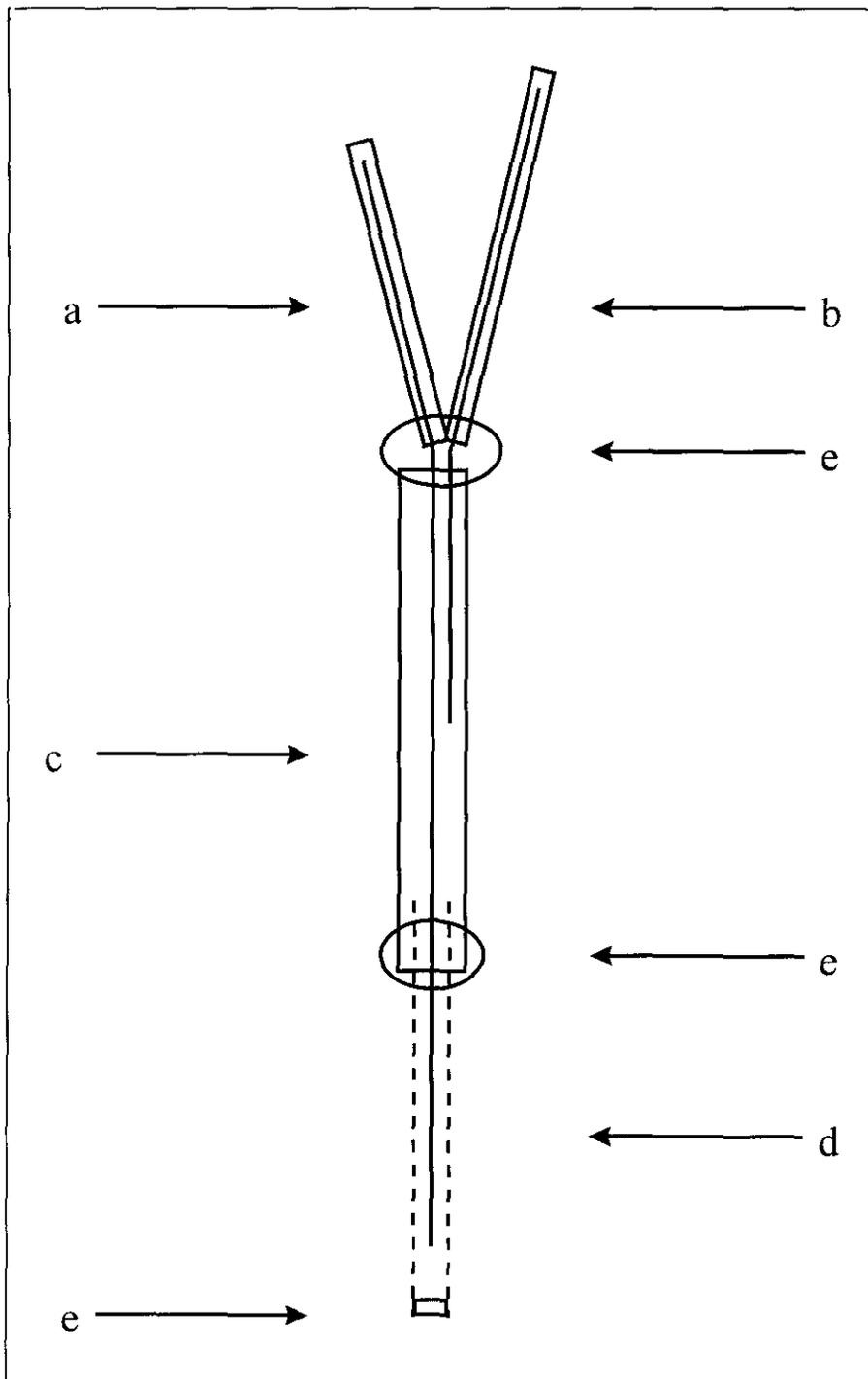


Figura 2. Esquema de una sonda de microdiálisis construída en el laboratorio y utilizada en los experimentos de microdiálisis. a : tubo de entrada, b: tubo de salida, c: cuerpo de la sonda, d: membrana de diálisis, e: epoxi-pegamento.

III.4.3 Determinación de radicales hidroxilo en el dializado de hipocampo

III.4.3.1 Implantación de sondas

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (40 mg kg^{-1} , i.p.) y situadas en un aparato de estereotaxia Kopf® (David Kopf Instruments, EE.UU.) para proceder a la implantación de la sonda. Las coordenadas para implantación en el hipocampo fueron calculadas usando el atlas para animal pequeño de König y Klippel (1963) tomando como referencia la línea interaural: anteroposterior $+0.22 \text{ cm}$, mediolateral -0.43 cm y dorsoventral -0.8 cm . El cráneo fue perforado con un torno dental (Micromotor 5750, Zenil, España). Las sondas fueron implantadas, fijándose al cráneo con microtornillos, pegamento cianoacrilico (Super Glue-3 Gel, Loctite España S.A.) y cemento dental (RR Acrílico autocurable para reparaciones, DeTrey, Reino Unido). Los tubos de entrada y salida de las sondas fueron selladas con pegamento caliente (Cola Termofusible, Salki, España). Las ratas fueron situadas en jaulas individuales de metacrilato con base de PVC para microdiálisis ($30 \times 30 \times 20 \text{ cm}$) (Servicio de Taller, Facultad de Físicas, U.C.M.). Para permitir la recuperación de los animales, los experimentos de microdiálisis se llevaron a cabo entre 16 y 24 h después de la intervención quirúrgica.

III.4.3.2 Método atrapador de salicilato

El fundamento de este método se basa en que los radicales hidroxilo reaccionan con el ácido salicílico generando dos compuestos, los ácidos 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoicos (DHBA).

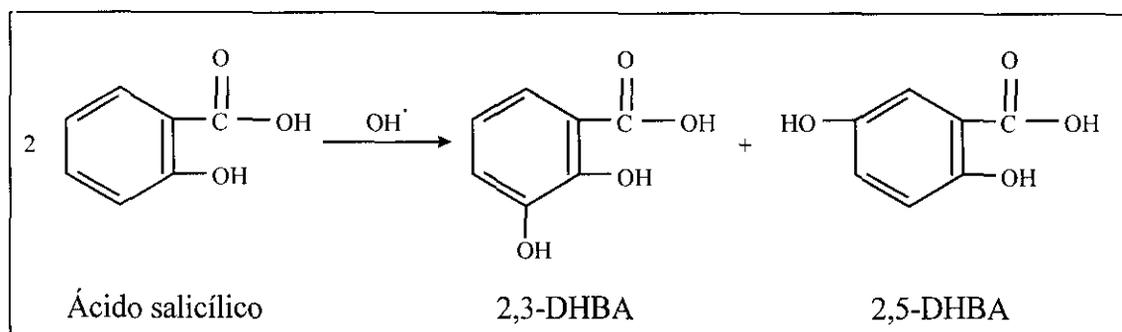


Figura 3. Reacción del ácido salicílico con radicales hidroxilo (Floyd, 1990).

Estos compuestos son estables y cuantificables por h.p.l.c. con detección coulométrica (Radzik y col., 1983; Floyd y col., 1984). La ventaja de este método es que el salicilato es relativamente no tóxico y reacciona con los radicales hidroxilo de una forma rápida (Floyd, 1990).

Existen dos formas de administrar el salicilato de tal manera que pueda reaccionar con los radicales hidroxilo: 1. por vía sistémica, 2. por vía central, a través de una sonda de microdiálisis o por inyección.

1. Por vía sistémica

Esta forma de administración ha sido utilizada por algunos investigadores (Giovanni y col., 1995), pero presenta dos limitaciones. La primera es que se deben medir los niveles de ácido salicílico en el cerebro para así comprobar la concentración de ácido salicílico que ha atravesado la barrera hematoencefálica. Segunda, el compuesto 2,5-DHBA puede formarse en el hígado debido a la acción de la citocromo P₄₅₀ y enzimas microsomales sobre el salicilato (Halliwell y col., 1991; Ingelman-Sundberg y col., 1991). Esto origina niveles altos de 2,5-DHBA que no están relacionados con la formación de radicales hidroxilo y que pueden enmascarar cambios pequeños en la formación de radicales hidroxilo. Asimismo los niveles de 2,3- y 2,5-DHBA se pueden ver alterados por cambios en el flujo de sangre (Giovanni y col., 1995) o en la función hepática que pueden ocurrir tras la administración de MDMA y que influyen sobre la difusión del ácido salicílico a través de la barrera hematoencefálica.

2. Por vía central

La administración central permite la determinación de 2,3- y 2,5-DHBA formados a partir de la reacción de los radicales hidroxilo presentes en el líquido extracelular con el salicilato. El ácido salicílico se administra por inyección o se añade al líquido de perfusión de la microdiálisis de manera que difunda a través de la membrana al líquido extracelular (Chiueh y col., 1992).

La determinación de radicales hidroxilo por el método atrapador del salicilato ha sido descrita por varios investigadores (Chiueh y col., 1992; Giovanni y col., 1995; Globus y col., 1995; Maruyama y col., 1995). Sin embargo cuando nosotros utilizamos la concentración de salicilato descrita, es decir, 5 mM en LCR artificial (Chiueh y col., 1992; Wu y col., 1993;

Globus y col., 1995), observamos una disminución en las concentraciones basales de los ácidos 2,3- y 2,5-DHBA a lo largo del tiempo (Fig. 4). El pH de la solución del LCR artificial conteniendo 5 mM de ácido salicílico era de 2.7. Por consiguiente evaluamos el efecto de una concentración más baja de salicilato, 0.5 mM utilizada recientemente por Obata y Yamanaka (1995). Esta concentración producía LCR artificial menos ácido con un pH de 3.5. *In vivo* observamos unas concentraciones basales de 2,3- y 2,5-DHBA estables a lo largo del tiempo que, aunque más bajas, eran fácilmente cuantificables (Fig. 4). Por lo tanto utilizamos la concentración de 0.5 mM de ácido salicílico en LCR artificial en todas las determinaciones de radicales hidroxilo.

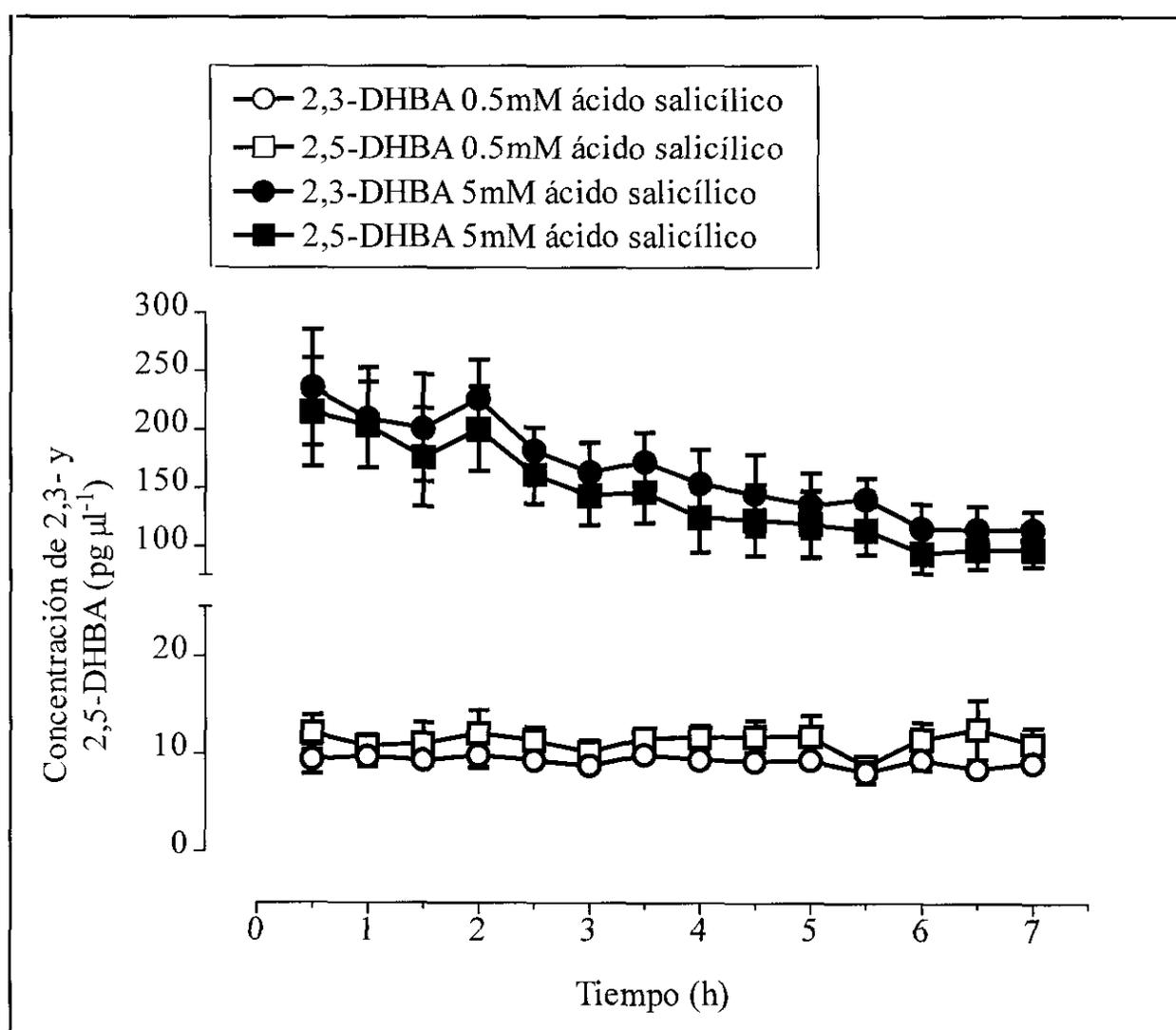


Figura 4. Concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado hipocámpal de ratas perfundidas con LCR artificial conteniendo ácido salicílico 0.5 mM ó 5 mM. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 11).

III.4.3.3 Fracción de extracción de las sondas

2,3-DHBA

20 pg μl^{-1}	40 pg μl^{-1}	80 pg μl^{-1}
25.4 \pm 3.5 % (3)	25.8 \pm 3.1 % (4)	25.9 \pm 2.5 % (4)

2,5-DHBA

20 pg μl^{-1}	40 pg μl^{-1}	80 pg μl^{-1}
25.9 \pm 3.9 % (3)	28.5 \pm 5.7 % (3)	26.6 \pm 4.8 % (4)

III.4.3.4 Microdiálisis

Entre 16 y 24 h después de la implantación, la entrada de la sonda se conecta a través de un pivote giratorio (Single cannal 375 series swivel, Instech, EE.UU.) a un tubo de polietileno (diámetro interior = 0.28 mm, diámetro exterior = 0.61 mm, Portex Ltd, Reino Unido) que a su vez está conectado a una bomba de precisión de microdiálisis (Pump 22, Harvard Apparatus, EE.UU.). Diversas jeringas (Hamilton Microliter™ Syringe, Suiza) se llenan con LCR artificial conteniendo ácido salicílico (0.5 mM) (composición del LCR: NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂·6H₂O 1.18 mM, CaCl₂·2H₂O 1.26 mM) previamente filtrado (filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0.2 μm , Waters) y desgasificado al vacío. El flujo es de 1 $\mu\text{l min}^{-1}$. Un tubo de 40 cm (FEP-Tubing, CMA/Microdialysis AB, Suecia) se conecta a la salida de la sonda. Una vez que el dializado comienza a salir por el extremo del tubo de salida, se deja estabilizar el sistema 1 h. Al cabo de esta hora se empiezan a recoger muestras cada 30 min en eppendorf de 300 μl . El dializado se almacena a -80 °C hasta su análisis.

La diálisis se continua durante un total de 8 h recogiendo por tanto un total de 16 muestras por rata. Al cabo de las 8 h las ratas se sacrifican con una sobredosis de pentobarbital. La correcta localización de cada sonda se verifica histológicamente tras la perfusión de azul de metileno a través de la sonda para marcar el trayecto.

III.4.3.5 Cuantificación de la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA

Las muestras se analizaron por h.p.l.c. con detección culométrica. La fase móvil utilizada tenía una composición de 0.025 M KH_2PO_4 , 10 % metanol y 20 % acetonitrilo en agua para h.p.l.c. ajustado a pH 3.7 con ácido fosfórico, filtrada (filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0.2 μm , Waters) y desgasificada al vacío. El flujo fue de 1 ml min^{-1} y el potencial de la célula analítica fue 400 mV con una sensibilidad de 1 μA . El sistema de h.p.l.c. consistió en una bomba (Waters 510) unida a un inyector manual (Volumen de inyección = 20 μl , Rheodyne), una columna de fase reversa C_8 , 250 x 4.60 mm (Phenomenex, EE.UU.) con precolumna y detector culométrico (Cuolochem® II Modelo 5200A, ESA, EE.UU.). La corriente fue monitorizada mediante un programa de ordenador (Axxiom 747, Quadrant Scientific Ltd, Reino Unido). Los estándares usados para la identificación y cuantificación de picos fueron los ácidos 2,3- y 2,5-DHBA. Las soluciones madres de estos estándares se prepararon en 50 % metanol y 50 % agua desionizada. La concentración del estándar fue de 80 ng ml^{-1} en fase móvil para ambos compuestos.

Tiempos de retención y límite de detección en las condiciones utilizadas

	Tiempo de retención (min)	Límite de detección (pg)
2,5-DHBA	7.9	40
2,3-DHBA	9.7	38

III.4.4 Determinación de DA y sus metabolitos en el dializado estriatal

III.4.4.1 Implantación de sondas

La implantación de las sondas se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (ver apartado III.4.3.1) con la diferencia de que se situaron en el estriado siguiendo las coordenadas descritas en el atlas de König y Klippel (1963); tomando como

referencia la línea interaural: anteroposterior +0.79 cm, mediolateral -0.25 cm y dorsoventral -0.8 cm.

III.4.4.2 Fracción de extracción de las sondas

DA

1 pg μl^{-1}	3 pg μl^{-1}	9 pg μl^{-1}	27 pg μl^{-1}
26.5 \pm 5.5 % (2)	26.5 \pm 3.9 % (4)	23.8 \pm 2.6 % (4)	24.0 \pm 1.2 % (4)

DOPAC

100 pg μl^{-1}	300 pg μl^{-1}	900 pg μl^{-1}	2700 pg μl^{-1}
25.8 \pm 1.7 % (4)	26.5 \pm 1.3 % (4)	27.8 \pm 0.9 % (4)	28.3 \pm 0.9 % (4)

HVA

150 pg μl^{-1}	450 pg μl^{-1}	1350 pg μl^{-1}	4050 pg μl^{-1}
28.0 \pm 1.4 % (4)	26.0 \pm 1.0 % (4)	26.5 \pm 1.0 % (4)	27.3 \pm 0.9 % (4)

III.4.4.3 Microdiálisis

La microdiálisis se llevó a cabo como está descrito en la sección III.4.3.4 con la única diferencia de que los tubos de recogida de muestra contenían 5 μl de una solución de ácido perclórico 0.01 M, cisteína 0.2 % y metabisulfito sódico 0.2 % para evitar la degradación de la dopamina y sus metabolitos.

III.4.4.4 Cuantificación de la concentración de DA y sus metabolitos

Las muestras se analizaron por h.p.l.c. con detección culométrica. La fase móvil estaba compuesta por KH_2PO_4 (0.05 M), ácido octanosulfónico (1 mM), EDTA (0.1 mM) y metanol 14 % en agua para h.p.l.c. ajustada a pH 3 con ácido ortofosfórico. La fase móvil fue filtrada (filtros de nylon, diámetro 47 mm, tamaño del poro = 0.2 μm , Waters) y desgasificada al vacío. El flujo fue de 1 ml min^{-1} y el potencial de la célula analítica fue de 400 mV con una sensibilidad de 2

μ A. El sistema de h.p.l.c. consistió en una bomba (Waters 510) unida a un inyector manual (Volumen de inyección = 20 μ l, Rheodyne), una columna de fase reversa (Spherisorb ODS2, 5 μ m, 150 x 3.9 mm, Waters) con precolumna y detector culométrico (Cuolochem® II Modelo 5200A, ESA, EE.UU.). La corriente fue monitorizada mediante un programa de ordenador (Axxiom 747, Quadrant Scientific Ltd, Reino Unido). Los estándares utilizados para la identificación y cuantificación de picos fueron DA, DOPAC y HVA. Las soluciones madres se hicieron en la solución de ácido perclórico anteriormente descrita (ver apartado III.3.1.1). La solución final contenía 50 ng mg^{-1} DA, 50 ng ml^{-1} DOPAC y 100 ng ml^{-1} HVA, en LCR artificial.

Tiempos de retención y límite de detección en las condiciones utilizadas

	Tiempo de retención (min)	Límite de detección (pg)
DOPAC	6.0	30
DA	8.5	8
HVA	15.3	125

III.5 MEDICIÓN DE LA TEMPERATURA RECTAL

Cada 30 min se midió la temperatura rectal de las ratas usando una sonda especial para roedores acoplada a un lector digital (P9005 Thermometer, Type K, Portec, Reino Unido) e introduciéndola 2.5 cm por el recto de la rata.

III.6 FÁRMACOS Y REACTIVOS QUÍMICOS

(\pm)3,4-metilenodioximetanfetamina (clorhidrato; MDMA), (Servicio de Restricción de Estupefacientes, Ministerio de Sanidad)

α -fenil-*N*-tert-butil nitrona (PBN), azul de metileno (trihidrato), *N*-etil- α -metil-m-(trifluorometil)fenetilamina (clorhídrico), L-3,4-dihidroxifenil alanina (metil ester; L-DOPA),

D,L-serina 2[(2,3,4-trihidroxifenil)metil] hidrazida (clorhídrico), ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), ácido octanosulfónico (sal sódica), 5-hidroxitriptamina (complejo de sulfato de creatinina; serotonina, 5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), 3-hidroxitiramina (clorhídrico; 3,4-dihidroxyfeniletilamina; dopamina; DA), ácido 3,4-dihidroxyfenilacético (ácido homoprotocatecuico; DOPAC), ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (ácido homovanílico; HVA), polietilenimina, Tris(hidroximetil)aminometano (Trizma[®]), sulfato dodecil sódico (sulfato de lauril; SDS), albúmina bovina, reactivo Folin (Folin & Ciocalteu's phenol reagent), ácido 2,3-dihidroxybenzoico (2,3-DHBA) y ácido 2,5-dihidroxybenzoico (ácido gentísico; 2,5-DHBA) obtenidos de Sigma-Aldrich Química (España).

Cluoro cálcico ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), potasio dihidrogenofosfato (KH_2PO_4), sal disódica dihidrato del ácido etilendinitrilotetraacético (Tritiplex[®] III; EDTA), l-cisteína, carbonato sódico (Na_2CO_3), tartrato sódico (dihidrato; $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y hidroxilo sódico (NaOH) obtenidos de Merck (Alemania).

Cluoro sódico (NaCl), cluoro pótasico (KCl), cluoro magnésico ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), acetonitrilo (CH_3CN), metanol para HPLC (CH_3OH), ácido ortofosfórico (H_3PO_4) y ácido clorhídrico (HCl), cobre II sulfato 5-hidrato ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) obtenidos de Panreac (España).

Pentobarbital (sódico; Euta-Lender) obtenido de Laboratorios Normon (España). Agua para h.p.l.c. obtenido de Scharlau (Barcelona, España). [³H]Paroxetina obtenida de DuPont (EE.UU). Emulsifier-Safe (líquido de centelleo) obtenido de Packard Instrument BV (Holanda).

III.7 ESTADÍSTICA

La evaluación estadística de los resultados procedentes de los estudios de neurotoxicidad se llevó a cabo utilizando un análisis de varianza de 1 vía seguido del test de Newman-Keuls (Tallarida). La comparación estadística de las curvas de temperatura y de las curvas de concentración en los estudios de microdiálisis se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de 2 vías para medidas repetidas (BMDP Dynamic, Cork, Irlanda): programa 2V cuando el número de observaciones fue igual en todos los grupos o programa 5V

cuando el número de datos fue diferente. En ambos casos se utilizó el tratamiento como el factor entre sujetos y el tiempo como la medida repetida. Se efectuó la comparación de los grupos antes y después de recibir el tratamiento respectivo. La comparación estadística en la Figura 36 se llevó a cabo utilizando una t de Student (Tallarida).

IV. RESULTADOS

IV.1 EFECTO DE LA α -FENIL-N-TER-BUTIL NITRONA (PBN) SOBRE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR MDMA

Para evaluar los efectos neurotóxicos de la MDMA, los animales fueron sacrificados 7 días después de la administración de la droga.

IV.1.1 Efecto de MDMA sobre la concentración de 5-HT y 5-HIAA

Una inyección única de MDMA 5 mg kg⁻¹, i.p. no produjo cambio alguno en los niveles de serotonina (5-HT) en las estructuras estudiadas, es decir, el hipocampo, la corteza y el estriado 7 días después de su administración. Sin embargo, produjo una ligera disminución de la concentración del ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) en el hipocampo y estriado. La administración de MDMA 10 ó 15 mg kg⁻¹, i.p. originó una disminución significativa y dosis-dependiente del contenido indólico en las áreas cerebrales estudiadas (Fig. 5).

Una dosis más alta de MDMA (20 mg kg⁻¹, i.p.) se administró inicialmente pero se descartó por producir un alto porcentaje de mortalidad.

IV.1.2 Efecto de MDMA sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral

La administración de MDMA 5 mg kg⁻¹, i.p. no modificó la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT después de 7 días. La administración de dosis más altas de MDMA, 10 y 15 mg kg⁻¹, i.p. produjo una disminución dosis-dependiente de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT puesto que redujo la fijación de [³H]paroxetina al transportador presináptico de 5-HT (Fig. 6).

IV.1.3 Efecto de MDMA sobre la concentración estriatal de DA y DOPAC

Ninguna de las dosis administradas de MDMA (5, 10 y 15 mg kg⁻¹, i.p.) produjo cambios en los niveles de dopamina (DA), ni del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en el estriado 7 días después del tratamiento (Tabla 2).

IV.1.4 Efecto de PBN sobre la disminución del contenido indólico inducido por MDMA

La administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) 10 min antes y 120 min después de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) previno parcialmente la pérdida del contenido indólico en el hipocampo, corteza y estriado inducida por MDMA 7 días después del tratamiento (Fig. 7).

PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) administrado 10 min antes y 120 min después de salino no modificó la concentración indólica cerebral puesto que los niveles de 5-HT y de 5-HIAA en el hipocampo, corteza o estriado de estos animales fueron similares a los obtenidos en ratas tratadas únicamente con salino 7 días antes (Fig. 7).

IV.1.5 Efecto de PBN sobre la disminución de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT inducida por MDMA

La administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) 10 min antes y 120 min después de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) previno parcialmente la pérdida de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en el hipocampo y la corteza inducida por MDMA 7 días después del tratamiento (Fig. 8).

PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) administrado 10 min antes y 120 min después de salino no modificó la densidad de los sitios de recaptación de 5-HT, puesto que la fijación de [³H]paroxetina en la corteza e hipocampo de estos animales fue similar a la observada en animales tratados únicamente con salino 7 días antes (Fig. 8).

IV.1.6 Efecto de PBN sobre la concentración estriatal de DA y DOPAC en ratas tratadas con MDMA

La administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) 10 min antes y 120 min después de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) no modificó los niveles de DA y DOPAC en el estriado al cabo de 7 días (Tabla 3).

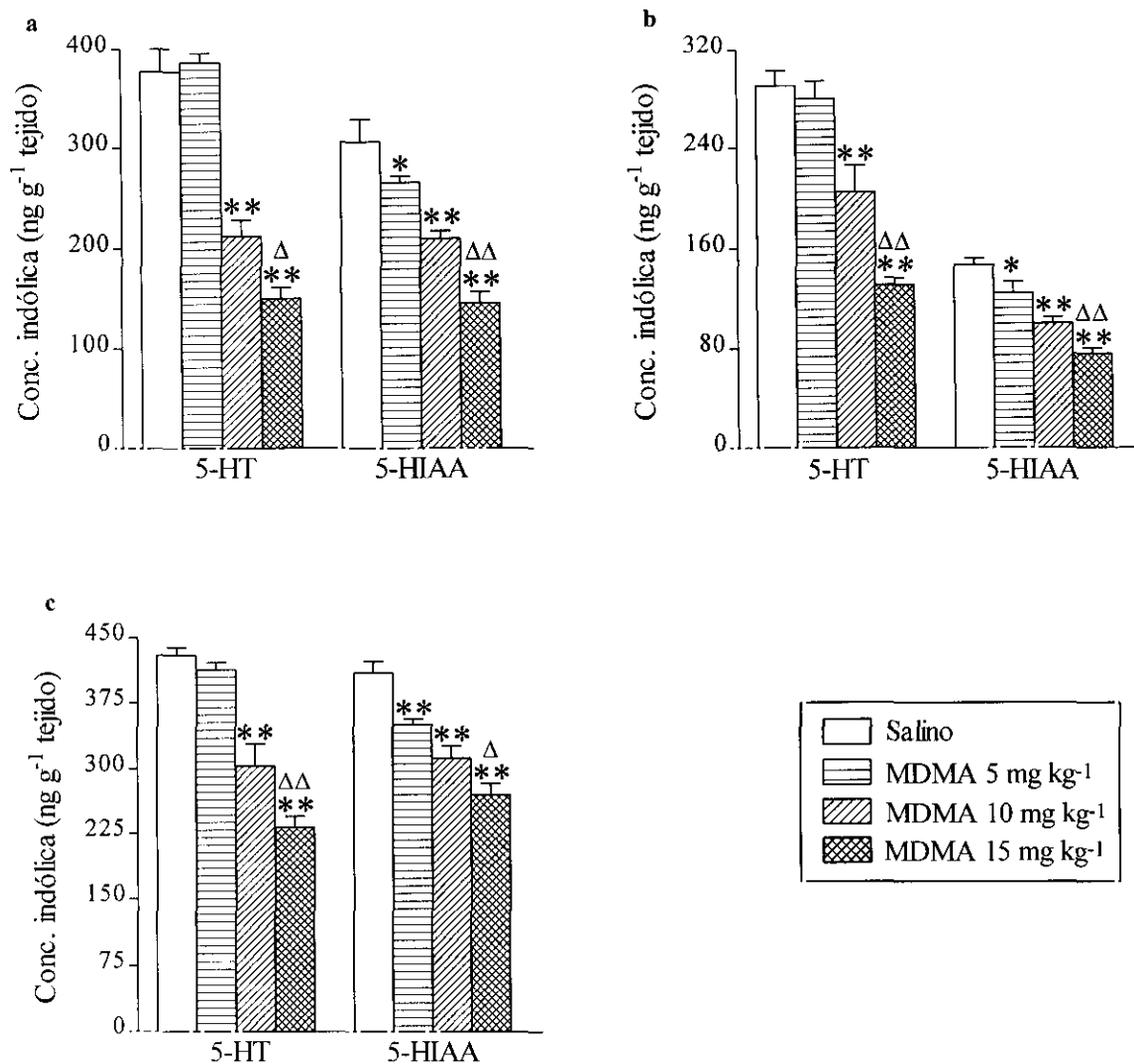


Figura 5. Efecto de la administración única de MDMA (5, 10 ó 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la concentración (ng g⁻¹ tejido) de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) en (a) el hipocampo, (b) la corteza y (c) el estriado 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 6-10). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs salino, ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01 vs MDMA 10 mg kg⁻¹; (Newman-Keuls).

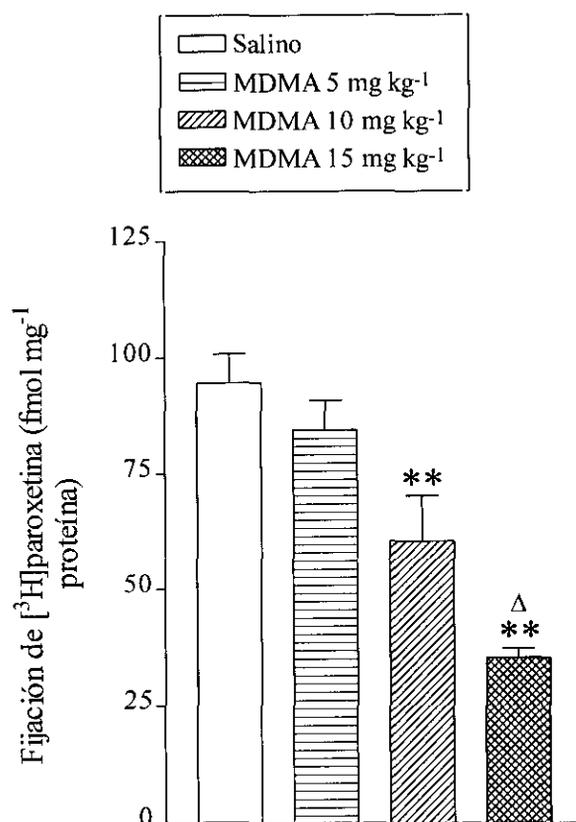


Figura 6. Efecto de la administración única de MDMA (5, 10 ó 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la fijación de [³H]paroxetina (fmol mg⁻¹ proteína) en la corteza cerebral 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 6-10). ***P* < 0.01 vs salino, ^Δ*P* < 0.05 vs MDMA 10 mg kg⁻¹; (Newman-Keuls).

Tabla 2. Efecto de la administración única de MDMA (5, 10 ó 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la concentración de dopamina (DA) y ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC) en el estriado 7 días después del tratamiento.

Tratamiento	DA (ng g ⁻¹ tejido)	DOPAC (ng g ⁻¹ tejido)
Salino	9104.7 ± 229.7 (9)	1089.3 ± 48.4 (9)
MDMA 5 mg kg ⁻¹	8767.0 ± 216.1 (6)	936.6 ± 35.4 (6)
MDMA 10 mg kg ⁻¹	8817.0 ± 375.0 (8)	1043.5 ± 53.8 (8)
MDMA 15 mg kg ⁻¹	8753.5 ± 257.6 (10)	948.4 ± 19.4 (10)

Los resultados se muestran como la media ± EEM.

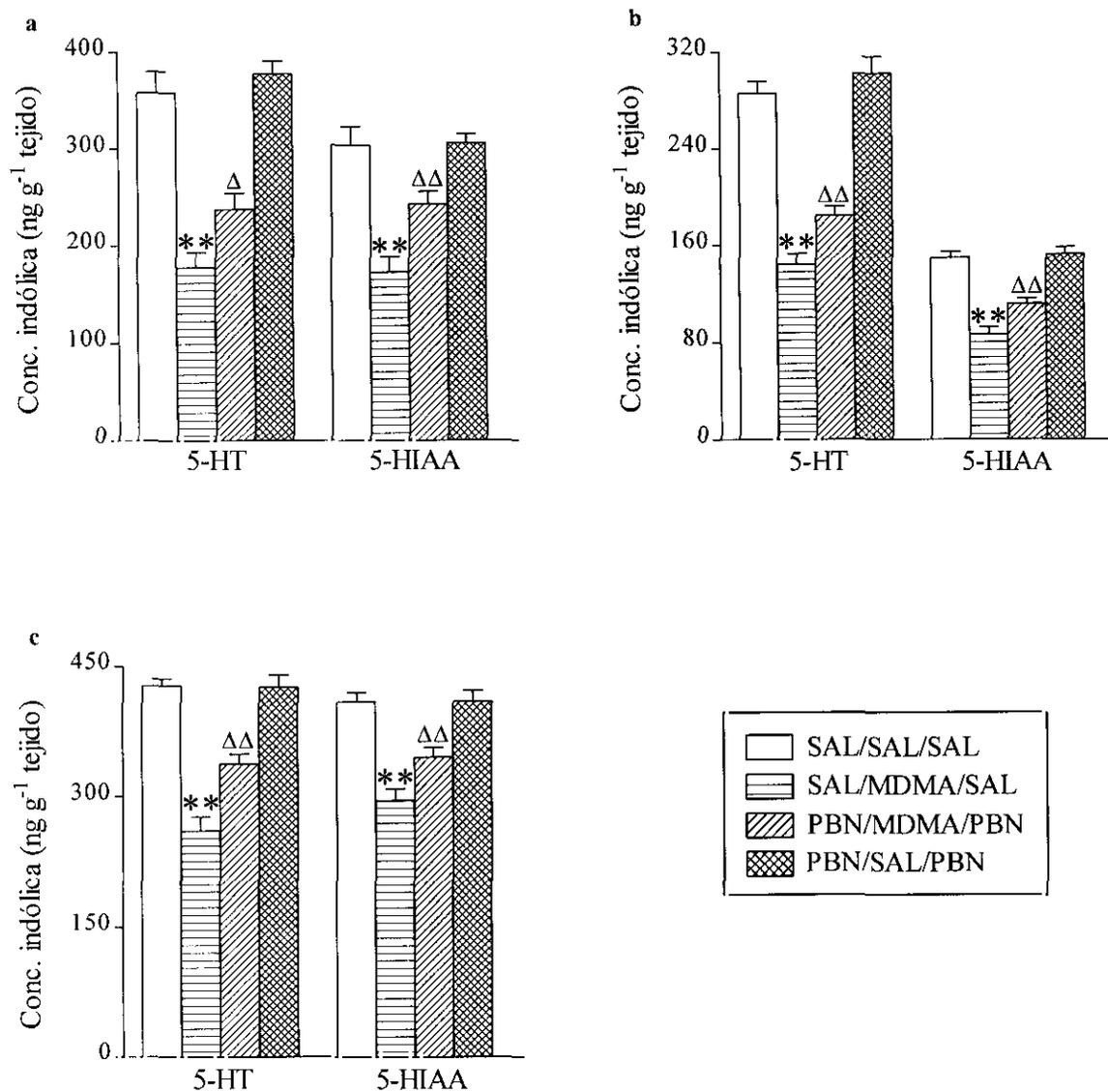


Figura 7. Efecto de la administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) o salino 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre las concentraciones indólicas (ng g⁻¹ tejido) en (a) el hipocampo, (b) la corteza y (c) el estriado 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media \pm EEM (n = 5-16). ***P* < 0.01 vs salino, ΔP < 0.05, $\Delta\Delta P$ < 0.01 vs MDMA 15 mg kg⁻¹; (Newman-Keuls).

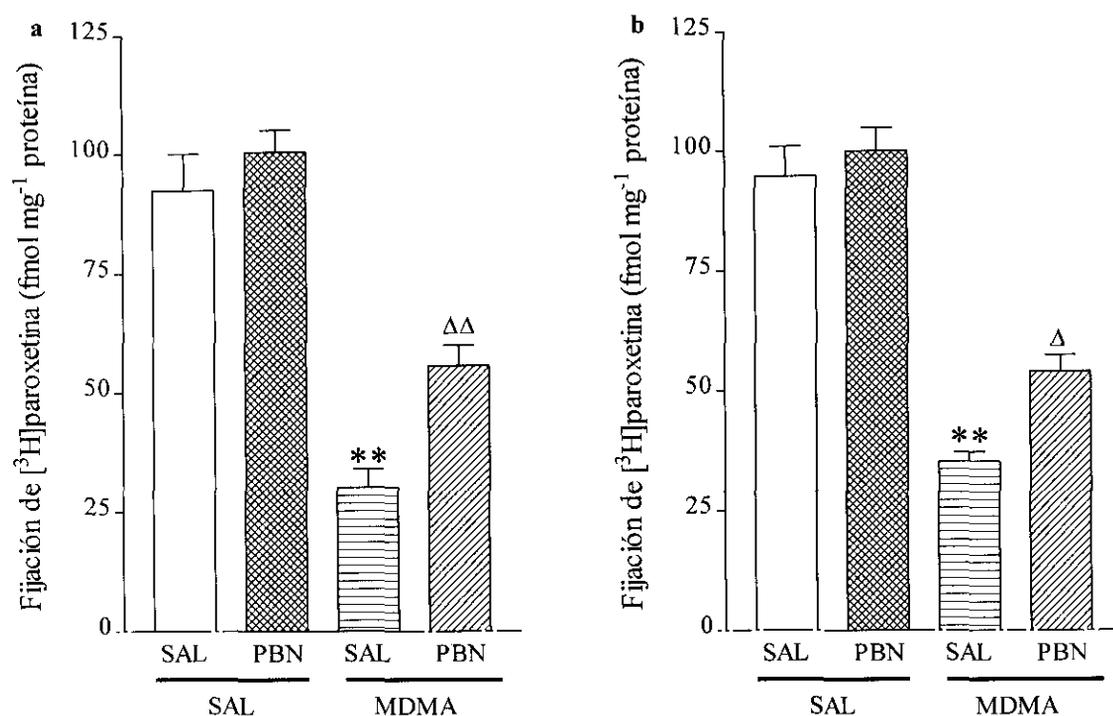


Figura 8. Efecto de la administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) o salino 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la fijación de [³H]paroxetina (fmol mg⁻¹ proteína) en la corteza cerebral (a) y en el hipocampo (b) 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-16). ***P* < 0.01 vs salino, ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01 vs MDMA 15 mg kg⁻¹; (Newman-Keuls).

Tabla 3. Efecto de la co-administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) y MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) sobre la concentración de dopamina (DA) y ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC) en el estriado 7 días después.

Tratamiento	DA (ng g ⁻¹ tejido)	DOPAC (ng g ⁻¹ tejido)
SAL/SAL/SAL	8881.7 ± 239.0 (11)	1110.6 ± 44.0 (11)
SAL/MDMA/SAL	8590.3 ± 243.9 (15)	1050.9 ± 38.5 (15)
PBN/MDMA/PBN	8440.8 ± 290.7 (16)	1041.2 ± 47.3 (16)
PBN/SAL/PBN	8838.1 ± 709.9 (5)	1087.6 ± 59.8 (5)

PBN se administró 10 min antes y 120 min después de MDMA. Los resultados se muestran como la media ± EEM.

IV.2 EFECTO DE PBN SOBRE LA TOXICIDAD AGUDA DE LA MDMA

Para evaluar los efectos agudos de la MDMA, los animales fueron sacrificados 4 h después de la administración de la droga.

IV.2.1 Efecto de MDMA sobre la concentración cerebral de 5-HT y 5-HIAA

MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) produjo una marcada disminución (74 % aproximadamente) de la concentración de 5-HT y de su metabolito, 5-HIAA en el hipocampo, estriado y corteza cerebral 4 h después de su administración (Fig. 9).

IV.2.2 Efecto de MDMA sobre la densidad de lugares de recaptación de 5-HT en corteza cerebral

La administración de MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) no modificó la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral 4 h después de su administración, puesto que no alteró la fijación de [^3H]paroxetina al transportador de 5-HT (Fig. 10).

IV.2.3 Efecto de MDMA sobre la concentración estriatal de dopamina y sus metabolitos

MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) produjo un incremento en la concentración de DA en el estriado 4 h después de su administración. No se observaron cambios significativos sobre los niveles de sus metabolitos, DOPAC y ácido homovanílico (HVA) (Fig. 11).

IV.2.4 Efecto de MDMA sobre la temperatura rectal

La temperatura rectal de las ratas se monitorizó a lo largo de las 5 horas siguientes a la administración de MDMA 5, 10 ó 15 mg kg⁻¹. MDMA produjo un aumento dosis-dependiente de la temperatura que se mantuvo a lo largo del experimento. Esta respuesta hipertérmica alcanzó un pico 1 h después de la administración de MDMA 10 ó 15 mg kg⁻¹ (Fig. 12).

IV.2.5 Efecto de PBN sobre la disminución del contenido indólico inducido por MDMA

La administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) 10 min antes y 120 min después de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) no produjo ningún cambio sobre la disminución del contenido indólico inducido por MDMA en corteza y estriado 4 h después de su administración. En hipocampo produjo un ligero pero significativo aumento de la concentración de 5-HIAA (17 %) (Fig. 9).

La administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) 10 min antes y 120 min después de salino no produjo ningún cambio en el contenido indólico cerebral en comparación con ratas tratadas con salino únicamente (Fig. 9).

IV.2.6 Efecto de PBN sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral de ratas tratadas con MDMA

La densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en ratas inyectadas con PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) 10 min antes y 120 min después de MDMA fue similar a la observada 4 h después en ratas tratadas con MDMA únicamente (Fig. 10).

La administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) 10 min antes y 120 min después de salino no produjo ningún cambio en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en comparación con ratas tratadas con salino únicamente (Fig. 10).

IV.2.7 Efecto de PBN sobre la concentración estriatal de DA y sus metabolitos en ratas tratadas con MDMA

La administración de PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) 10 min antes y 120 min después de MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) aumentó la concentración de HVA en el estriado 4 h después (Fig. 11). En estos animales no se detectó ningún cambio en la concentración de DA ni de DOPAC en comparación con la observada en ratas inyectadas con MDMA únicamente.

La administración de PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) 10 min antes y 120 min después de salino no produjo ningún cambio en el contenido catecólico estriatal en comparación con ratas tratadas con salino únicamente (Fig. 11).

IV.2.8 Efecto de PBN sobre la hipertermia inducida por MDMA

PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) administrado 10 min antes y 120 min después de MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) no modificó la respuesta hipertérmica subsiguiente a la administración de MDMA 15 mg kg^{-1} (Fig. 13).

PBN (120 mg kg^{-1}) administrado 10 min antes y 120 min después de salino produjo una respuesta hipotérmica, de tal manera que en estos animales se detectaron temperaturas rectales $3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por debajo de las observadas en animales controles (Fig. 13).

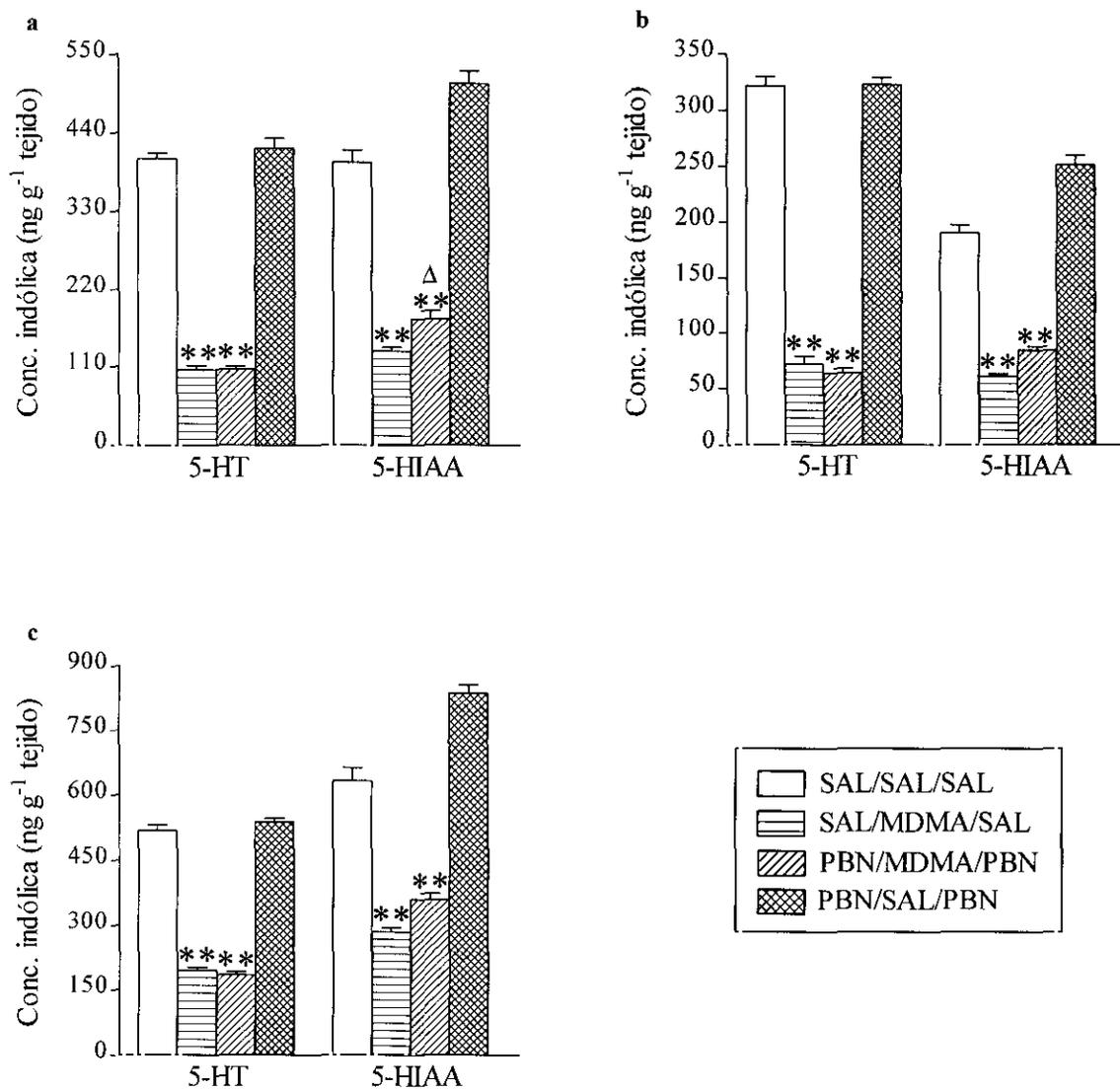


Figura 9. Efecto de la administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) o salino 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre las concentraciones indólicas (ng g⁻¹ tejido) en (a) el hipocampo, (b) la corteza y (c) el estriado 4 h después de la administración de MDMA. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-6). ***P* < 0.01 vs salino, ^Δ*P* < 0.05 vs MDMA 15 mg kg⁻¹; (Newman-Keuls).

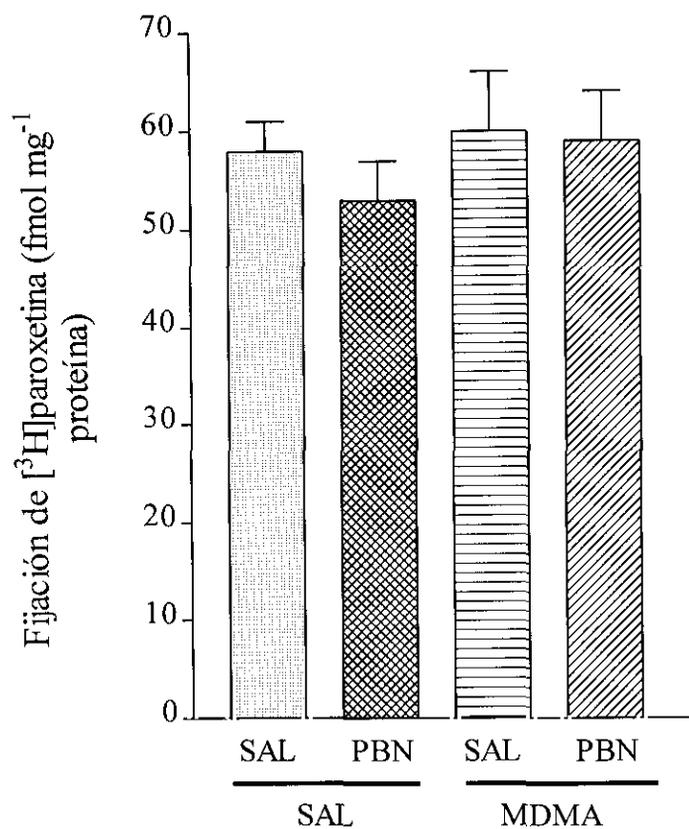


Figura 10. Efecto de la administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) o salino 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la fijación de [3H]paroxetina (fmol mg⁻¹ proteína) en la corteza cerebral 4 h después de la administración de MDMA. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-6).

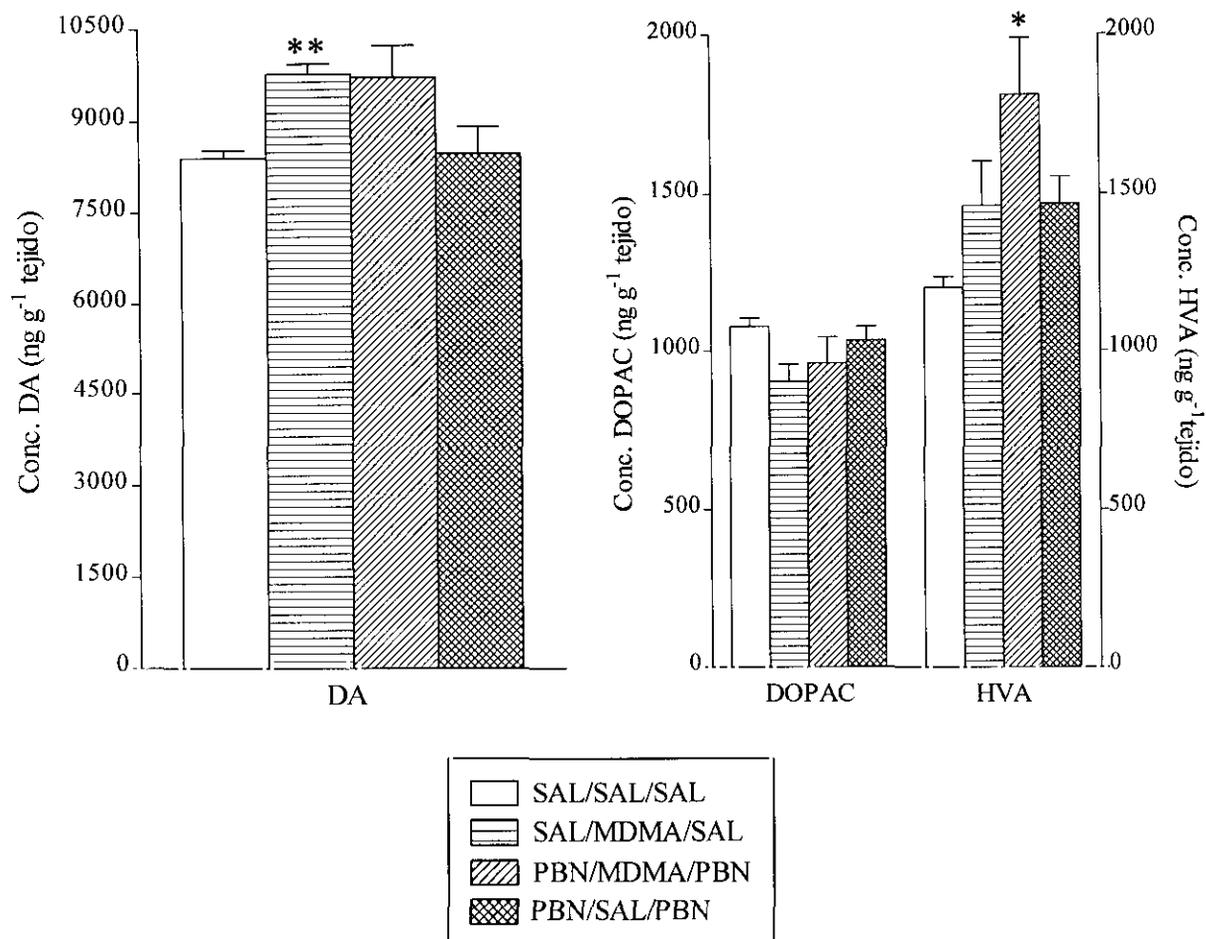


Figura 11. Efecto de la administración de PBN (120 mg kg⁻¹, i.p.) o salino 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre las concentraciones (ng g⁻¹ tejido) de DA, DOPAC y HVA en estriado 4 h después de la administración de MDMA. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-6). *P < 0.05, **P < 0.01 vs salino; (Newman-Keuls).

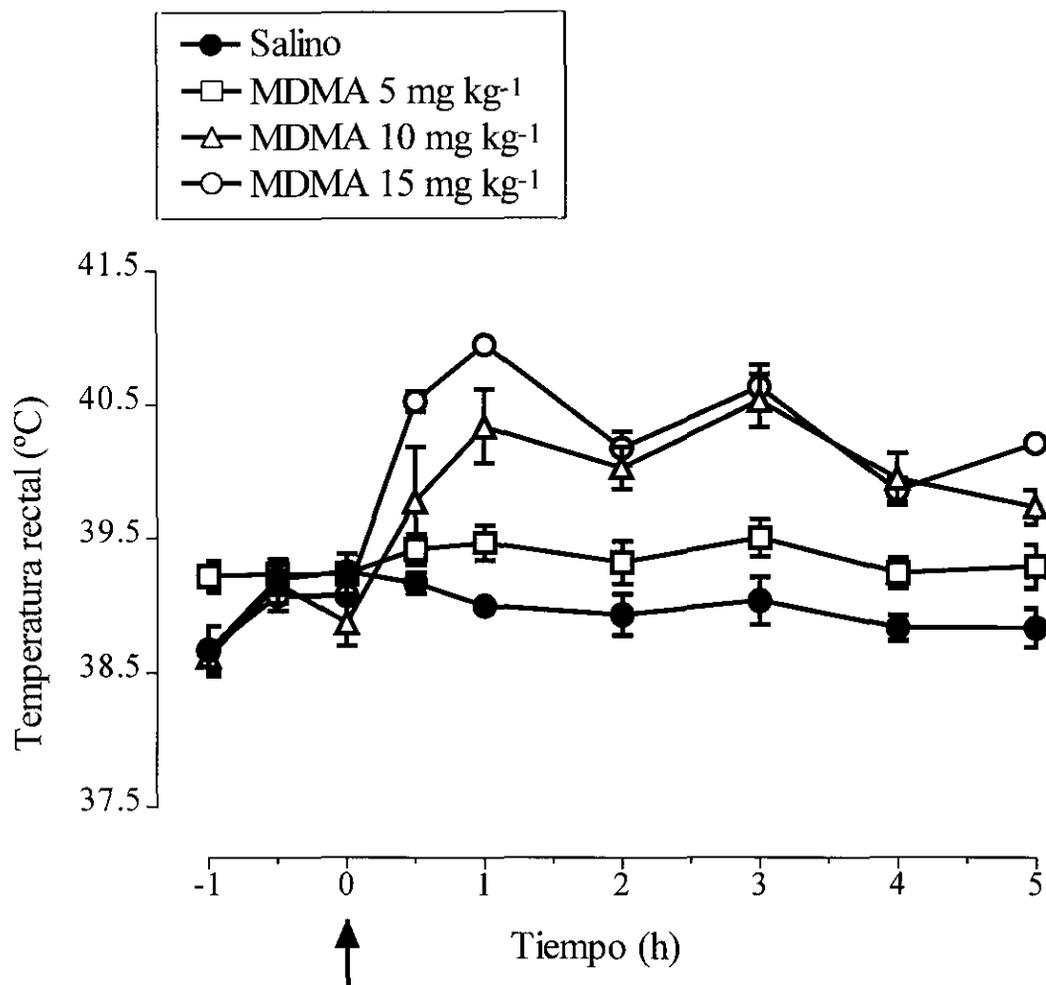


Figura 12. Efecto de la administración única de MDMA (5, 10 ó 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la temperatura rectal (°C) de las ratas. La flecha indica el momento de la inyección. Los resultados se muestran como la media \pm EEM ($n = 4-8$). No hubo diferencia entre las temperaturas basales de los animales. Tras el tratamiento hubo una diferencia significativa en la temperatura rectal de los animales ($F(3,20) = 33.55$, $P < 0.001$). La administración de MDMA 5 mg kg⁻¹ aumentó ligeramente la temperatura ($F(1,10) = 8.83$, $P < 0.05$) en comparación con salino. La administración de MDMA 10 y 15 mg kg⁻¹ produjo respuestas hipertérmicas más acusadas ($F(1,12) = 55.27$, $P < 0.001$ y $F(1,8) = 268.99$, $P < 0.001$ respectivamente); (ANOVA de 2 vías).

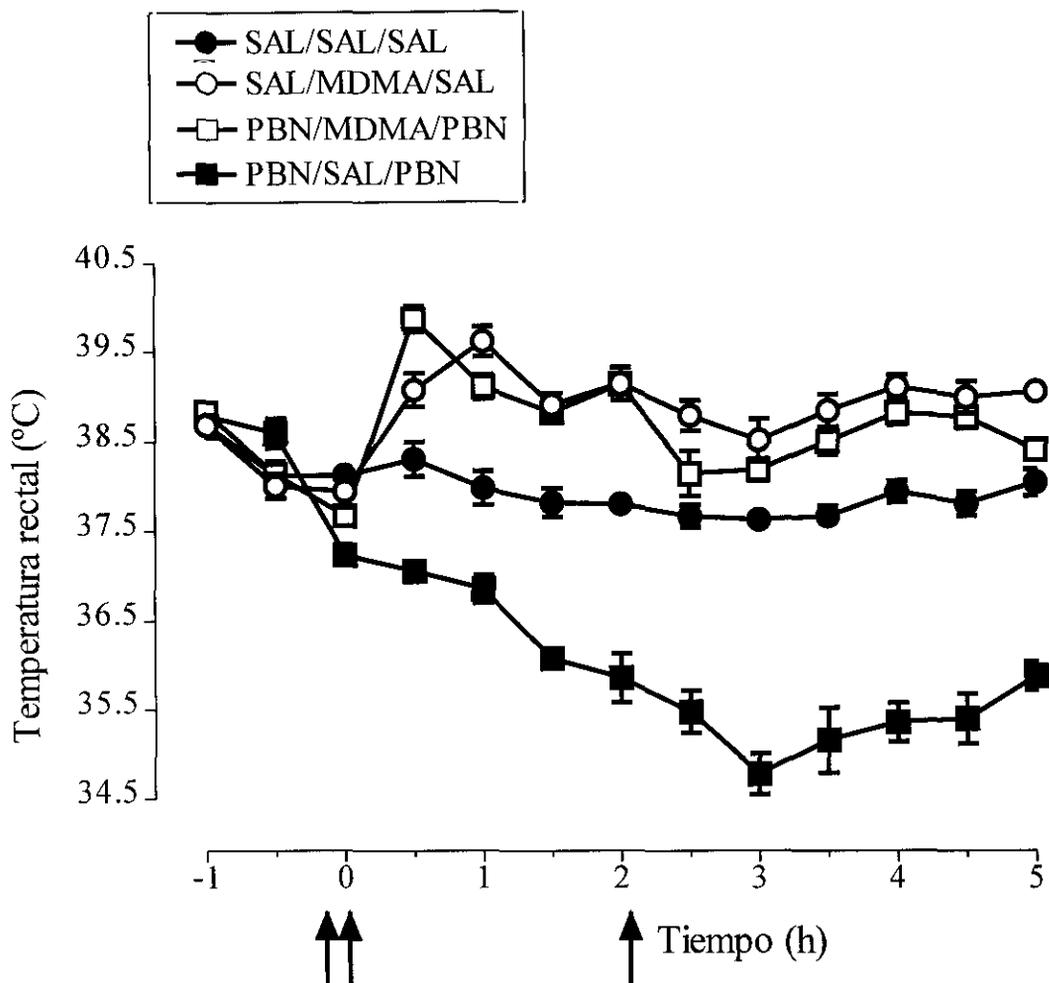


Figura 13. Efecto de la administración de PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) o salino 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) o salino sobre la temperatura rectal ($^{\circ}\text{C}$) de las ratas. Las flechas indican el momento de la inyección. Los resultados se muestran como la media \pm EEM ($n = 5-16$). No hubo diferencia en las temperaturas basales de los cuatro grupos. Tras el tratamiento hubo una diferencia significativa en la temperatura rectal de los animales ($F(3,39) = 1781.32$, $P < 0.001$). La administración de MDMA produjo una respuesta hipertérmica significativa en comparación con ratas tratadas con salino ($F(1,20) = 83.44$, $P < 0.001$). La administración de PBN a ratas tratadas con MDMA no alteró esta respuesta hipertérmica ($F(1,27) = 4.19$, n.s.). Sin embargo, la administración de PBN disminuyó significativamente la temperatura rectal de animales tratados con salino ($F(1,12) = 246.64$, $P < 0.001$); (ANOVA de 2 vías).

IV.3 FORMACIÓN DE RADICALES HIDROXILO INDUCIDA POR MDMA: EFECTO DE PBN

IV.3.1 Efecto de MDMA sobre la concentración de los ácidos 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo

La determinación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) se realizó mediante microdiálisis intracerebral *in vivo* utilizando el método atrapador del salicilato. Para ello se implantó una sonda de microdiálisis en el hipocampo que se perfundió 24 h después con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial conteniendo salicilato. La formación de los ácidos 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoicos (DHBA) se consideró un índice de la generación de radicales $\cdot\text{OH}$ (ver III.4.3.2)

La dosis de MDMA 5 mg kg⁻¹ no se utilizó en estos experimentos ya que no produjo neurotoxicidad a los 7 días de su administración. La administración de MDMA 10 mg kg⁻¹ aumentó únicamente la concentración de 2,5-DHBA (Fig. 14b). Sin embargo MDMA, a la dosis de 15 mg kg⁻¹ aumentó tanto la concentración de 2,3-DHBA como la concentración de 2,5-DHBA en el dializado (Fig. 14a,b). Este incremento, que fue aproximadamente de un 40% sobre los niveles observados en ratas tratadas con salino en el caso de 2,3-DHBA y algo menor en el caso de 2,5-DHBA, se mantuvo a lo largo del periodo de recogida de muestras (6.5 h).

IV.3.2 Efecto de MDMA sobre la temperatura rectal de ratas sometidas a diálisis

La administración de MDMA 10 mg kg⁻¹, i.p., produjo un aumento significativo en la temperatura rectal de los animales que se mantuvo a lo largo de las 6.5 h de observación (Fig. 15).

La administración de MDMA 15 mg kg⁻¹ produjo una respuesta hipertérmica mayor que alcanzó un pico máximo de 2 °C 1 h después de la inyección (Fig. 15).

IV.3.3 Efecto de PBN sobre la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo de ratas tratadas con MDMA

La administración de PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) 10 min antes y 120 min después de MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) previno el incremento de la concentración de 2,3-DHBA y 2,5-DHBA originado por la administración de MDMA 15 mg kg^{-1} en el dializado de hipocampo (Fig. 16a,b); de tal manera que los niveles de los ácidos dihidroxibenzoicos en los animales inyectados con PBN + MDMA fueron similares a los detectados en salino. No se observó ningún cambio en la concentración de 2,5-DHBA (Fig. 16b).

La administración de PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) 10 min antes y 120 min después de salino no originó ningún cambio en los niveles de 2,3-DHBA en el dializado respecto a los observados en ratas tratadas con salino (Fig. 16a,b). Sin embargo PBN produjo una ligera disminución en los niveles de 2,5-DHBA en el dializado.

IV.3.4 Efecto de PBN sobre la hipertermia inducida por MDMA en ratas sometidas a microdiálisis

PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) administrado 10 min antes y 120 min después de salino produjo una marcada hipotermia de aproximadamente 2°C por debajo de la temperatura de ratas tratadas con salino. Cuando PBN se co-administró con MDMA 15 mg kg^{-1} no modificó la respuesta hipertérmica producida por MDMA 15 mg kg^{-1} (Fig. 17).

IV.3.5 Efecto de MDMA sobre la concentración de 2,3 y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo de ratas pretratadas con fenfluramina

Grupos de ratas fueron inyectadas con fenfluramina (15 mg kg^{-1} , i.p.) o salino. Una semana más tarde se les implantó una sonda en el hipocampo y 24 horas después de la implantación se comenzó el experimento de microdiálisis (ver apartado III.4.3.4).

La administración de MDMA 15 mg kg^{-1} a ratas pretratadas con fenfluramina 15 mg kg^{-1} no modificó la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado hipocampal de rata (Fig. 18a,b) en comparación con la observada en ratas controles pretratadas con fenfluramina.

IV.3.6 Efecto de MDMA sobre la temperatura rectal de ratas pretratadas con fenfluramina

La administración de MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) a ratas pretratadas con fenfluramina (15 mg kg^{-1} , i.p.) indujo una respuesta hipertérmica significativa con respecto a ratas tratadas con salino. Sin embargo, la respuesta hipertérmica fue considerablemente menor que la inducida por MDMA en ratas no tratadas con fenfluramina (Fig. 19).

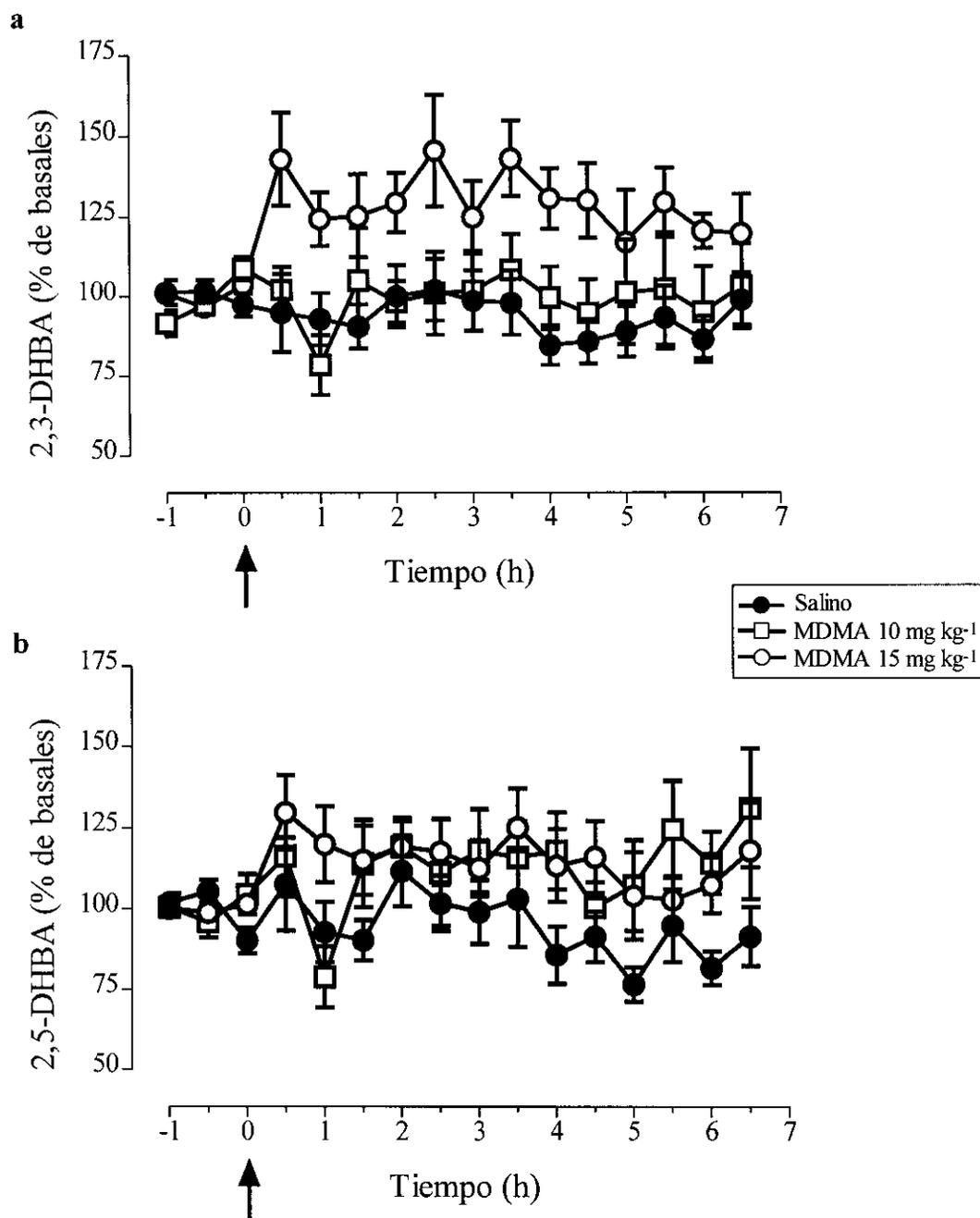


Figura 14. Efecto de la administración única de MDMA (10 ó 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la concentración de (a) ácido 2,3-dihidroxi benzoico (2,3-DHBA) y (b) ácido 2,5-dihidroxi benzoico (2,5-DHBA) en el dializado del hipocampo de rata. La flecha indica el momento de la inyección. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 3 valores antes de la administración de MDMA. Cada punto representa la media ± EEM (n = 6-11). No hubo diferencia entre las concentraciones basales de 2,3-DHBA ó 2,5-DHBA en los diferentes grupos. El tratamiento produjo un efecto significativo tanto sobre los niveles de 2,3-DHBA ($F(2,21) = 14.86$, $P < 0.001$) como sobre los niveles de 2,5-DHBA ($F(2,22) = 5.34$, $P < 0.01$). Posteriores análisis indicaron que únicamente la dosis de MDMA 15 mg kg⁻¹ aumentó significativamente la concentración de 2,3-DHBA en el dializado en comparación con salino ($F(1,17) = 28.60$, $P < 0.001$). Los niveles de 2,5-DHBA aumentaron significativamente tras la administración de ambas dosis de MDMA, 10 mg kg⁻¹ ($F(1,13) = 7.49$, $P < 0.01$) 15 mg kg⁻¹ ($F(1,17) = 9.63$, $P < 0.01$) en comparación con salino; (ANOVA de 2 vías). Niveles basales (pg μl^{-1}) de 2,3-DHBA: sal 9.55 ± 0.88 , MDMA 10 mg kg⁻¹ 9.20 ± 0.96 , MDMA 15 mg kg⁻¹ 10.77 ± 0.73 ; y 2,5-DHBA 11.52 ± 1.29 , MDMA 10 mg kg⁻¹ 11.82 ± 0.95 , MDMA 15 mg kg⁻¹ 11.01 ± 1.14 .

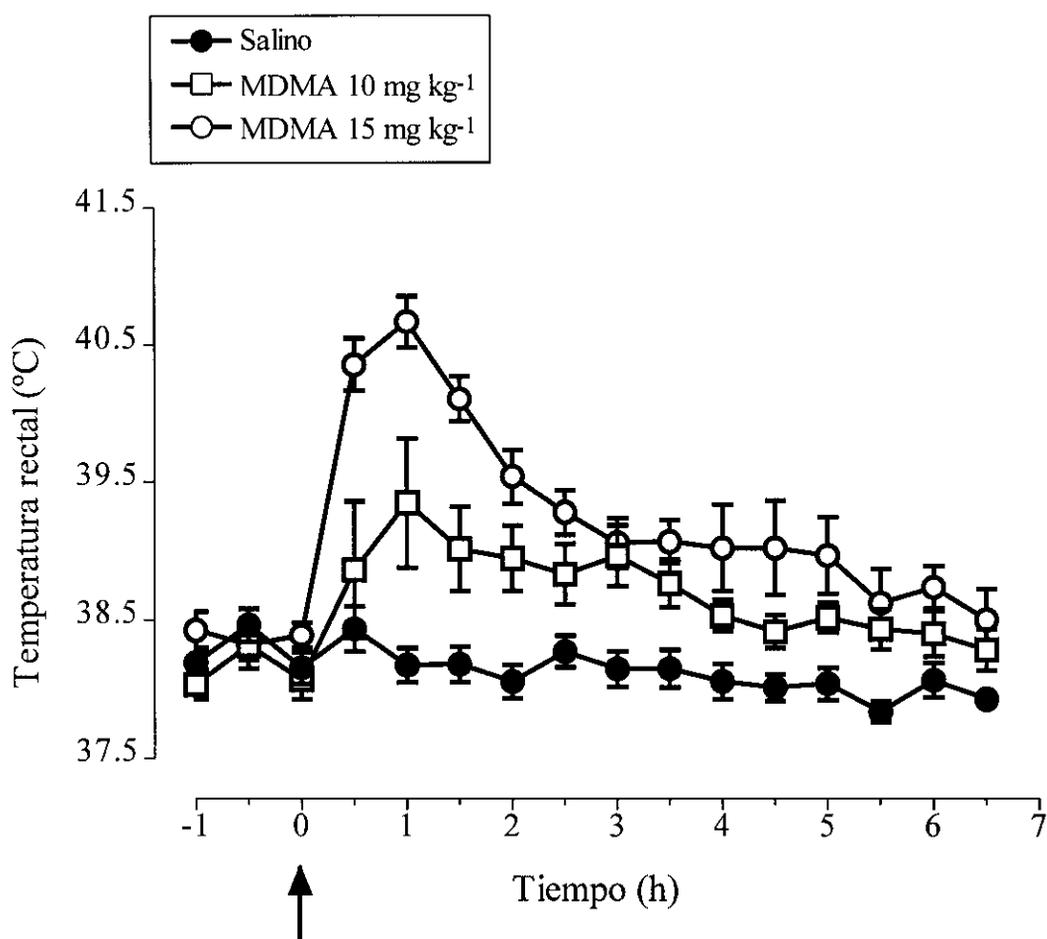


Figura 15. Efecto de la administración única de MDMA (10 ó 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la temperatura rectal (°C) de los animales sometidos a microdiálisis. La flecha indica el momento de inyección. Cada punto representa la media ± EEM (n = 6-11). No hubo diferencia entre las temperaturas basales. Tras el tratamiento hubo un aumento significativo en la temperatura rectal ($F(2,24) = 27.8$, $P < 0.001$). Ambas dosis de MDMA, 10 mg kg⁻¹ ($F(1,15) = 11.7$, $P < 0.01$) y 15 mg kg⁻¹ ($F(1,19) = 66.1$, $P < 0.001$) aumentaron la temperatura rectal en comparación con salino. La respuesta hipertérmica producida por MDMA 15 mg kg⁻¹ fue significativamente mayor que la originada por 10 mg kg⁻¹ ($F(1,14) = 7.24$, $P < 0.025$); (ANOVA de 2 vías).

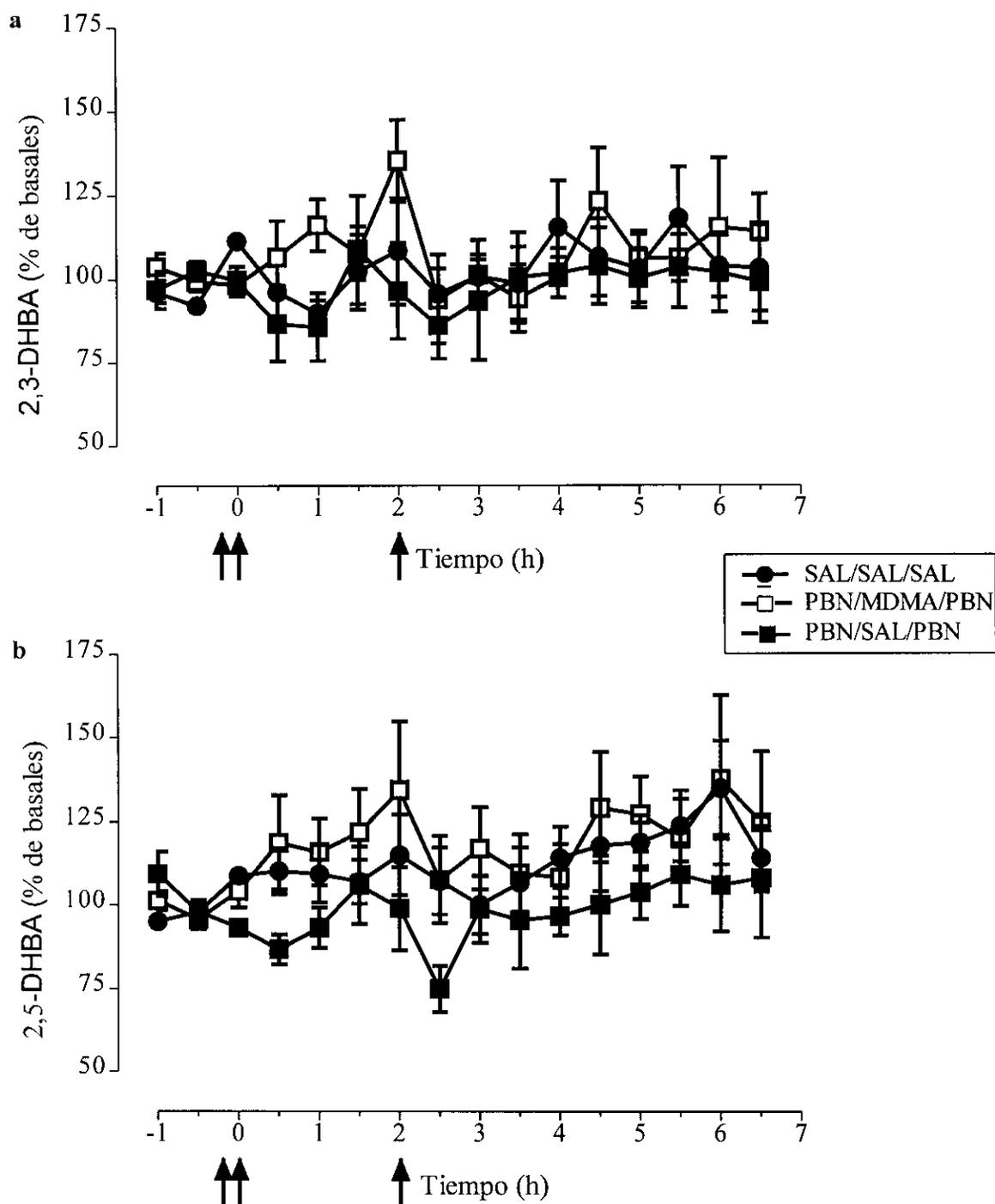


Figura 16. Efecto de la administración de salino o PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) o salino sobre la concentración de (a) 2,3-DHBA y (b) 2,5-DHBA en el dializado del hipocampo de rata. Las flechas indican los tiempos de inyección. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 3 valores antes de la administración de MDMA. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 7-11$). No hubo diferencia entre las concentraciones de 2,3-DHBA ó 2,5-DHBA de los diferentes grupos antes del tratamiento y en el caso de 2,3-DHBA, tampoco después del tratamiento. La administración de PBN disminuyó los niveles de 2,5-DHBA en el dializado de ratas tratadas con salino ($F(1,7) = 4.12$, $P < 0.05$); (ANOVA de 2 vías). Niveles basales ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) de 2,3-DHBA: SAL/SAL/SAL 8.31 ± 2.14 , PBN/MDMA/PBN 7.61 ± 0.82 , PBN/SAL/PBN 7.70 ± 1.03 ; y 2,5-DHBA: SAL/SAL/SAL 9.39 ± 2.28 , PBN/MDMA/PBN 9.39 ± 2.28 , PBN/SAL/PBN 10.06 ± 0.70 .

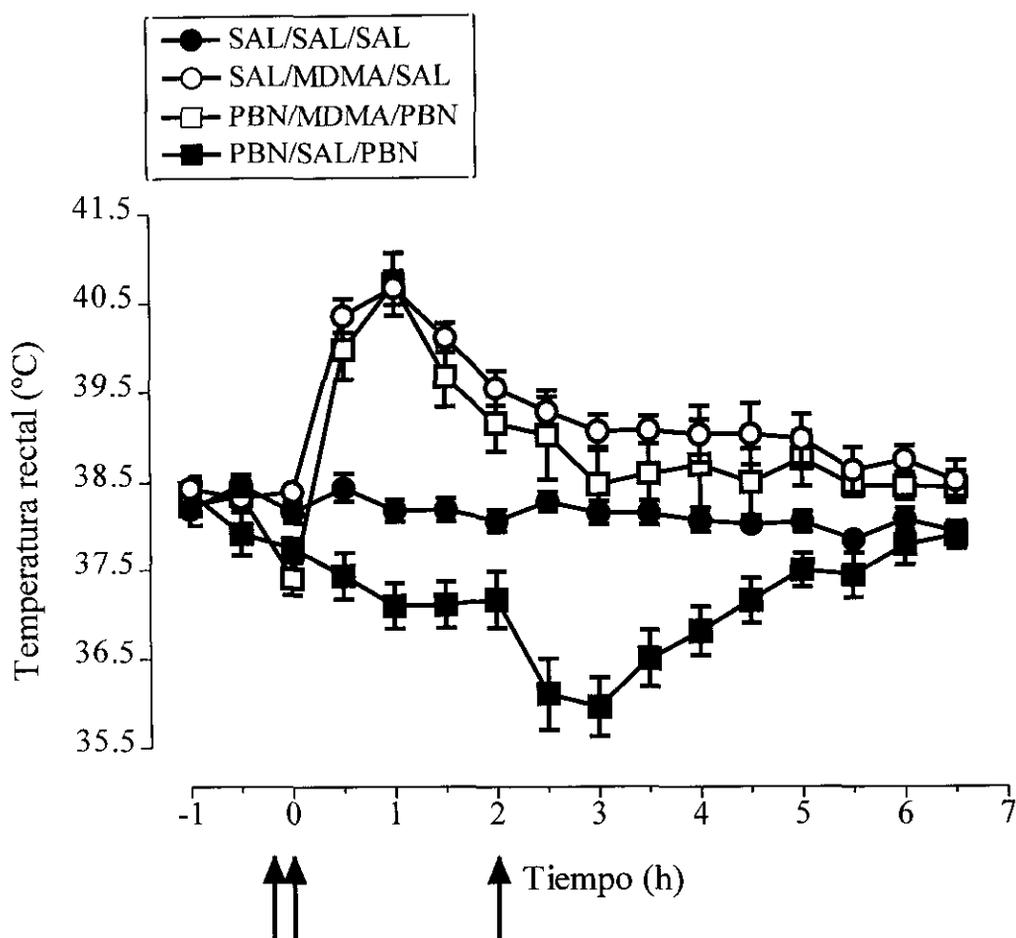


Figura 17. Efecto de la administración de PBN (120 mg kg^{-1} , i.p.) o salino 10 min antes y 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) o salino sobre la temperatura rectal ($^{\circ}\text{C}$) de animales sometidos a microdiálisis. Las flechas indican los tiempos de inyección. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 7-11$). No hubo diferencia en las temperaturas basales de los cuatro grupos. Tras el tratamiento hubo una diferencia significativa en la temperatura rectal de los animales ($F(3,29) = 28.82$, $P < 0.001$). La administración de MDMA produjo una respuesta hipertérmica significativa en comparación con ratas tratadas con salino ($F(1,14) = 30.9$, $P < 0.001$). La administración de PBN a ratas tratadas con MDMA no alteró esta respuesta hipertérmica. Sin embargo, la administración de PBN disminuyó significativamente la temperatura rectal de animales tratados con salino ($F(1,11) = 36.3$, $P < 0.001$); (ANOVA de 2 vías).

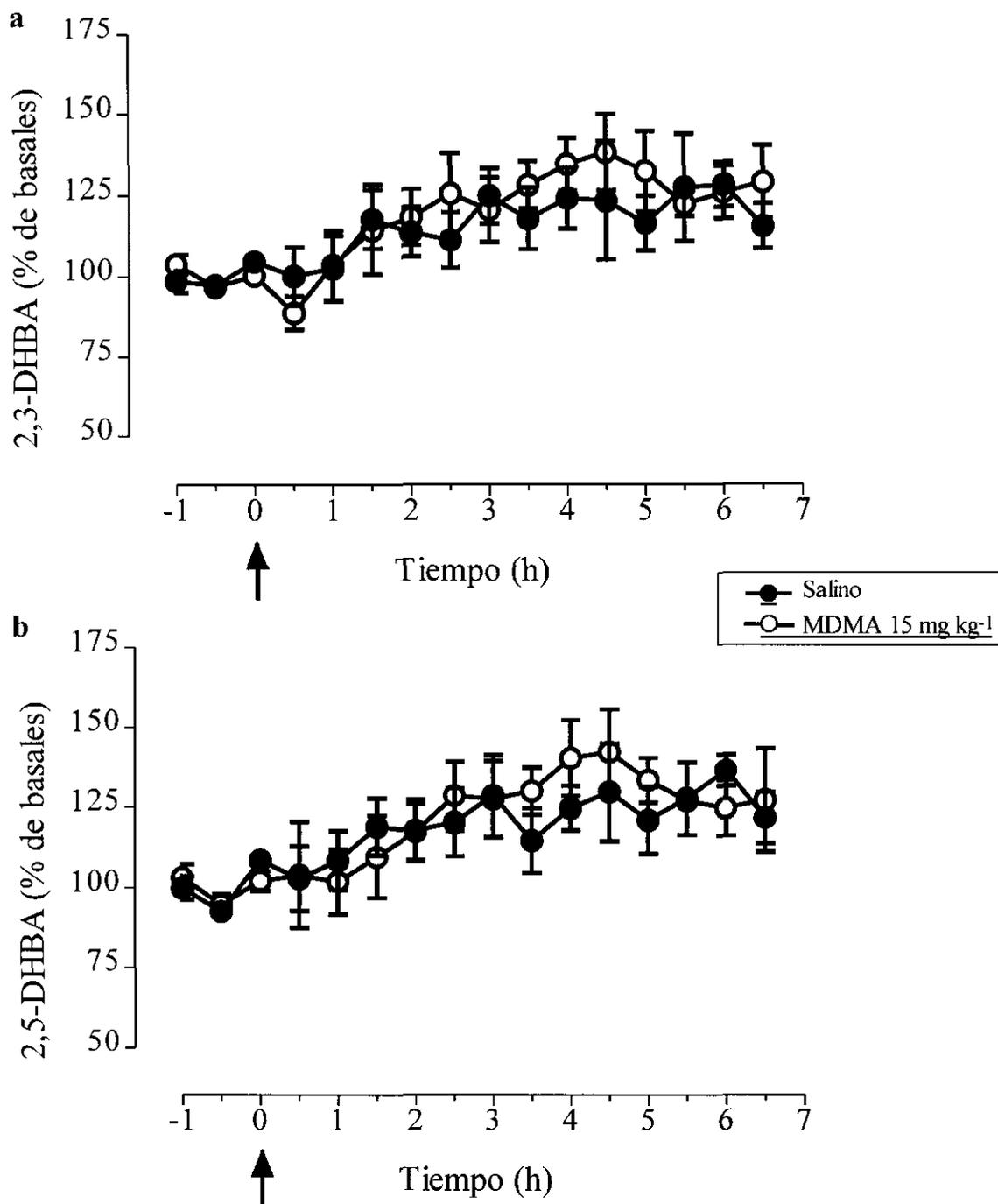


Figura 18. Efecto de la administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la concentración de (a) 2,3-DHBA y (b) 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo de rata pretratada con fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) 8 días antes. La flecha indica el tiempo de administración. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 3 valores antes de la administración de MDMA. Cada punto representa la media ± EEM (n = 6-7). No hubo diferencia en las concentraciones de 2,3-DHBA ó 2,5-DHBA de los diferentes grupos, ni antes ni después del tratamiento. Niveles basales (pg µl⁻¹) de 2,3-DHBA: sal 10.95 ± 1.45, MDMA 15 mg kg⁻¹ 9.12 ± 1.47; y 2,5-DHBA: sal 13.14 ± 1.92, MDMA 15 mg kg⁻¹ 11.04 ± 1.76.

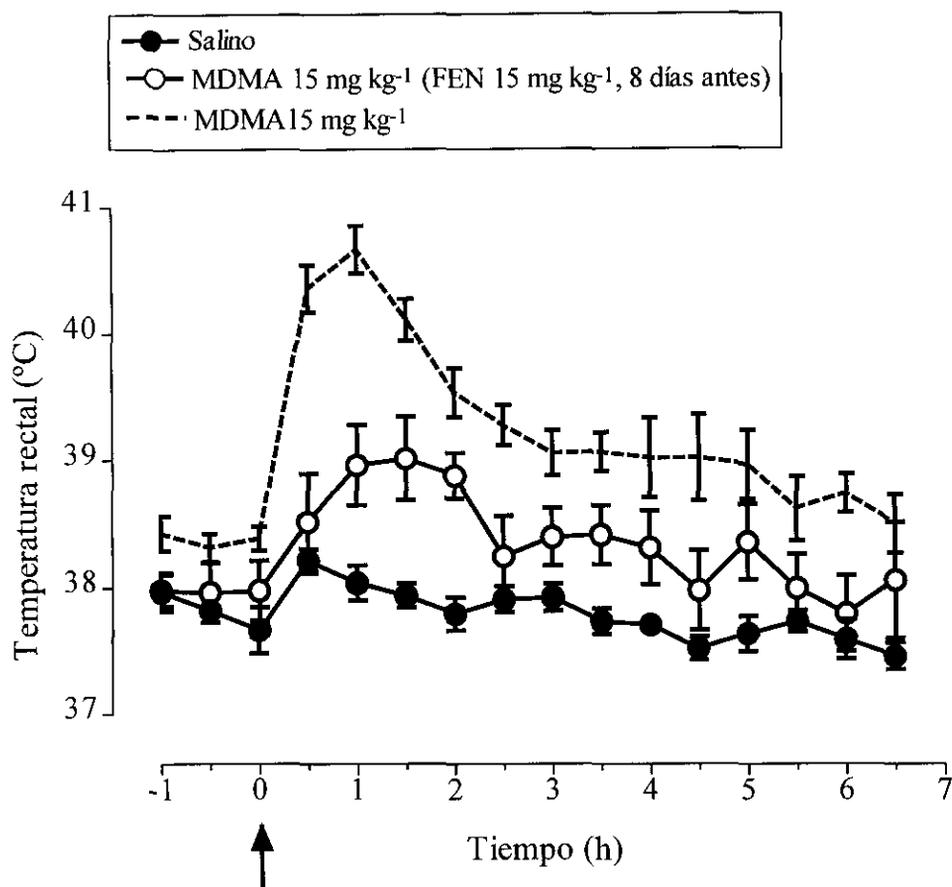


Figura 19. Efecto de la administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) sobre la temperatura rectal (°C) de los animales sometidos a microdiálisis y tratados con fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) 8 días antes. La flecha indica el tiempo de administración. Cada punto representa la media ± EEM (n = 6-7). No hubo diferencia en las temperaturas basales. La administración de MDMA produjo un aumento en la temperatura rectal de las ratas en comparación con salino ($F(1,13) = 23.8$, $P < 0.001$). No obstante, la hipertermia fue menos que la producida por MDMA en ratas controles (línea punteada) (Fig. 14); (ANOVA de 2 vías).

IV.4 FORMACIÓN DE RADICALES HIDROXILO INDUCIDA POR OTROS DERIVADOS ANFETAMÍNICOS

IV.4.1 Efecto de fenfluramina sobre la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo

La determinación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) se realizó mediante microdiálisis intracerebral *in vivo* utilizando el método atrapador del salicilato. Para ello se implantó una sonda de microdiálisis en el hipocampo que se perfundió 24 h después con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial conteniendo salicilato. La formación de los ácidos 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoicos (DHBA) se consideró un índice de la generación de radicales $\cdot\text{OH}$ (ver III.4.3.2)

La administración de fenfluramina (15 mg kg^{-1} , i.p.) no originó ningún cambio en las concentraciones de 2,3-DHBA y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo en comparación con salino (Fig. 20a,b).

IV.4.2 Efecto de fenfluramina sobre la temperatura rectal de ratas sometidas a microdiálisis

La temperatura rectal de los animales tratados con fenfluramina (15 mg kg^{-1} , i.p.) fue similar a la observada en ratas inyectadas con salino (Fig. 21).

IV.4.3 Efecto de p-cloroanfetamina sobre la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo

La determinación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) se realizó mediante microdiálisis intracerebral *in vivo* utilizando el método atrapador del salicilato. Para ello se implantó una sonda de microdiálisis en el hipocampo que se perfundió 24 h después con líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial conteniendo salicilato. La formación de los ácidos 2,3- y 2,5-

dihidroxibenzoicos (DHBA) se consideró un índice de la generación de radicales $\cdot\text{OH}$ (ver III.4.3.2)

La administración de PCA (5 mg kg^{-1} , i.p.) produjo un aumento significativo tanto en la concentración de 2,3-DHBA como en la concentración de 2,5-DHBA en el dializado que comenzó 2 h después de su administración y se mantuvo durante 4.5 h (Fig. 22a,b).

IV.4.4 Efecto de p-cloroanfetamina sobre la temperatura rectal de ratas sometidas a microdiálisis

La temperatura rectal de los animales aumentó rápidamente tras la administración de PCA (5 mg kg^{-1} , i.p.) alcanzando un pico máximo de hipertermia 1 h después de la inyección (Fig. 23).

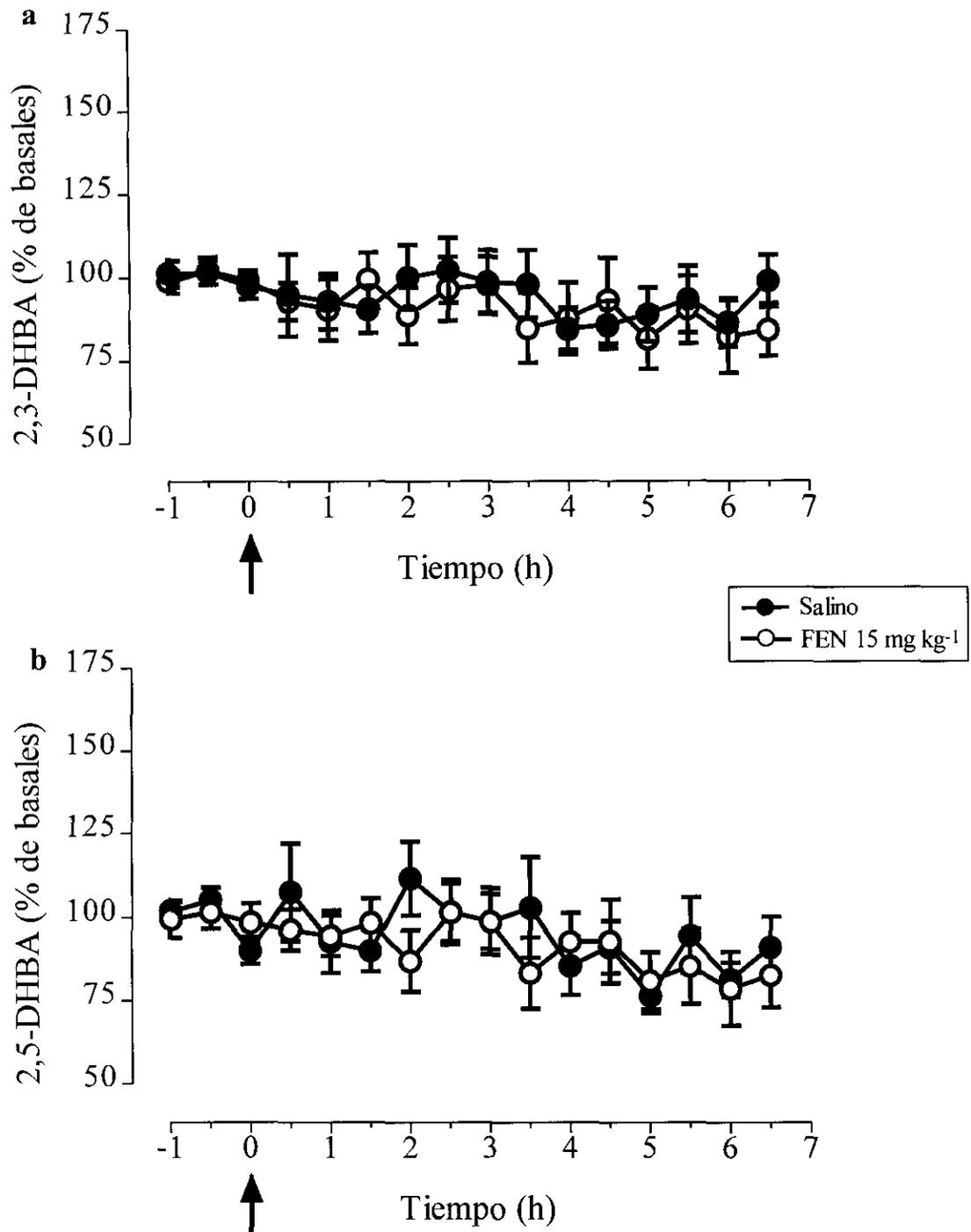


Figura 20. Efecto de la administración de fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la concentración de (a) 2,3-DHBA y (b) 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo de rata. La flecha indica el tiempo de administración. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 3 valores antes de la administración de MDMA. Cada punto representa la media \pm EEM (n = 9-11). No hubo diferencia entre las concentraciones de 2,3-DHBA ó 2,5-DHBA de ambos grupos, ni antes ni después del tratamiento. Niveles basales (pg μ l⁻¹) de 2,3-DHBA: sal 9.55 \pm 0.88, FEN 15 mg kg⁻¹ 9.42 \pm 0.53; y 2,5-DHBA: sal 11.52 \pm 1.29, FEN 15 mg kg⁻¹ 9.09 \pm 0.59.

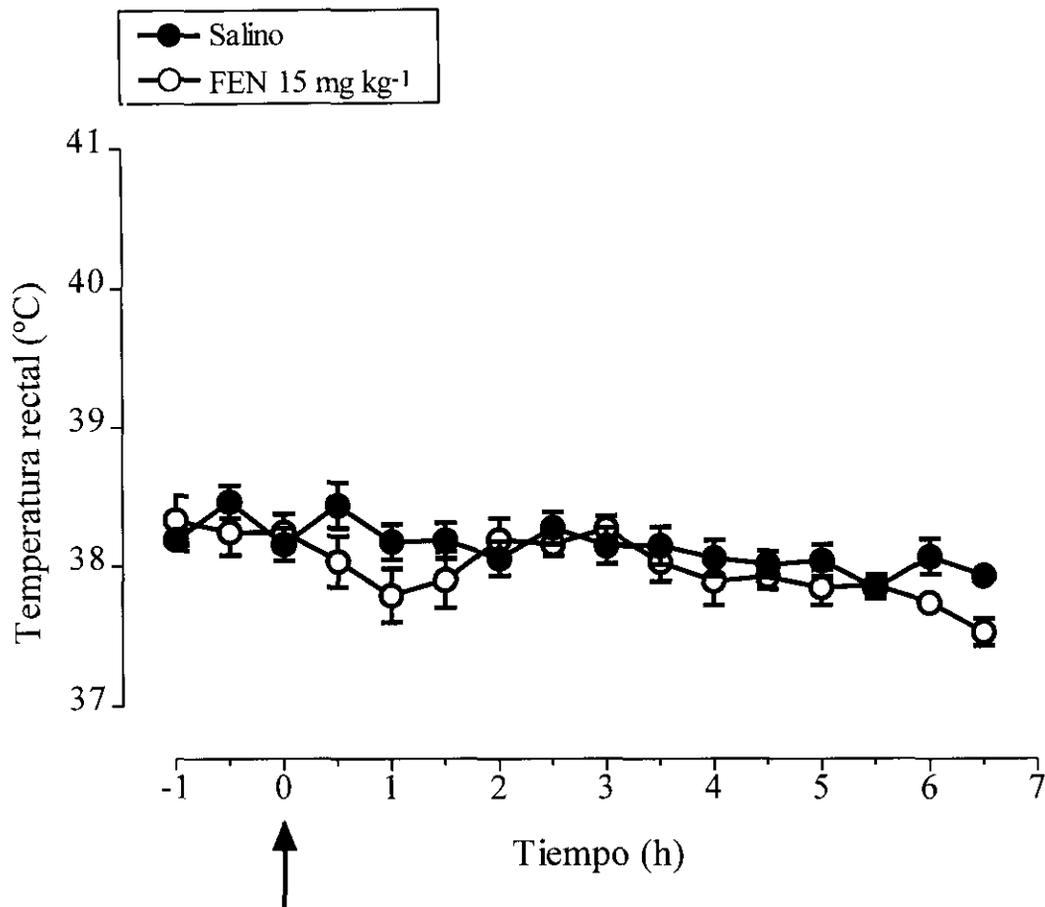


Figura 21. Efecto de la administración de fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la temperatura rectal (°C) de ratas sometidas a microdiálisis. La flecha indica el tiempo de administración. Cada punto representa la media ± EEM (n = 9-11). No hubo diferencia entre los tratamientos.

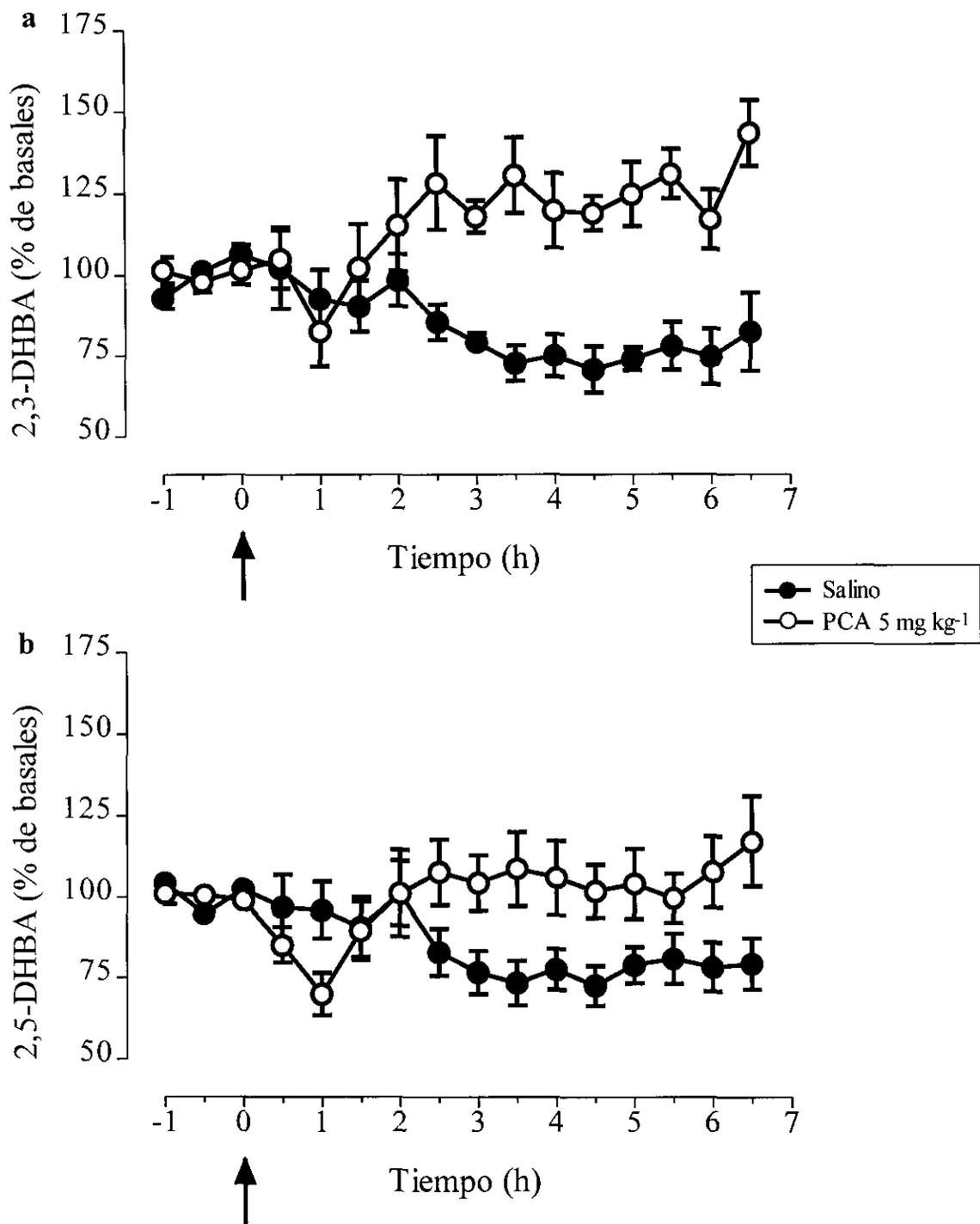


Figura 22. Efecto de la administración de *p*-cloroanfetamina (PCA, 5 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la concentración de (a) 2,3-DHBA y (b) 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo de rata. La flecha indica el tiempo de administración. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 3 valores antes de la administración de MDMA. Cada punto representa la media ± EEM (n = 9). No hubo diferencia en las concentraciones basales de 2,3-DHBA ó 2,5-DHBA en ambos grupos. PCA aumentó los niveles de 2,3-DHBA (F(1,15) = 36.17, P < 0.001) y 2,5-DHBA (F(1,18) = 8.83, P < 0.01) en el dializado; (ANOVA de 2 vías). Niveles basales (pg µl⁻¹) de 2,3-DHBA: sal 8.10 ± 0.53, PCA 5 mg kg⁻¹ 7.81 ± 0.77; y 2,5-DHBA: sal 9.99 ± 0.58, PCA 5 mg kg⁻¹ 10.03 ± 1.06.

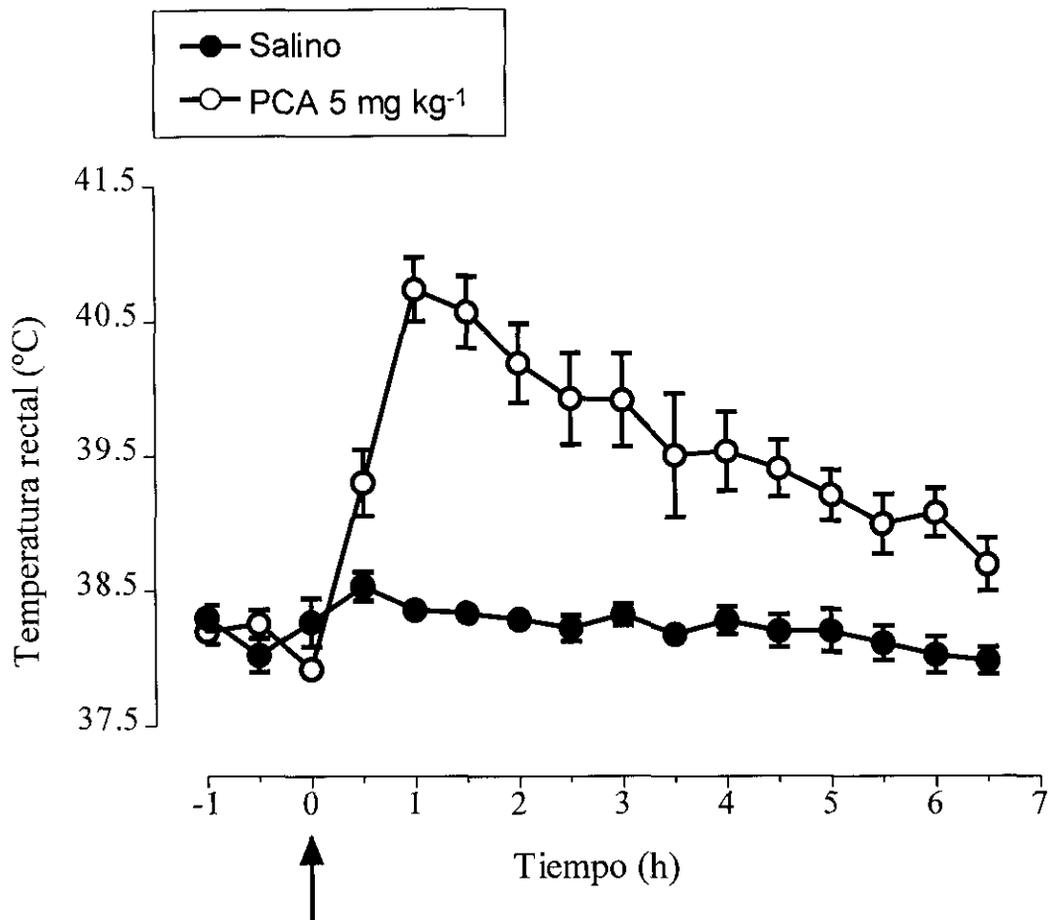


Figura 23. Efecto de la administración de *p*-cloroanfetamina (PCA, 5 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la temperatura rectal (°C) de animales sometidos a microdiálisis intracerebral *in vivo*. La flecha indica el tiempo de administración. Cada punto representa la media ± EEM (n = 9). No hubo diferencia en las temperaturas basales. La administración de PCA aumentó significativamente la temperatura rectal de los animales ($F(1,16) = 51.22$, $P < 0.001$); (ANOVA de 2 vías).

IV.5 NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR OTROS DERIVADOS ANFETAMÍNICOS A LARGO PLAZO

Para evaluar los efectos neurotóxicos de fenfluramina y *p*-cloroanfetamina, los animales fueron sacrificados 7 días después de la administración de estos derivados anfetamínicos.

IV.5.1 Efecto de fenfluramina sobre la concentración cerebral de 5-HT y 5-HIAA

Siete días después de la administración de fenfluramina (15 mg kg⁻¹ i.p.) se observó una disminución significativa de la concentración de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo, la corteza y el estriado en comparación con ratas tratadas con salino (Fig. 24).

IV.5.2 Efecto de fenfluramina sobre la densidad de lugares de recaptación de 5-HT en corteza cerebral

Fenfluramina (15 mg kg⁻¹, i.p.) produjo una marcada disminución de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral de las ratas, 7 días después de su administración en comparación con ratas tratadas con salino (Fig. 25).

IV.5.3 Efecto de fenfluramina sobre la concentración estriatal de DA y DOPAC

No se observó ningún cambio en los niveles de DA ni de DOPAC en el estriado, 7 días después de la administración de fenfluramina (15 mg kg⁻¹, i.p.) (Tabla 4).

IV.5.4 Efecto de fenfluramina sobre la temperatura rectal

La temperatura rectal de los animales tratados con fenfluramina (15 mg kg⁻¹, i.p.) fue similar a la observada en ratas tratadas con salino durante las 5 h siguientes a la inyección (Fig. 26).

IV.5.5 Efecto de p-cloroanfetamina sobre la concentración cerebral de 5-HT y 5-HIAA

Siete días después de la administración de *p*-cloroanfetamina (PCA, 5 mg kg⁻¹ i.p.) se observó una disminución significativa de la concentración de 5-HT y 5-HIAA en el hipocampo, la corteza y el estriado en comparación con ratas tratadas con salino (Fig. 27).

IV.5.6 Efecto de p-cloroanfetamina sobre la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral

PCA (5 mg kg⁻¹, i.p.) produjo una marcada disminución de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral 7 días después de su administración en comparación con ratas inyectadas con salino (Fig. 28).

IV.5.7 Efecto de p-cloroanfetamina sobre la concentración estriatal de DA y DOPAC

No se observó ningún cambio en los niveles de DA ni de DOPAC en el estriado 7 días después de la administración de PCA (5 mg kg⁻¹, i.p.) (Tabla 5).

IV.5.8 Efecto de p-cloroanfetamina sobre la temperatura rectal

PCA (5 mg kg^{-1} , i.p.) produjo una marcada hipertermia que alcanzó un pico máximo 1 h después de su administración y se mantuvo a lo largo de la 5 horas siguientes a la inyección (Fig. 29).

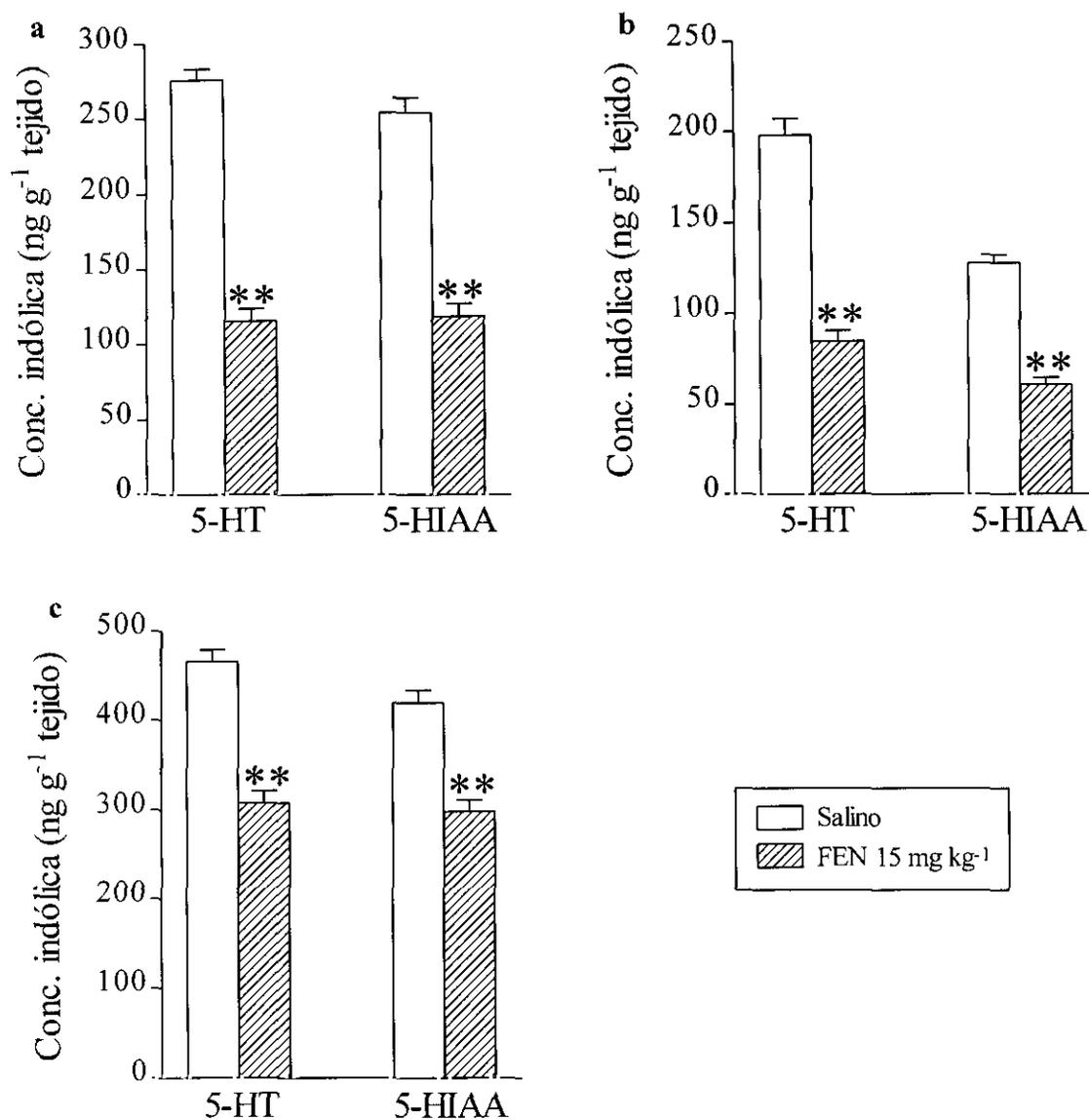


Figura 24. Efecto de la administración de fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) sobre las concentraciones indólicas (ng g⁻¹ tejido) en (a) el hipocampo, (b) la corteza y (c) el estriado 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 4-5). ***P* < 0.01 vs salino; (Newman-Keuls).

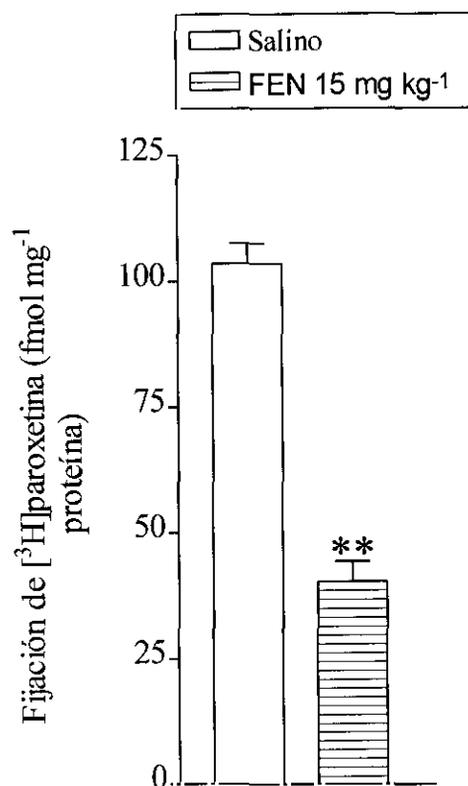


Figura 25. Efecto de la administración de fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la fijación de [³H]paroxetina en la corteza cerebral 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 6). ***P* < 0.01 vs salino; (Newman-Keuls).

Tabla 4. Efecto de fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) sobre la concentración de DA y DOPAC en el estriado 7 días después del tratamiento.

Tratamiento	DA (ng g ⁻¹ tejido)	DOPAC (ng g ⁻¹ tejido)
Salino	7579.0 ± 133.8 (10)	1019.8 ± 46.1 (10)
FEN 15 mg kg ⁻¹	8271.9 ± 234.1 (11)	1171.5 ± 66.0 (11)

Los resultados se muestran como la media ± EEM.

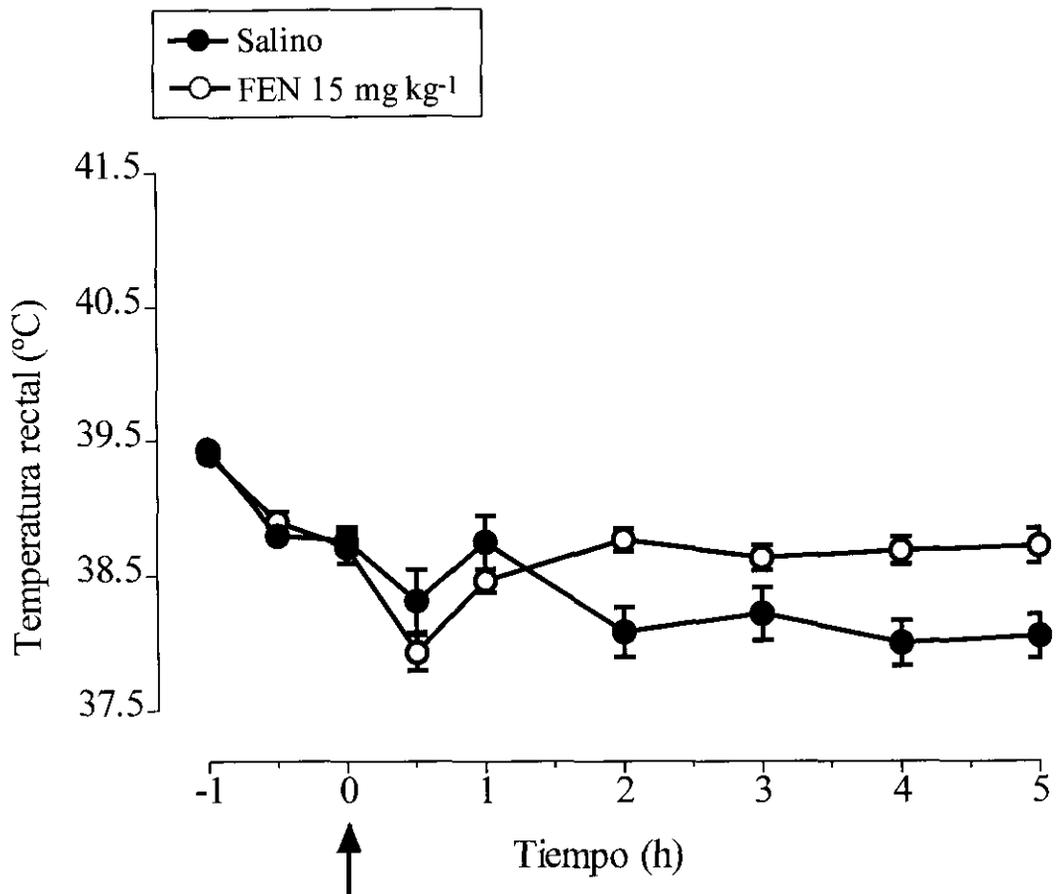


Figura 26. Efecto de la administración de fenfluramina (FEN, 15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la temperatura rectal (°C) de los animales. La flecha indica el tiempo de administración. Cada punto representa la media ± EEM (n = 6). No hubo diferencia entre los tratamientos.

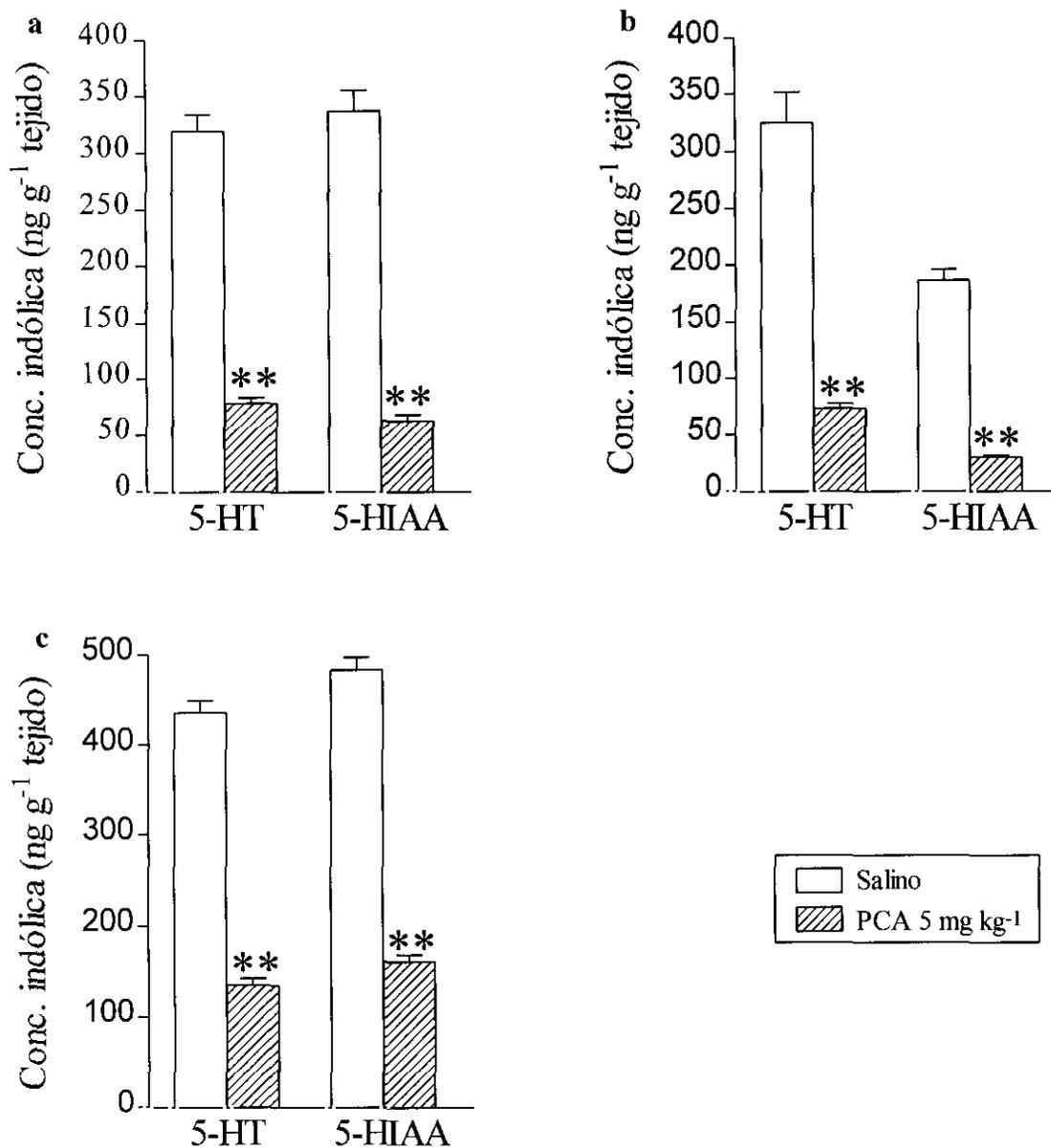


Figura 27. Efecto de la administración de *p*-cloroanfetamina (PCA, 5 mg kg⁻¹, i.p.) sobre las concentraciones indólicas (ng g⁻¹ tejido) (a) el hipocampo, (b) la corteza y (c) el estriado 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 6-7). ***P* < 0.01 vs salino; (Newman-Keuls).

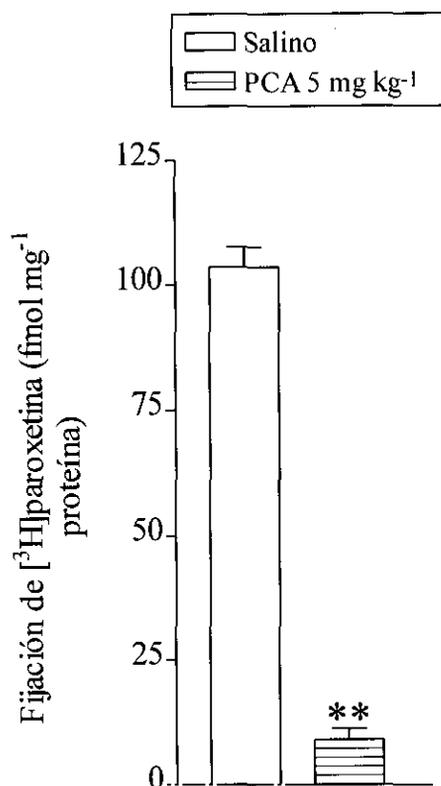


Figura 28. Efecto de la administración de *p*-cloroanfetamina (PCA, 5 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la fijación de [³H]paroxetina en la corteza cerebral 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 6-7). ***P* < 0.01 vs salino; (Newman-Keuls).

Tabla 5. Efecto de *p*-cloroanfetamina (PCA, 5 mg kg⁻¹, i.p.) sobre la concentración de DA y DOPAC en el estriado 7 días después del tratamiento.

Tratamiento	DA (ng g ⁻¹ tejido)	DOPAC (ng g ⁻¹ tejido)
Salino	7672.7 ± 1202.1 (6)	1283.4 ± 74.5 (6)
PCA 5 mg kg ⁻¹	7667.7 ± 254.9 (7)	1243.0 ± 45.9 (7)

Los resultados se muestran como la media ± EEM.

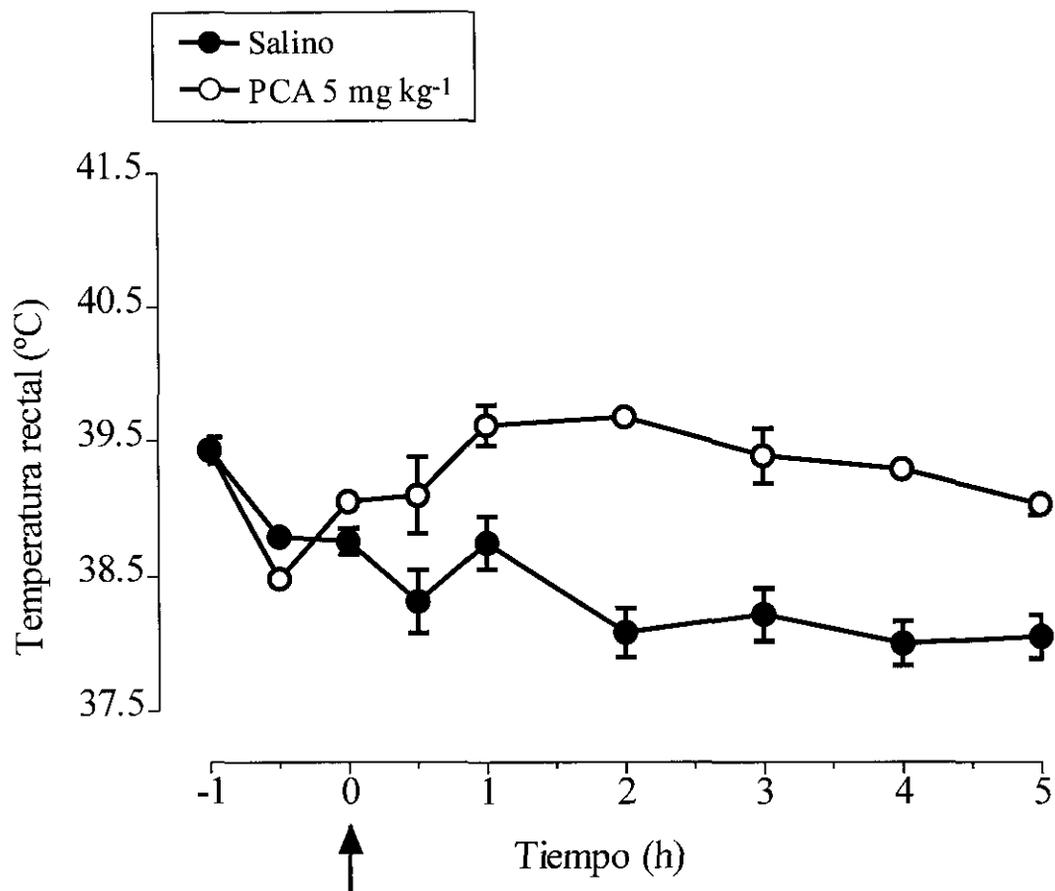


Figura 29. Efecto de la administración de *p*-cloroanfetamina (PCA, 5 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre la temperatura rectal (°C) de los animales. La flecha indica el tiempo de administración. Cada punto representa la media ± EEM (n = 6-7). No hubo diferencia en la temperaturas basales. La administración de PCA aumentó la temperatura rectal de los animales ($F(1,11) = 37.25$, $P < 0.001$); (ANOVA de 2 vías).

IV.6 EFECTO DE L-3,4-DIHIDROXIFENIL ALANINA (L-DOPA) EN RATAS TRATADAS CON MDMA

IV.6.1 Efecto de L-DOPA sobre la formación de 2,3-DHBA y 2,5-DHBA inducida por MDMA en el hipocampo

La administración de MDMA 15 mg kg^{-1} , i.p. produjo un aumento significativo tanto de la concentración de 2,3-DHBA como de la concentración de 2,5-DHBA en el dializado de hipocampo que se mantuvo durante al menos 6.5 h después de la administración de la droga. Cuando se administró L-DOPA (25 mg kg^{-1} , i.p. + benserazida 6.25 mg kg^{-1} , i.p.) 120 min después de la inyección de MDMA, no se observó ninguna modificación en el contenido de 2,3-DHBA ó 2,5-DHBA del dializado en comparación con ratas tratadas con MDMA únicamente (Fig. 30a,b).

IV.6.2 Efecto de L-DOPA sobre los efectos neurotóxicos inducidos por MDMA

MDMA 15 mg kg^{-1} i.p., una semana después de su administración, produjo una marcada disminución de los niveles de 5-HT y de su metabolito, 5-HIAA en hipocampo, estriado y corteza cerebral (Fig. 31) y una reducción de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral de rata (Fig. 32). La administración de L-DOPA (25 mg kg^{-1} , i.p. + benserazida 6.25 mg kg^{-1} , i.p.) 120 min después de la inyección de MDMA no modificó la disminución en los parámetros serotoninérgicos mencionados inducida por MDMA (Fig. 31, 32).

IV.6.3 Efecto de L-DOPA sobre la concentración de DA y sus metabolitos en el dializado estriatal de ratas tratadas con MDMA

La administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) produjo un aumento de la concentración de DA en el dializado estriatal de aproximadamente el 650 %, inmediatamente después de la inyección (Fig. 33). Se observó también una marcada disminución en los niveles de DOPAC (70 % aproximadamente) y HVA (68 % aproximadamente), alcanzando valores mínimos a los 60 y 120 min, respectivamente, de la administración de la droga (Fig. 34a,b).

La administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 120 min después de la administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) produjo un segundo pico de liberación de dopamina 1 h después de la administración de L-DOPA. Este segundo pico (450 % aproximadamente) fue mucho menor que el primero inducido por la administración de MDMA (Fig. 33). L-DOPA fue capaz de revertir la disminución de la concentración de DOPAC y HVA inducida por MDMA en el dializado estriatal (Fig. 34a,b).

IV.6.4 Efecto de L-DOPA sobre la hipertermia inducida por MDMA

La administración de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) produjo una respuesta hipertérmica aguda, alcanzando un pico máximo de aproximadamente 2°C 1 h después de la administración. La administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 120 min después de la administración de MDMA, produjo un segundo pico hipertérmico a los 30 min de su administración (Fig. 35, 36).

IV.6.5 Efecto de la administración de L-DOPA con una dosis no tóxica de MDMA

En esta serie de experimentos las ratas fueron inyectadas con L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 30 min antes que MDMA a una dosis no tóxica (5 mg kg⁻¹, i.p.) para investigar si el pretratamiento con el aminoácido desencadenaba la toxicidad de la droga.

IV.6.5.1 Efecto de L-DOPA sobre diversos parámetros serotoninérgicos en ratas tratadas con MDMA

La administración de MDMA 5 mg kg⁻¹ no produjo ningún cambio en el contenido indólico de la corteza cerebral pero sí en el hipocampo y estriado donde produjo una ligera disminución en el contenido de 5-HIAA. Tampoco produjo cambio en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT de la corteza cerebral (ver apartados IV.1.1 y IV.1.2).

La administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 30 min antes de la administración de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) no produjo ninguna modificación en el contenido indólico respecto al observado en ratas tratadas con MDMA 5 mg kg⁻¹ únicamente (Fig. 37). Tampoco se detectó ningún cambio en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT en la corteza cerebral con este tratamiento (Fig. 38).

IV.6.5.2 Efecto de L-DOPA sobre la concentración de DA y sus metabolitos en dializado estriatal de ratas tratadas con MDMA

La administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 30 min antes de la administración de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) no modificó el incremento en la concentración de dopamina inducido por MDMA (Fig. 39). Sin embargo, produjo marcados incrementos en las concentraciones de DOPAC y HVA en el dializado estriatal en lugar de las disminuciones inducidas por MDMA (Fig. 40a,b).

IV.6.5.3 Efecto de L-DOPA sobre la hipertermia inducida por MDMA

La administración de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) produjo un ligero aumento en la temperatura rectal de los animales (Fig. 41). La administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 30 min antes de la administración de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) no modificó la respuesta hipertérmica inducida por MDMA (Fig. 41)

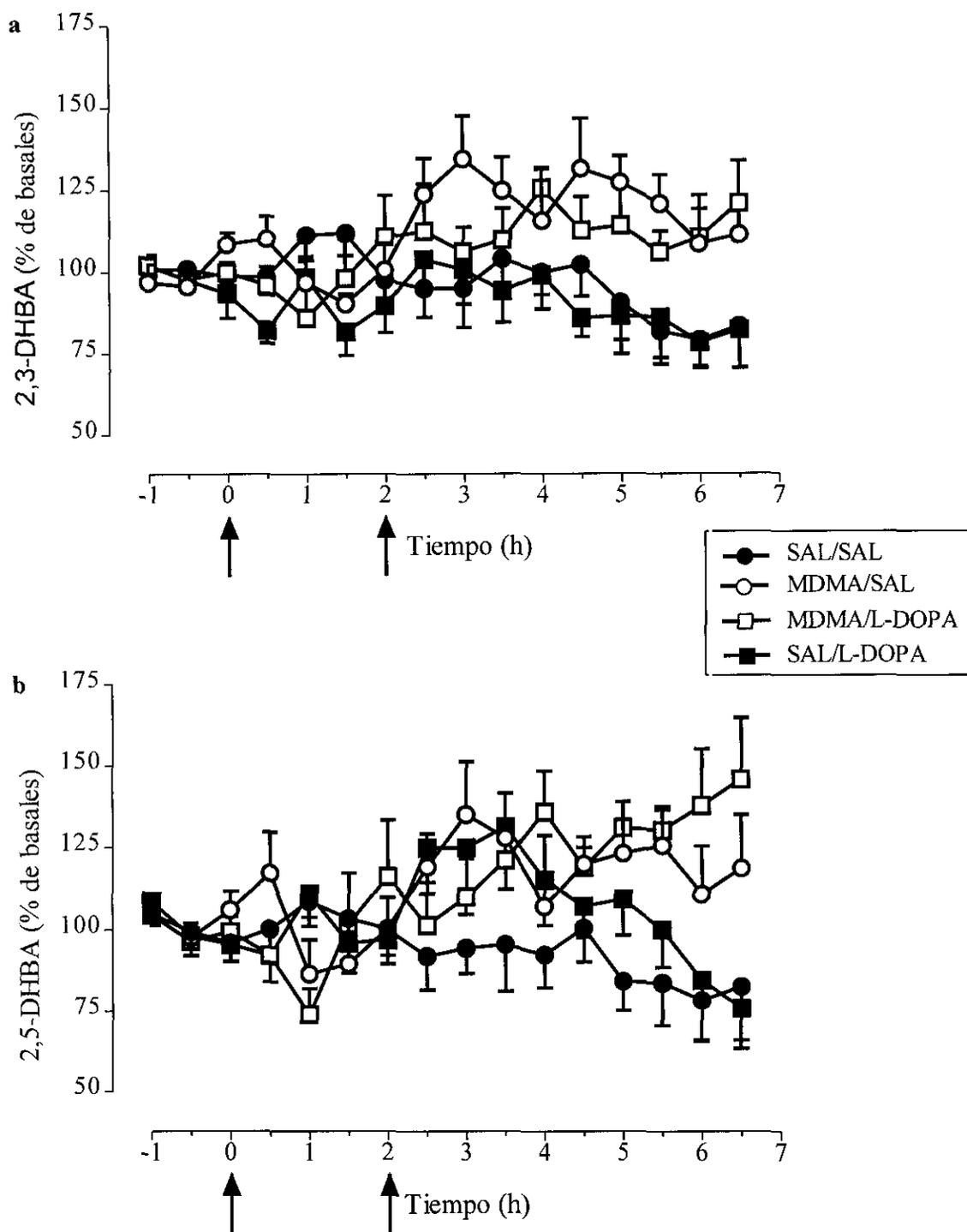


Figura 30. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg^{-1} , i.p. + benserazida 6.25 mg kg^{-1} , i.p.) o salino a ratas tratadas con MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) o salino sobre la concentración de (a) 2,3-DHBA y (b) 2,5-DHBA en el dializado hipocámpal de rata. Las flechas indican los tiempos de administración. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 3 valores antes de la administración de MDMA. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 6-10$). La administración de L-DOPA a ratas tratadas con MDMA no modificó la concentración ni de 2,3-DHBA ni de 2,5-DHBA en el dializado comparado con ratas tratadas con MDMA. Niveles basales ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) de 2,3-DHBA: SAL/SAL 10.08 ± 1.09 , MDMA/SAL 7.93 ± 0.85 , MDMA/L-DOPA 7.37 ± 0.78 , SAL/L-DOPA 7.54 ± 1.46 ; y 2,5-DHBA: SAL/SAL 11.57 ± 1.22 , MDMA/SAL 8.85 ± 0.82 , MDMA/L-DOPA 9.08 ± 1.26 , SAL/L-DOPA 7.79 ± 1.41 .

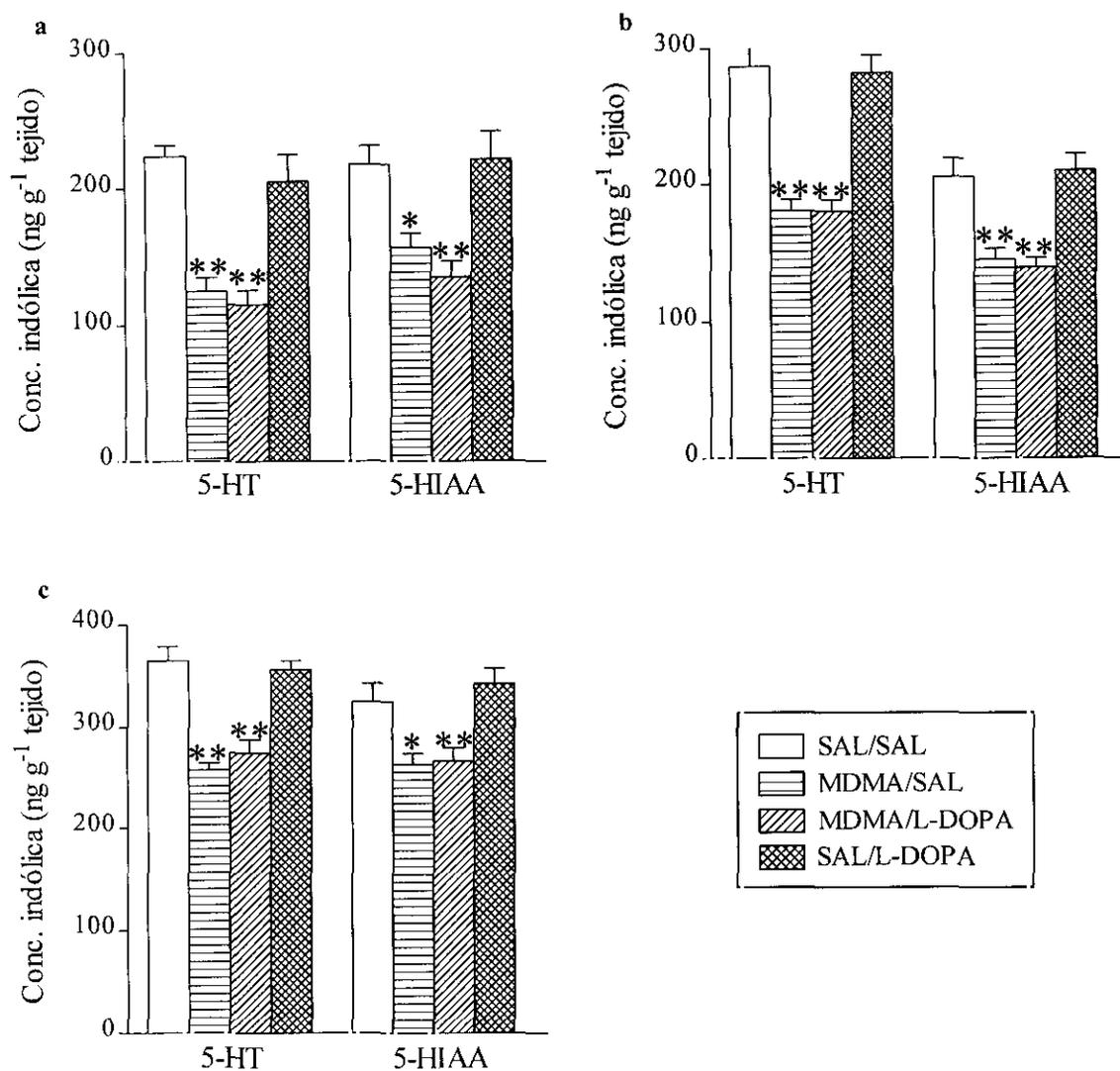


Figura 31. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) o salino a ratas tratadas con MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre las concentraciones indólicas (ng g⁻¹ tejido) en (a) el hipocampo, (b) la corteza y (c) el estriado 7 días después. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-8). **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs salino; (Newman-Keuls).

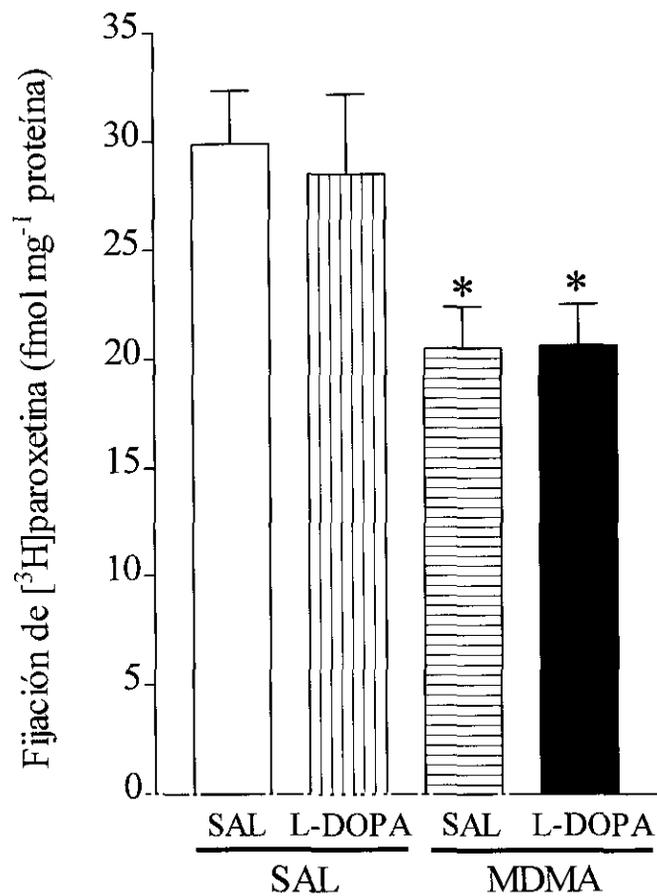


Figura 32. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) o salino a ratas tratadas con MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre fijación de [³H]paroxetina (fmol mg⁻¹ proteína) en la corteza cerebral 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-7). **P* < 0.05 vs salino; (Newman-Keuls).

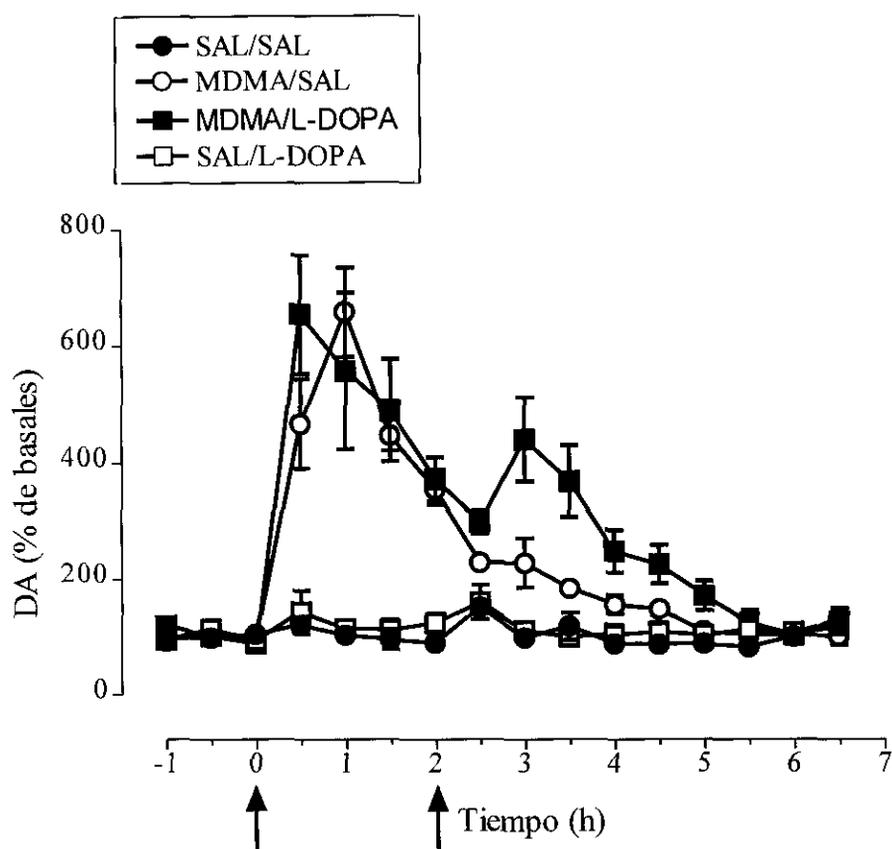


Figura 33. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg^{-1} , i.p. + benserazida 6.25 mg kg^{-1} , i.p.) o salino a ratas tratadas con MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) o salino sobre la concentración de DA en el dializado estriatal de rata. Las flechas indican los tiempos de administración. No hubo diferencia en las concentraciones basales. La administración de MDMA produjo un aumento en concentración de DA en el dializado ($F(1,9) = 74.34$, $P < 0.001$). La administración de L-DOPA aumentó el efecto de MDMA sobre DA ($F(1,10) = 9.57$, $P < 0.001$). L-DOPA administrado a ratas tratadas con salino no modificó la concentración de DA en el dializado. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 3 valores antes de la administración de MDMA. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 5-7$); (ANOVA de 2 vías). Niveles basales ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) de DA: SAL/SAL 0.83 ± 0.15 , MDMA/SAL 0.75 ± 0.08 , MDMA/L-DOPA 0.74 ± 0.08 , SAL/L-DOPA 0.70 ± 0.10 .

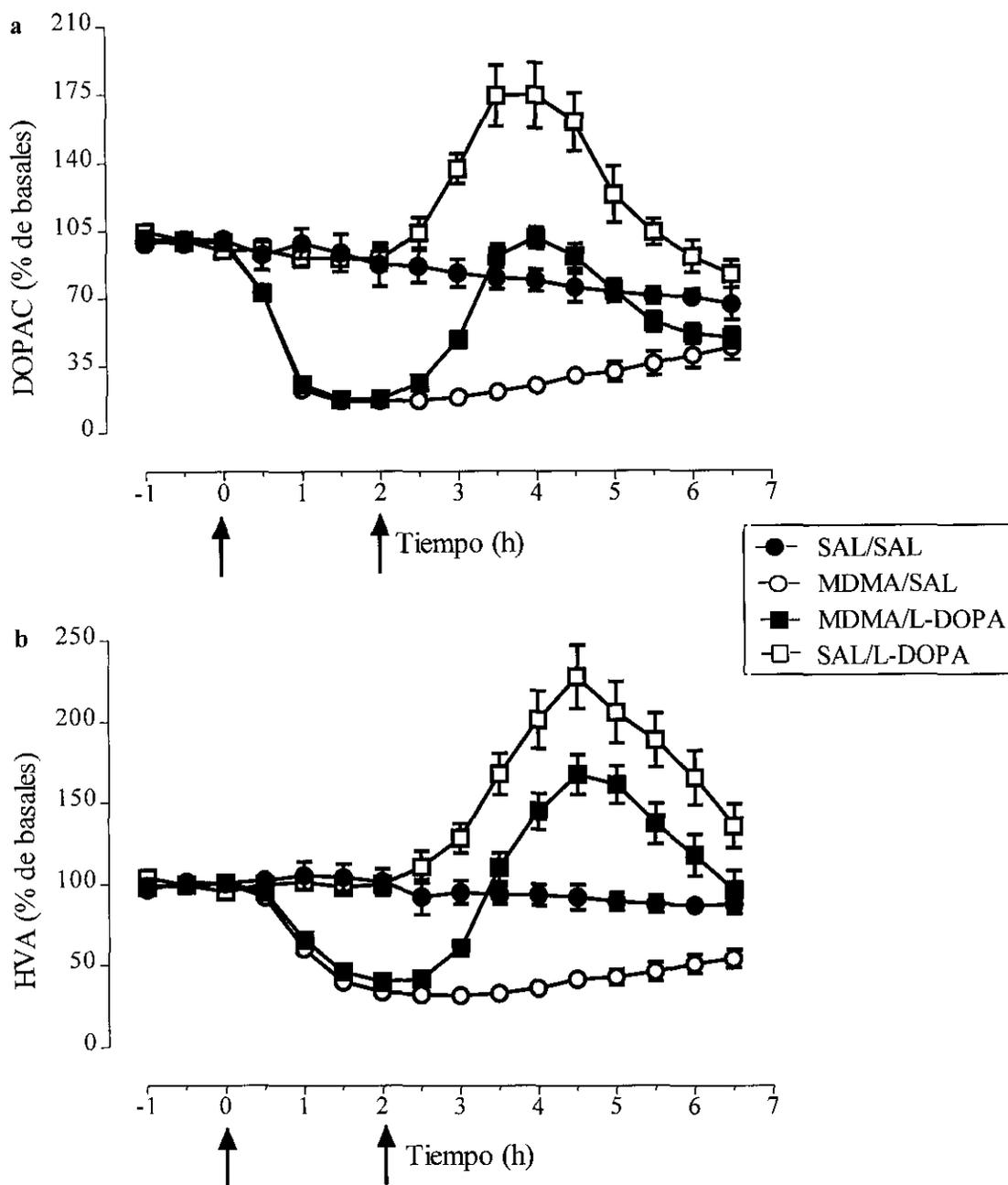


Figura 34. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg^{-1} , i.p. + benserazida 6.25 mg kg^{-1} , i.p.) o salino a ratas tratadas con MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) o salino sobre la concentración de (a) DOPAC y (b) HVA en el dializado estriatal de rata. Las flechas indican los tiempos de administración. No hubo diferencia en las concentraciones basales. La administración de MDMA una disminución en la concentración de DOPAC ($F(1,9) = 52.61$, $P < 0.001$) y HVA ($F(1,9) = 81.07$, $P < 0.001$) en el dializado. La administración de L-DOPA revirtió la disminución en DOPAC ($F(1,10) = 43.10$, $P < 0.001$) y HVA ($F(1,10) = 66.72$, $P < 0.001$) inducida por MDMA. L-DOPA administrado a ratas tratadas con salino incrementó la concentración de DOPAC en el dializado ($F(1,10) = 24.54$, $P < 0.001$) y HVA ($F(1,10) = 27.30$, $P < 0.001$). Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 3 valores antes de la administración de MDMA. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 5-7$); (ANOVA de 2 vías). Niveles basales ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) de DOPAC: SAL/SAL 252.0 ± 22.8 , MDMA/SAL 297.7 ± 35.3 , MDMA/L-DOPA 261.0 ± 35.3 , SAL/L-DOPA 301.0 ± 32.7 ; y de HVA: SAL/SAL 245.8 ± 16.0 , MDMA/SAL 245.8 ± 25.3 , MDMA/L-DOPA 233.1 ± 25.3 , SAL/L-DOPA 271.6 ± 27.7 .

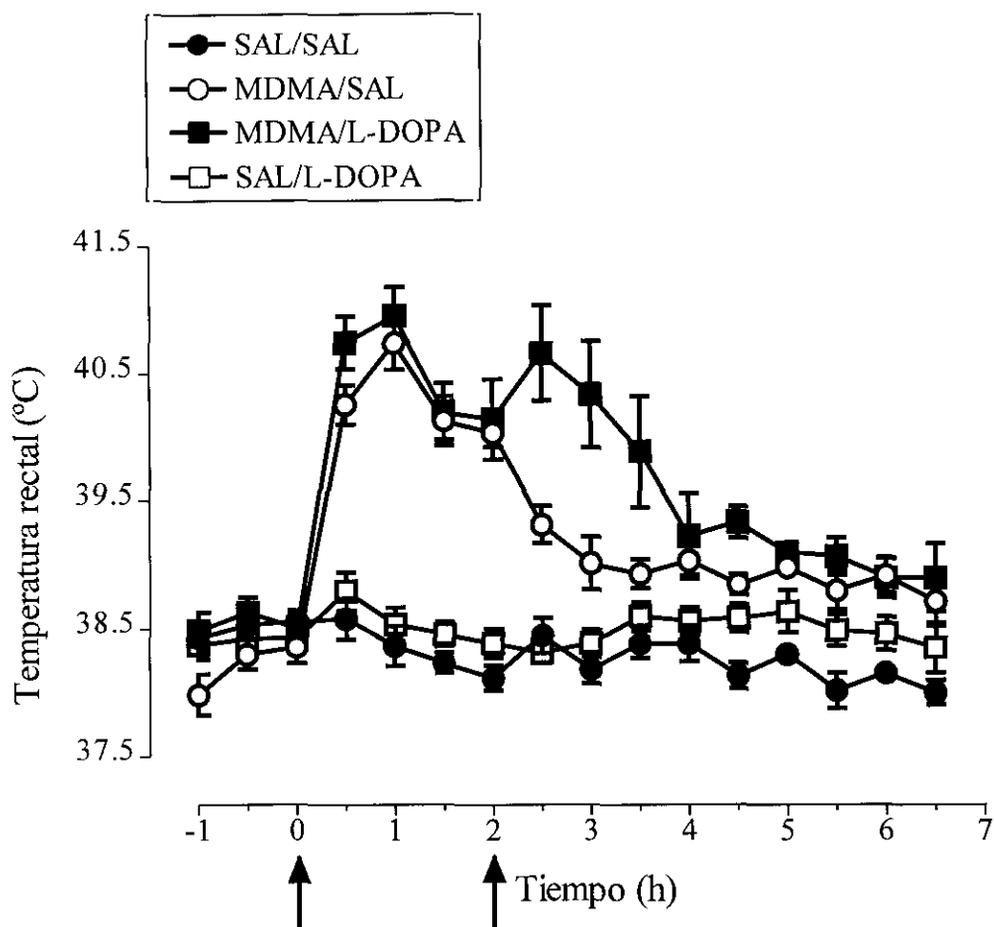


Figura 35. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg^{-1} , i.p. + benserazida 6.25 mg kg^{-1} , i.p.) o salino a ratas tratadas con MDMA (15 mg kg^{-1} , i.p.) o salino sobre la temperatura rectal de los animales. Las flechas indican los tiempos de administración. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 6-10$). No hubo diferencia en las temperaturas basales. Tras el tratamiento hubo una diferencia significativa ($F(3,24) = 54.03$, $P < 0.001$). La administración de MDMA produjo un aumento en la temperatura rectal ($F(1,9) = 129.36$, $P < 0.001$). La administración de L-DOPA a ratas tratadas con MDMA produjo un segundo pico de hipertermia ($F(1,11) = 4.12$, $P < 0.05$, a partir de la administración de L-DOPA); (ANOVA de 2 vías).

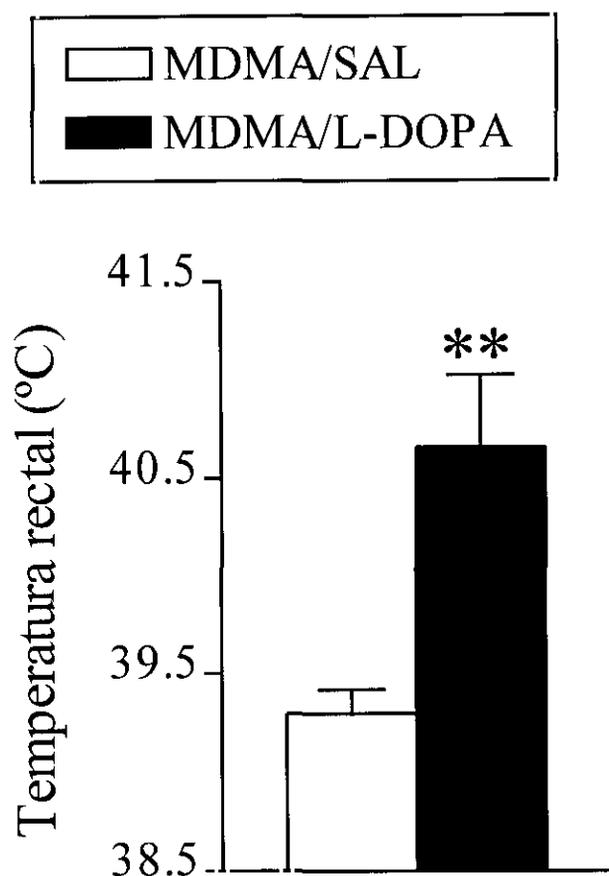


Figura 36. Efecto de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) o salino administrado 120 min después de MDMA (15 mg kg⁻¹, i.p.) sobre la temperatura rectal de los animales. El tratamiento con L-DOPA originó un aumento en la temperatura rectal de los animales a los 30 min de su administración. *** $P < 0.01$ vs MDMA; (t de Student).

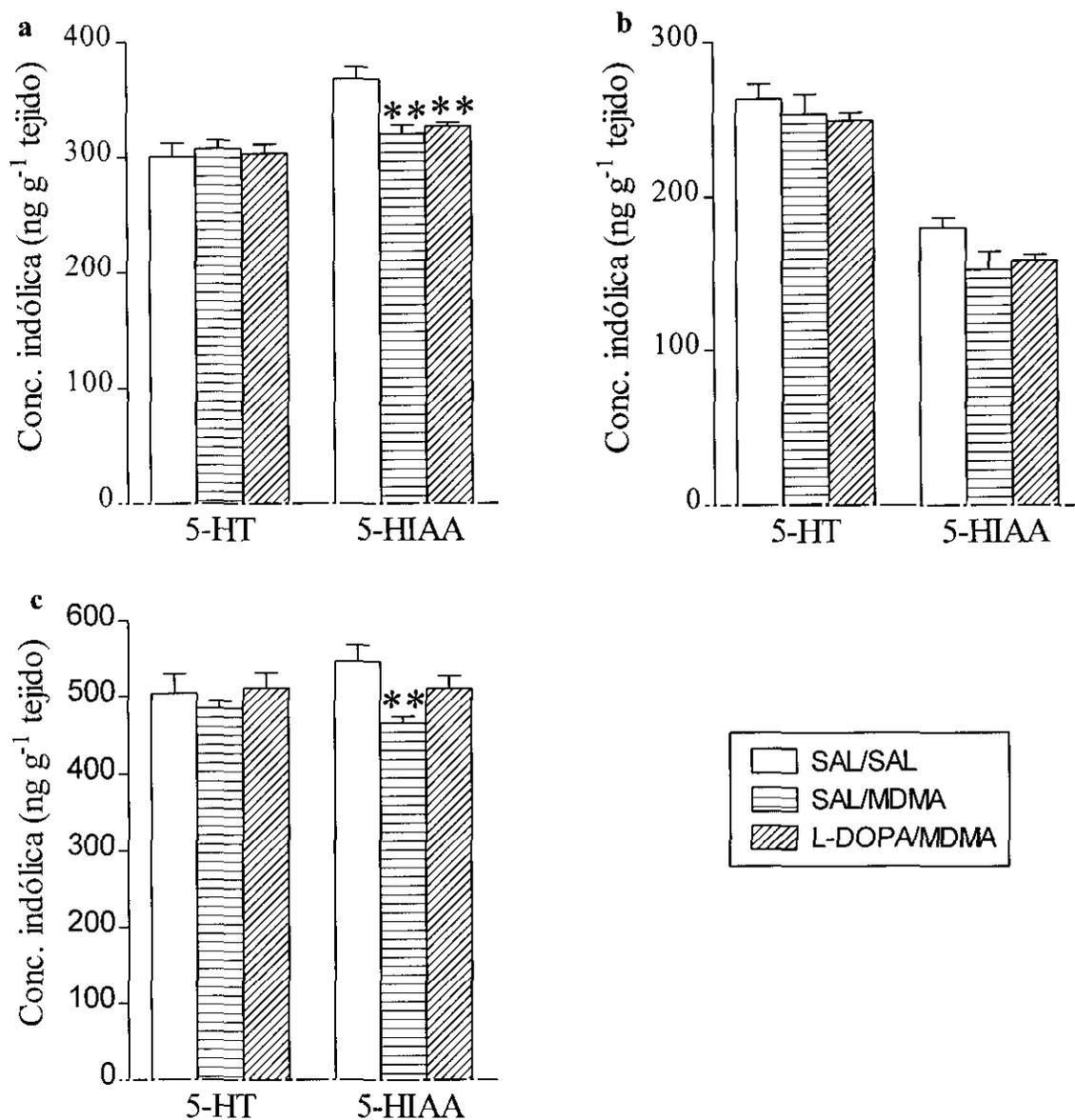


Figura 37. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) o salino 30 min antes de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre las concentraciones indólicas (ng g⁻¹ tejido) en (a) el hipocampo, (b) la corteza y (c) el estriado 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-8). ** *P* < 0.01 vs salino; (Newman-Keuls).

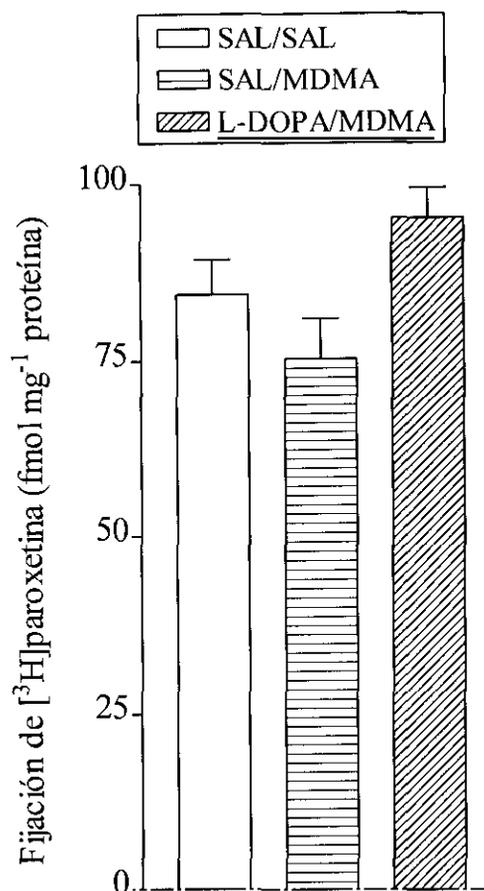


Figura 38. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) o salino 30 min antes de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) o salino sobre fijación de [³H]paroxetina (fmol mg⁻¹ proteína) en la corteza cerebral 7 días después del tratamiento. Los resultados se muestran como la media ± EEM (n = 5-7).

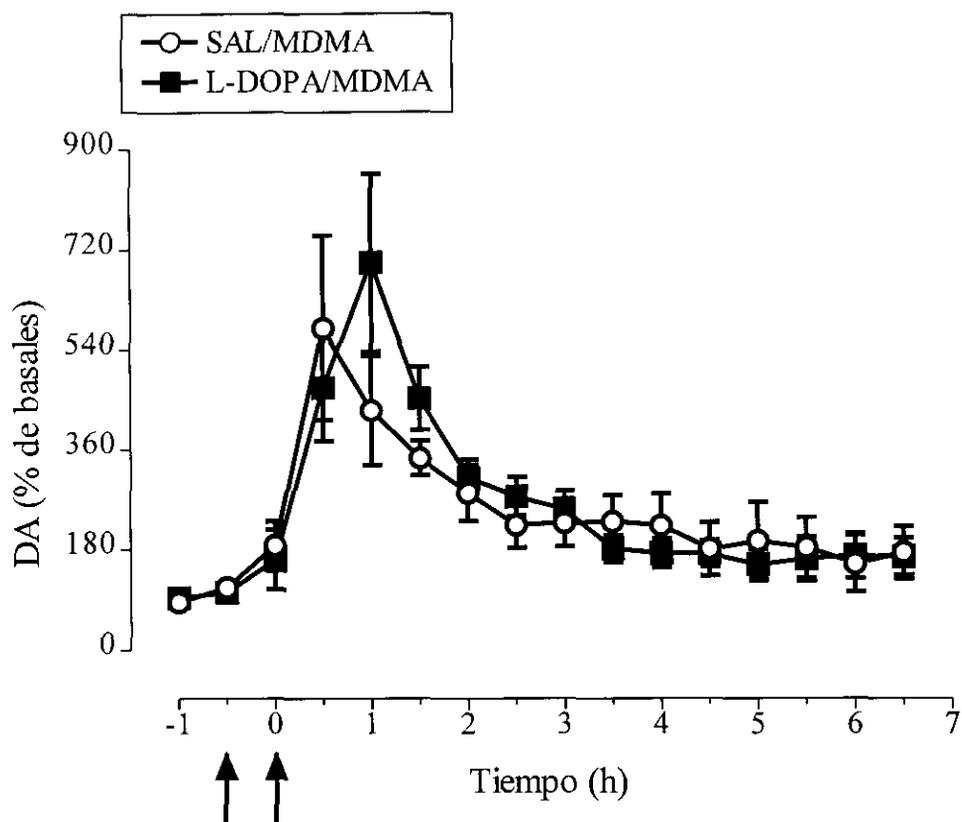


Figura 39. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 30 min antes de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) sobre la concentración de DA en el dializado estriatal de rata. Las flechas indican los tiempos de administración. No hubo diferencia en las concentraciones basales. La administración de L-DOPA no modificó el efecto de MDMA sobre la concentración de DA en el dializado ($F(1,8) = 0.09$, n.s.). Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 2 valores antes de la administración de L-DOPA. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 4-6$); (ANOVA de 2 vías). Niveles basales (pg μl^{-1}) de DA: SAL/MDMA 0.32 ± 0.02 , L-DOPA/MDMA 0.51 ± 0.06 .

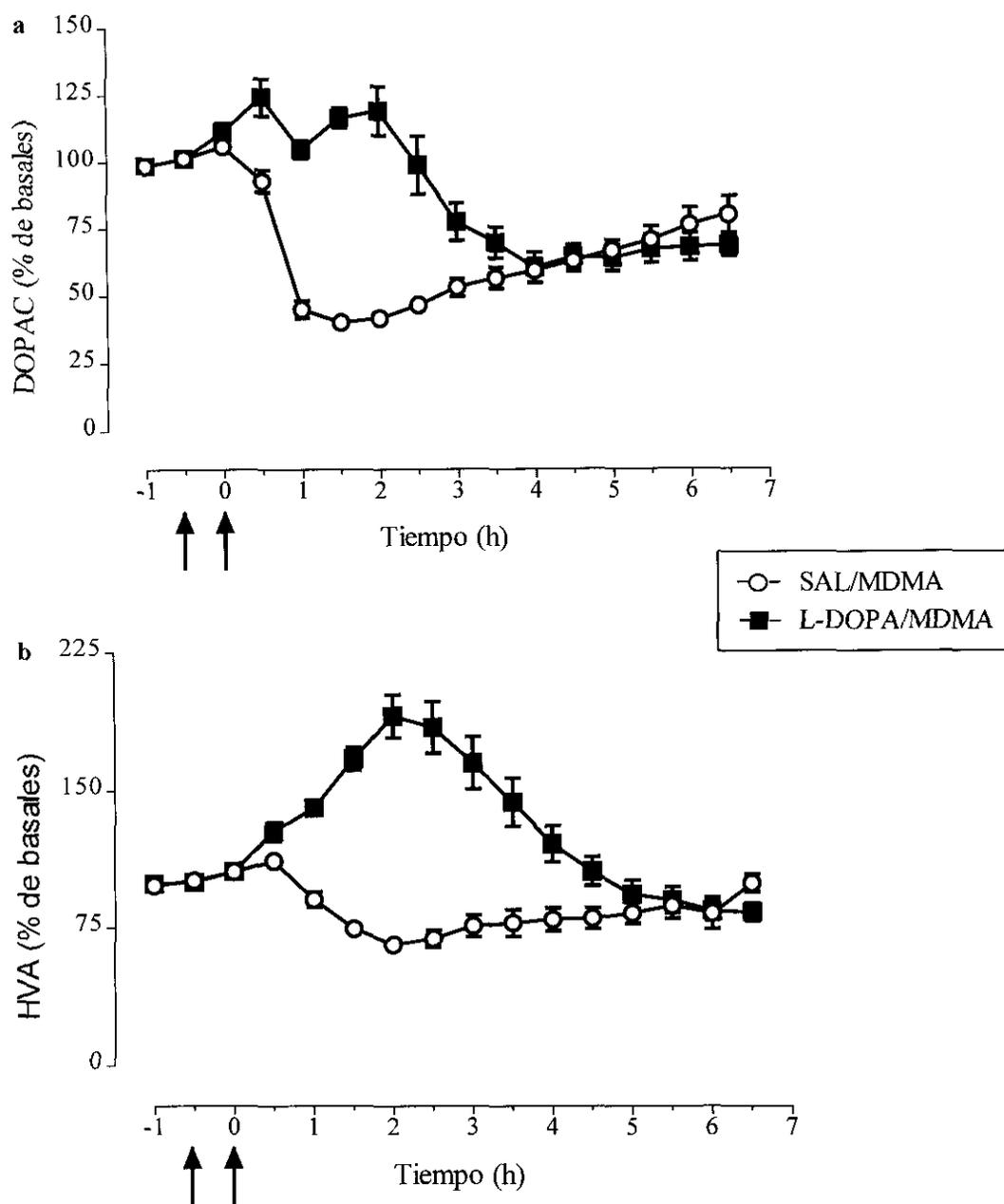


Figura 40. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 30 min antes de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) sobre la concentración de (a) DOPAC (b) HVA en el dializado estriatal de rata. Las flechas indican los tiempos de administración. No hubo diferencia en las concentraciones basales. La administración de L-DOPA revirtió la disminución en la concentración de DOPAC en el dializado ($F(1,10) = 20.55$, $P < 0.001$) y HVA ($F(1,9) = 47.82$, $P < 0.001$) inducida por MDMA. Los resultados están expresados en porcentaje respecto a la media de los 2 valores antes de la administración de L-DOPA. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 4-6$); (ANOVA de 2 vías). Niveles basales (pg μ l⁻¹) de DOPAC: MDMA/SAL 211.0 \pm 24.3, MDMA/L-DOPA 287.3 \pm 45.2; y de HVA: MDMA/SAL 203.1 \pm 10.5, MDMA/L-DOPA 289.7 \pm 56.8.

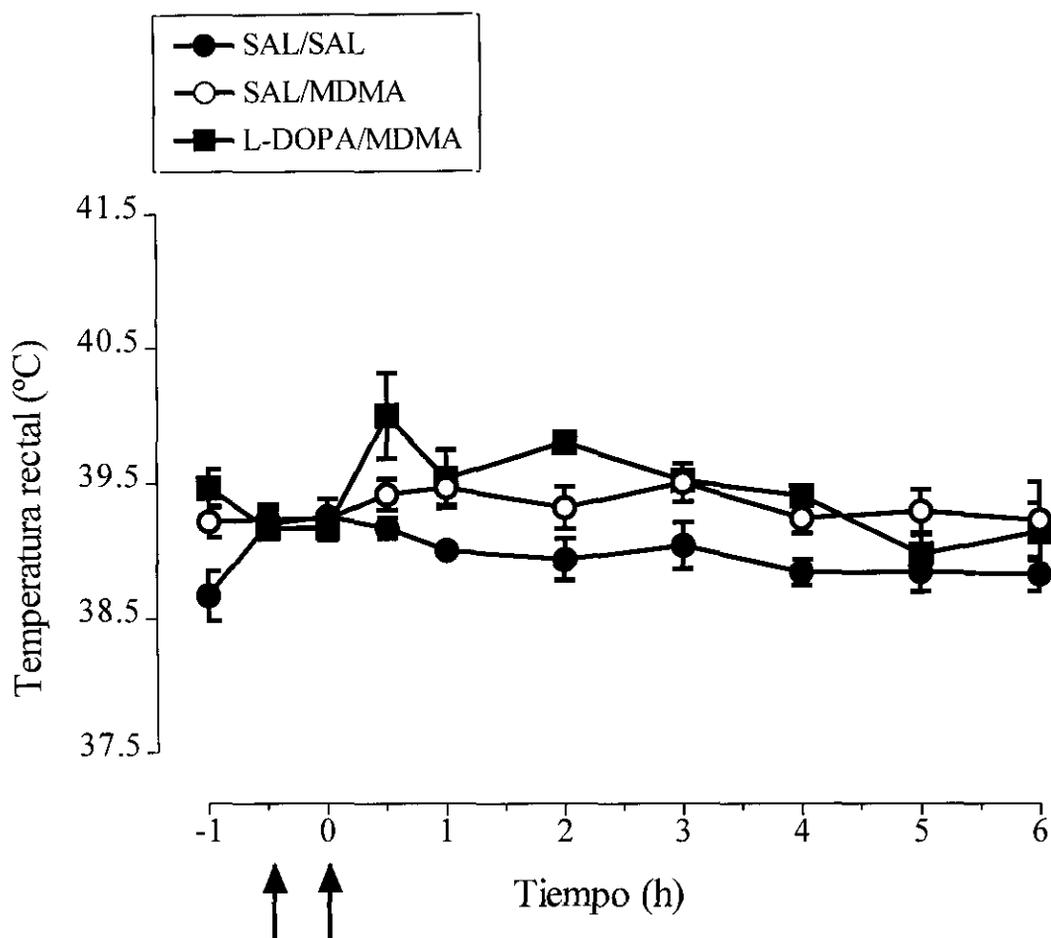


Figura 41. Efecto de la administración de L-DOPA (25 mg kg⁻¹, i.p. + benserazida 6.25 mg kg⁻¹, i.p.) 30 min antes de MDMA (5 mg kg⁻¹, i.p.) sobre la temperatura rectal de los animales. También se muestra la temperatura rectal de ratas tratadas con salino. Las flechas indican los tiempos de administración. No hubo diferencia en las temperaturas basales. MDMA produjo un aumento en la temperatura rectal de los animales ($F(1,10) = 7.15$, $P < 0.05$). El pretratamiento con L-DOPA no modificó la respuesta hipertérmica inducida por MDMA. Cada punto representa la media \pm EEM ($n = 4-6$); (ANOVA de 2 vías).

V. DISCUSIÓN

V.1 Radicales libres y neurodegeneración por MDMA

El método atrapador del salicilato es una técnica que se desarrolló hace más de 10 años y que consiste en determinar la formación de los ácidos 2,3- y 2,5-dihidroxibenzoicos (DHBA) a partir del ácido salicílico; ambos ácidos se consideran un índice de la generación de radicales hidroxilo en el cerebro (Radzik y col., 1983; Floyd y col., 1984). El ácido salicílico se puede administrar tanto por vía sistémica (i.p.) como por vía central (ventrículo cerebral). Cuando se administra vía i.p. se considera que la formación de 2,3-DHBA es un índice más fiable de la formación de radicales libres en cerebro (Carney y Floyd, 1991; Ingelman-Sundberg y col., 1991) puesto que una gran proporción de 2,5-DHBA se puede formar también por hidroxilación enzimática (citocromo P_{450}) del salicilato en el hígado (Halliwell y col., 1991). El 2,5-DHBA formado en la periferia puede llegar al cerebro a través de la circulación sistémica y permanecer dentro de los vasos sanguíneos cerebrales o penetrar en el parénquima cerebral. La presencia de 2,5-DHBA en el plasma es particularmente relevante a la hora de evaluar el contenido de radicales hidroxilo en el cerebro en respuesta a tratamientos que alteran el flujo sanguíneo, la integridad de la barrera hematoencefálica o la función hepática, como sucede en procesos de isquemia, hipoxia, lesiones cerebrales o tras la administración de derivados anfetamínicos. Teniendo en cuenta, por tanto, que la administración sistémica de ácido salicílico conduce a la formación de 2,5-DHBA en la periferia, se considera que la administración central de salicilato proporciona una estimación más realista de la formación de radicales hidroxilo en el cerebro y evita el problema adicional de ensayar la concentración de ácido salicílico en el cerebro. Una ventaja adicional de esta vía de administración es que el atrapamiento de radicales hidroxilo en el cerebro no está influenciado por cambios en la función hepática o en la integridad de la barrera hematoencefálica y sería menos susceptible a alteraciones en el flujo sanguíneo. La técnica utilizada en esta Tesis Doctoral, la microdiálisis intracerebral *in vivo*, permite, mediante la implantación selectiva de la sonda, la medida de la formación de radicales libres en una región cerebral determinada, concretamente en el hipocampo, que es claramente susceptible a la neurodegeneración inducida por MDMA.

En los estudios iniciales ensayamos y optimizamos las condiciones experimentales y encontramos que la perfusión con ácido salicílico a una concentración de 5 mM utilizada por

otros autores (Chiueh y col., 1992, 1993; Busto y col., 1995) resultaba en una línea de base que disminuía con el tiempo, lo cual probablemente era debido al alto grado de acidez del medio de diálisis. Una disminución de 10 veces en la concentración de ácido salicílico en líquido cefalorraquídeo artificial produjo una solución algo menos ácida y una línea de base estable.

Experimentos iniciales confirmaron la capacidad de la 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA) para producir daño neurotóxico en ratas Dark Agouti (Colado y col., 1995; Colado y Green, 1995) y en otras razas de ratas (Schmidt y col., 1986; Stone y col., 1986; Battaglia y col., 1987). MDMA, una semana después de su administración, produjo una degeneración de los terminales nerviosos serotoninérgicos que se manifestó por una disminución en el contenido de 5-HT y de su metabolito, 5-HIAA, y una reducción en la densidad de lugares de recaptación de 5-HT en diversas estructuras cerebrales. Puesto que estos sitios se encuentran localizados en los terminales nerviosos presinápticos que contienen 5-HT, su disminución es indicativa de la pérdida de terminales y/o axones serotoninérgicos. El efecto producido por MDMA sobre estos parámetros serotoninérgicos fue dosis-dependiente, de tal manera que no se observó efecto alguno a la dosis de 5 mg kg⁻¹ y apareció una neurotoxicidad creciente a las dosis de 10 y 15 mg kg⁻¹. MDMA no originó ningún cambio a largo plazo sobre la concentración estriatal de DA y de su metabolito, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). Estos resultados coinciden con datos procedentes de otros estudios en los que se demuestra la relativa selectividad de esta droga neurotóxica por las neuronas serotoninérgicas (Schmidt y Kehne, 1990; Colado y col., 1997b).

Tras la administración de MDMA a la dosis de 10 mg kg⁻¹ se observó un pequeño aumento en la concentración de 2,5-DHBA (pero no de 2,3-DHBA) en el dializado de hipocampo. Sin embargo, una dosis de MDMA de 15 mg kg⁻¹ produjo un incremento sostenido y significativo de aproximadamente un 40% en la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado que comienza inmediatamente después de la administración de la droga y se mantiene por lo menos 5 h. Estos resultados indican que la administración de MDMA origina un incremento en la formación de radicales hidroxilo en el cerebro de la rata. Se ha especulado con la posibilidad de que la formación de radicales libres fuera la consecuencia del daño neuronal y no la causa de la lesión. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral descartan

la primera posibilidad puesto que 4 h después de la administración de MDMA, momento en el que se observa un incremento en la formación de radicales hidroxilo, no se detecta ningún cambio en la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT. Otras neurotoxinas dopaminérgicas también aumentan la generación de radicales libres en el cerebro de roedores. La administración de metanfetamina produce un incremento de un 35% y un 45% en las concentraciones de 2,3-DHBA y 2,5-DHBA, respectivamente, en tejido estriatal 1 h después de la administración sistémica de la droga (Fleckenstein y col., 1997). Un incremento similar en la concentración de 2,3-DHBA en el dializado neoestriatal ha sido observado por el grupo de Giovanni tras la administración de metanfetamina (Giovanni y col., 1995). Otros autores han demostrado que la perfusión de MPP+ a través de la sonda de microdialisis situada en el núcleo caudado-putamen, incrementa de forma similar los niveles de ambos metabolitos del ácido salicílico (Chiueh y col., 1992, 1993).

De acuerdo con trabajos previos (Sanders-Bush y col., 1972; Fuller y col., 1975; Colado y col., 1993; Murray y col., 1996) la administración de otro derivado anfetamínico, *p*-cloroanfetamina (PCA) también origina una degeneración de los terminales nerviosos serotoninérgicos, siendo mas potente que la MDMA para producir este efecto. Estudios llevados a cabo recientemente demuestran que el atrapador de radicales libres, α -fenil-*N*-terbutil nitrona (PBN), previene la disminución en el contenido indólico y la pérdida de lugares de recaptación de 5-HT inducidas por PCA y sugieren que este derivado anfetamínico podría producir daño neuronal incrementando la formación de radicales libres (Murray y col., 1996). Esta hipótesis ha sido confirmada por los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral. La administración de PCA origina un incremento de la formación de 2,3- y 2,5-DHBA en el hipocampo de rata. A diferencia de la MDMA que produce un incremento inmediato en la formación de los ácidos dihidroxibenzoicos, tras la administración de PCA este efecto no se detecta hasta 2 h después de la inyección. Este hecho podría reflejar diferencias existentes entre ambos derivados anfetamínicos en la velocidad de degradación a compuestos capaces de generar radicales libres.

La inyección de fenfluramina también produjo a largo plazo un efecto neurodegenerativo sobre los terminales serotoninérgicos en diversas regiones cerebrales, un efecto demostrado años atrás en diversas razas de ratas (Harvey y McMaster, 1975; Neckers y

col., 1976; Colado y col., 1993) y recientemente en ratas Dark Agouti (Murray y col., 1996). No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo indican que tras la administración de fenfluramina no se produce un aumento en la formación de radicales libres puesto que la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado permanece inalterada. Estos datos sugieren que el daño neurotóxico inducido por fenfluramina no implica la formación de radicales libres, y coinciden con resultados obtenidos recientemente en los cuales se demuestra que el PBN no previene la neurotoxicidad cuando se co-administra con fenfluramina (Murray y col., 1996).

Con el fin de determinar si el incremento en la formación de radicales libres inducido por MDMA en el hipocampo se asocia con cambios producidos en las neuronas serotoninérgicas, estudiamos el efecto de MDMA en ratas a las que 8 días antes se les había inyectado fenfluramina para producir una neurodegeneración de los terminales serotoninérgicos en el hipocampo; la hipótesis inicial era que la administración de MDMA a estas ratas lesionadas produciría poco o ningún incremento en la formación de radicales libres. Los resultados obtenidos indicaban que aunque se producía un pequeño incremento en la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA en el dializado del hipocampo, la respuesta originada por MDMA en los animales lesionados no fue significativamente diferente de la observada en los animales controles. El pequeño incremento en la formación de radicales libres se podría explicar por el hecho de que fenfluramina, aunque disminuye en un 70% la fijación de [³H]paroxetina, no produce una pérdida total de terminales nerviosos serotoninérgicos. Estos datos sugieren que el incremento en la formación de radicales libres se produce como consecuencia de la recaptación de MDMA en las neuronas serotoninérgicas y que los radicales libres se están formando en los terminales nerviosos serotoninérgicos. Observamos, por otra parte, que en las ratas pre-tratadas con fenfluramina la respuesta hipertérmica inducida por MDMA fue significativamente menor que en ratas controles, de lo que se deduce que la inmediata liberación de 5-HT inducida por MDMA está directamente relacionada con la hipertermia inducida por la droga.

Esta evidencia indirecta de que los radicales libres producidos por la administración de MDMA provienen de cambios selectivos originados dentro del terminal nervioso serotoninérgico, explicaría a su vez porque el incremento en la concentración de los ácidos dihidroxibenzoicos es relativamente modesto, comparado con el observado en otros modelos

experimentales de neurodegeneración. La administración de una dosis de 15 mg kg⁻¹ de MDMA produce un incremento de aproximadamente un 40% en la concentración de 2,3-DHBA que es prácticamente el mismo aumento que se observa tras la administración de una dosis neurotóxica de metanfetamina (Giovanni y col., 1995). Sin embargo, procedimientos de isquemia global, que presumiblemente inducen daño en la mayor parte del tejido cerebral, producen un incremento en la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA de un 200-300% (Globus y col., 1995).

En estudios previos (Colado y Green, 1995; Yeh, 1996) se había demostrado que el efecto neurodegenerativo de la MDMA se atenuaba por la co-administración de PBN, un compuesto atrapador de radicales libres. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral demuestran que el PBN (120 mg kg⁻¹), incluso a dosis mas bajas que las utilizadas en los trabajos mencionados (150 mg kg⁻¹), previene el incremento en la formación de radicales hidroxilo inducido por MDMA *in vivo* y atenúa el daño neurotóxico inducido por MDMA puesto que previene parcialmente la disminución en el contenido indólico y la pérdida de terminales nerviosos serotoninérgicos. Se podría sugerir, por tanto, que el efecto neuroprotector del PBN es el resultado de su actividad atrapadora de radicales libres. Aunque la protección ejercida por PBN (30%) fue menor que la observada en estudios previos (Colado y Green, 1995), es necesario señalar que la dosis de MDMA utilizada en esta Tesis Doctoral fue mas alta y la dosis de PBN mas baja que en el estudio previo. PBN también se ha mostrado eficaz para prevenir la formación de radicales hidroxilo inducida por la administración local de glutamato en el estriado de la rata (Ferber y col., 1998; Lancelot y col., 1997) y para proteger frente al daño neuronal causado por la administración sistémica repetida de MPTP (*N*-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, Fredriksson y col., 1997).

De los resultados mencionados en esta Tesis Doctoral se deduce que PBN previene los efectos a largo plazo, pero no los agudos, producidos por MDMA sobre el contenido cerebral de 5-HT. MDMA produce inmediatamente después de su administración (4 h) una marcada disminución de la concentración de 5-HT y de su metabolito, 5-HIAA en diversas regiones cerebrales (Schmidt, 1987; Gibb y col., 1990). Este efecto se atribuye, fundamentalmente, a un incremento en la liberación del neurotransmisor. PBN, administrado siguiendo el mismo protocolo que originó protección, no previno la pérdida en el contenido indólico subsiguiente a

la inyección de MDMA. Se podría sugerir, por tanto, que el efecto agudo producido por MDMA sobre la liberación de 5-HT es independiente del efecto neurodegenerativo. No obstante, se ha sugerido que la neurodegeneración a largo plazo podría resultar de la formación de metabolitos tóxicos de 5-HT, tales como 5,6- ó 5,7-dihidroxitriptamina (Wrona y Dryhurst, 1991) o 5,5-dihidroxi 4,4'-bitriptamina (Wrona y col., 1992). Estos compuestos podrían proceder de la oxidación de la molécula de 5-HT mediada por los radicales hidroxilo que se generan tras la administración de MDMA. Sin embargo, esta hipótesis es poco probable porque la administración de 5-hidroxitriptófano, que aumenta la síntesis de 5-HT y, por tanto, la cantidad de 5-HT disponible para ser liberada en respuesta a MDMA, no potencia la neurotoxicidad de la droga, sino que, por el contrario, la atenúa (Sprague y col., 1995).

Recientemente se ha demostrado que la administración de PBN también previene el daño sobre las neuronas serotoninérgicas inducido por PCA, pero no por fenfluramina (Murray y col., 1996). Estos datos, junto con aquellos que demuestran que el PBN protege frente al daño inducido por MDMA (Colado y Green, 1995; Yeh, 1996), indican contundentemente que MDMA y PCA inducen la lesión neuronal por un mecanismo que implica la formación de radicales libres, mientras que el daño producido por fenfluramina se produce por un mecanismo diferente. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral apoyan esta afirmación, ya que tanto MDMA como PCA incrementan la formación de los ácidos dihidroxibenzoicos en el dializado del hipocampo mientras que fenfluramina no produce este efecto.

Especial atención se ha prestado en este estudio a los cambios en la temperatura corporal puesto que es ampliamente conocido que la hipotermia atenúa la neurodegeneración producida no solamente por isquemia cerebral (Busto y col., 1987) sino también la degeneración producida por la administración de anfetaminas sustituidas (Farfel y Seiden, 1995; Broening y col., 1995). De la misma manera es posible que el daño neuronal sea exacerbado por la hipertermia (Broening y col., 1995; Stewart y col., 1997).

La temperatura rectal de las ratas Dark Agouti incrementa de manera dosis-dependiente tras la administración de MDMA. Se trata de una respuesta a la droga que es ampliamente conocida (Colado y col., 1995; Colado y Green, 1995; Green y col., 1995) y que se atribuye a la masiva liberación de 5-HT del terminal nervioso inducida por MDMA. Esta hipótesis es

apoyada por los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral ya que en los animales lesionados con fenfluramina la respuesta hipertérmica consecutiva a la administración de MDMA fue considerablemente menor, debido probablemente a que la densidad de terminales nerviosos serotoninérgicos en estos animales estaba reducida. Dosis repetidas de MDMA también producen una hipertermia cada vez menor (Colado y col., 1997b). De acuerdo con resultados previos, PCA también produjo hipertermia (Colado y col., 1993) mientras que fenfluramina no alteró la temperatura corporal de los animales. No obstante, parece improbable que los cambios en la temperatura puedan estar asociados directamente con la neurodegeneración o con el incremento en la formación de radicales libres. En primer lugar, es importante reseñar que MDMA produce degeneración neuronal tras un protocolo de administración que no produce una respuesta hipertérmica manifiesta (O'Shea y col., 1998a) o que incluso produce hipotermia (Farfel y Seiden, 1995a; Malberg y col., 1996). El grado de degeneración de las neuronas serotoninérgicas depende de la dosis de MDMA, no de la severidad de la respuesta hipertérmica (Colado y col., 1995). Una dosis más baja de PCA (2.5 mg kg^{-1}) que la utilizada en este estudio no produce un efecto significativo sobre la temperatura rectal pero, sin embargo, induce daño neuronal (Colado y col., 1993; Murray y col., 1996). En segundo lugar, en este estudio no parece existir una relación obvia en magnitud ni en tiempo, entre los cambios en la temperatura y los cambios en la concentración de 2,3-DHBA. Es posible, sin embargo, que la formación de radicales libres en el tejido dañado esté potenciada cuando el animal es hipertérmico, tal y como se ha demostrado en estudios de isquemia hipóxica (Globus y col., 1995) y que tras la administración de MDMA la producción de radicales libres se vea favorecida por la hipertermia que induce la droga (Kil y col., 1996).

Se puede afirmar con algún grado de confianza que PBN no actúa como neuroprotector por prevenir la hipertermia o inducir hipotermia. PBN a dosis altas puede inducir hipotermia en ratas tratadas con salino (Colado y Green, 1995). Sin embargo, a la dosis más baja utilizada en este estudio su efecto fue ligero y la temperatura de las ratas tratadas con MDMA y PBN fue similar a aquellas inyectadas con MDMA únicamente. PBN también atenúa la disminución de dopamina inducida por metanfetamina a largo plazo sin alterar la respuesta hipertérmica inducida por la droga (Cappon y col., 1996).

Un interrogante que se desprende de este estudio es si el incremento en la producción de radicales libres subsiguiente a la administración de MDMA puede ser asociado con la neurodegeneración y si el efecto neuroprotector del PBN es debido a la acción atrapadora de radicales libres del compuesto. En el caso del daño inducido por procedimientos de isquemia-hipoxia ambas relaciones están bien establecidas. Los trabajos relativos a modelos experimentales de isquemia han producido numerosos datos que implican a las especies reactivas de oxígeno en el daño hístico (Oliver y col., 1990; Carney y Floyd, 1991; Hensley y col., 1997; Mori y col., 1998). La propiedad principal de PBN es atrapar radicales libres de oxígeno (Hensley y col., 1997). Este compuesto atraviesa bien la barrera hematoencefálica (Cheng y col., 1993), disminuye la producción de radicales libres en el cerebro de ratas isquémicas (Zini y col., 1990; Sen y Phillis, 1993) y es un compuesto neuroprotector eficaz en modelos de infarto cerebral (Carney y Floyd, 1991; Zini y col., 1992; Sen y Phillis, 1993; Zhao y col., 1994). Su actividad principal es la de reaccionar con radicales libres inestables (Hensley y col., 1997) formando nitroxidos (Fig. 42) que dan espectros característicos utilizando resonancia magnética de electrones (Knecht y Mason, 1993). Se puede afirmar, por tanto, que la formación de radicales libres es un factor determinante del daño inducido por la isquemia en el cerebro y que PBN actúa como neuroprotector a causa de su actividad como atrapador de radicales libres (Hensley y col., 1997).

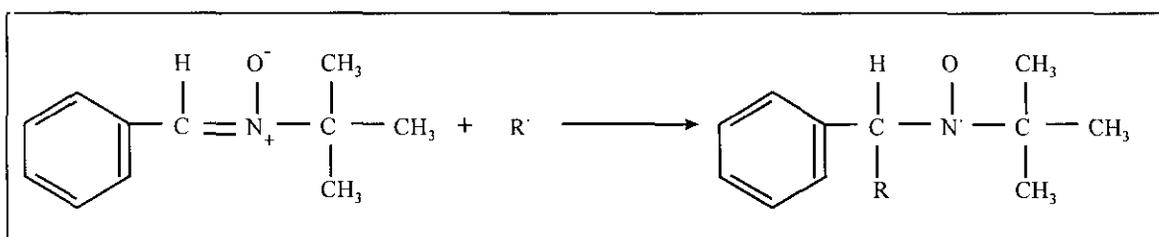


Figura 42. Reacción del PBN con radicales libres para formar un radical de nitroxido estable (Floyd, 1990).

La implicación de los radicales libres en el proceso neurodegenerativo sobre terminales serotoninérgicos inducido por MDMA, PCA, metanfetamina y anfetamina se podría sugerir en base a numerosas evidencias experimentales, algunas de las cuales ya se han mencionado en esta Tesis Doctoral.

√ Metanfetamina (Giovanni y col., 1995), anfetamina (Huang y col., 1997), MDMA y PCA incrementan la formación de radicales libres en el cerebro cuantificados mediante el método atrapador del salicilato. La destrucción previa de terminales nerviosos serotoninérgicos abole el incremento inducido por MDMA sobre la formación de radicales libres.

√ El daño neurotóxico producido por la administración de metanfetamina, MDMA y PCA puede ser prevenido o atenuado por la inyección del atrapador de radicales libres, PBN (Colado y Green, 1995; Cappon y col., 1996; Murray y col., 1996; Yeh, 1996).

√ PBN también previene el incremento en la formación de radicales libres inducido por MDMA *in vivo*.

√ Otro compuesto atrapador de radicales libres, L-cisteína, también atenúa el daño neuronal inducido por PCA (Steranka y Rehind, 1987).

√ Niveles tisulares elevados de radicales libres conducirían a un incremento en la peroxidación lipídica, y en efecto, se ha demostrado que tras la administración de MDMA se observa un incremento en la peroxidación lipídica en el cerebro (Sprague y Nichols, 1995; Colado y col., 1997b).

√ La administración de L-deprenilo previene el incremento en la peroxidación lipídica y la lesión neurotóxica inducida por MDMA (Sprague y Nichols, 1995).

√ La administración de MDMA a ratas neonatales no incrementa la peroxidación lipídica en el cerebro y tampoco produce una pérdida neurotóxica de 5-HT a largo plazo (Colado y col., 1997a), debido probablemente a la alta actividad para inactivar radicales libres que existe en los tejidos de los animales jóvenes (Floyd, 1990).

√ Animales transgénicos que expresan la secuencia de la superóxido dismutasa CuZn humana muestran resistencia a los efectos tóxicos de la MDMA y su metabolito, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) en comparación con los animales que no portan el gen (Cadet y col., 1994).

√ Finalmente, se ha demostrado que MDMA y PCA (pero no fenfluramina) pueden ser metabolizados a compuestos con estructura de catecol y quinona, los cuales en su posterior metabolismo forman radicales libres (Graham y col., 1978). Existe información en la literatura que sugiere que la neurotoxicidad de la MDMA está mediada por la formación de un metabolito activo. Mientras que la administración subcutánea de MDMA a ratas produce una extensa destrucción de los terminales axónicos serotoninérgicos (O'Hearn y col., 1986), la

inyección intracerebral no ejerce ningún efecto (Molliver y col., 1986; Paris y Cunningham, 1992). Estos datos sugieren la formación periférica de algún metabolito activo.

MDMA se metaboliza a compuestos con estructura de catecol y quinona (Fig. 43) (Hiramatsu y col., 1990), habiéndose detectado en el cerebro de rata metabolitos de MDMA con estructura de quinona (Hiramatsu y col., 1990; Lin y col., 1997). La autooxidación de catecoles y quinonas puede resultar en la formación de radicales libres, (Chiueh y col., 1993; Hiramatsu y col., 1990).

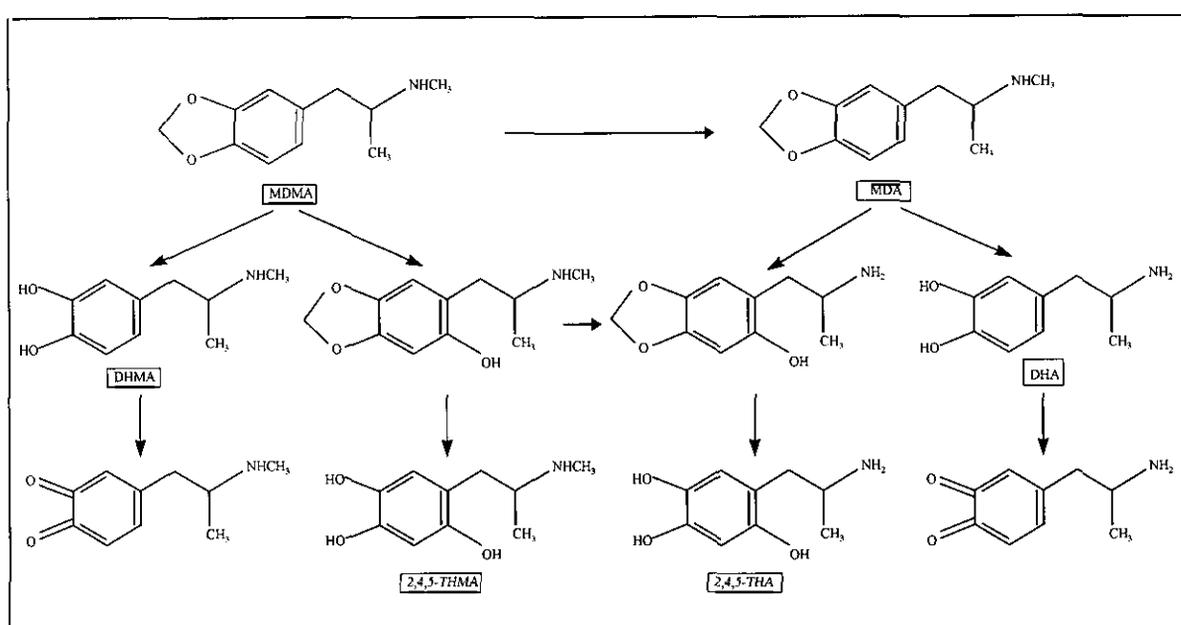


Figura 43. Posibles vías de metabolización de MDMA. DHA: dihidroxianfetamina; DHMA: dihidroximetanfetamina; MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina; MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina; 2,4,5-THA: 2,4,5-trihidroxi-anfetamina; 2,4,5-THMA: 2,4,5-trihidroxi-metanfetamina (Colado y Green, 1995).

PCA se metaboliza a 3-cloro-4-hidroxianfetamina (Fig. 44, Parli y Schmidt, 1975), produce reactivos intermedios (Miller y col., 1986) y se puede predecir que es metabolizada a metabolitos catecólicos estructuralmente similares a aquellos producidos durante el metabolismo de la MDMA.

Fenfluramina, por el contrario, es metabolizada principalmente por una vía que deja el anillo inalterado con la formación de norfenfluramina y ácido trifluorometilbenzoico (Fig. 45, Campbell, 1971; Caccia y col., 1982).

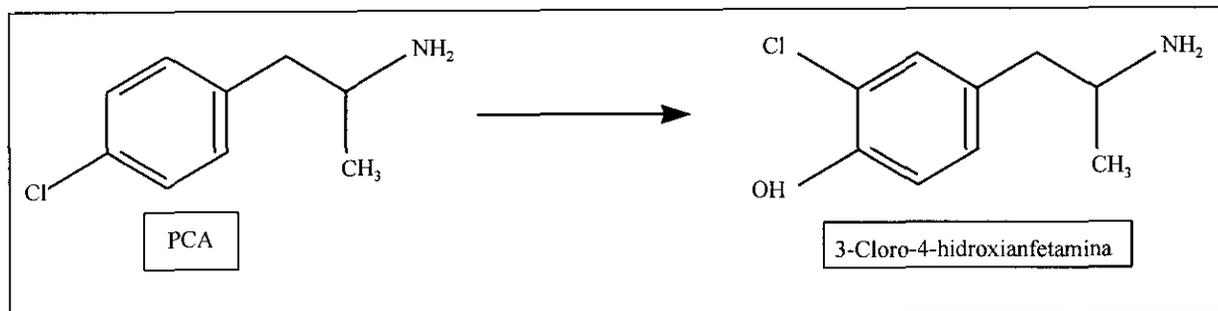


Figura 44. Principal vía de metabolización de PCA.

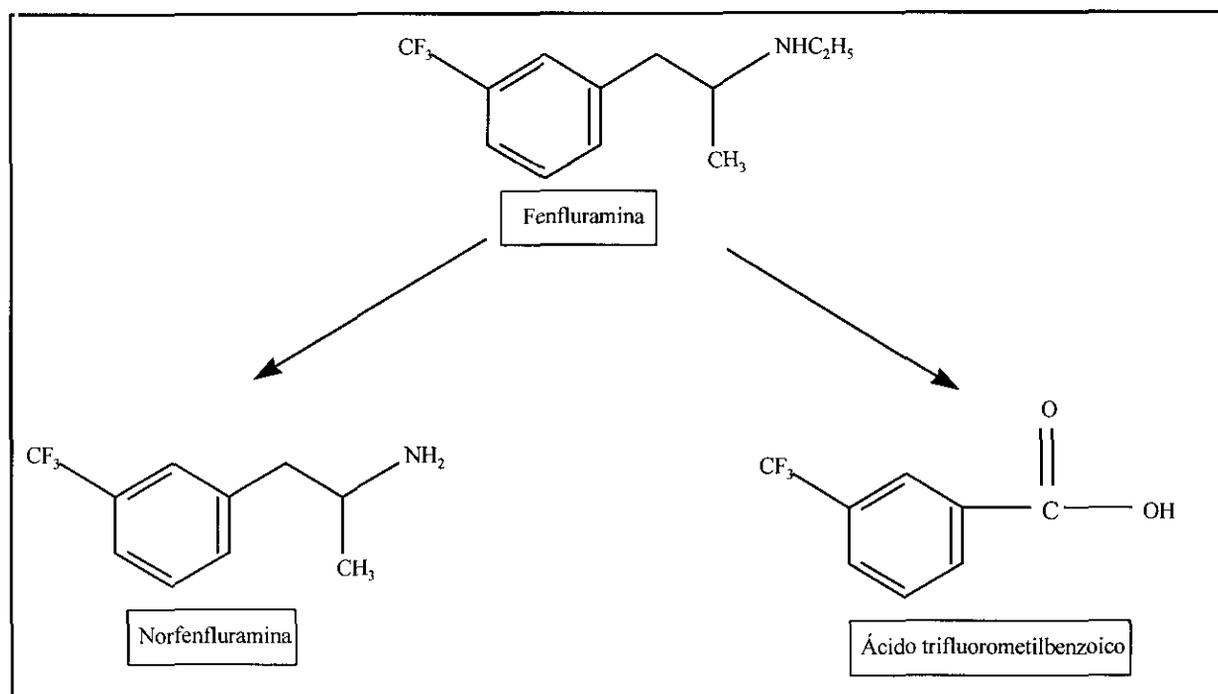


Figura 45. Principales vías de metabolización de fenfluramina

Los radicales hidroxilo formados tras la administración de MDMA también podrían tener su origen en el catabolismo de la dopamina que se libera masivamente a nivel estriatal inmediatamente después de la administración del compuesto. En el cerebro la DA se oxida por acción de la monoaminoxidasa (MAO) o se autooxida no enzimáticamente. La MAO intraneuronalmente transforma la DA en DOPAC y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Cohen, 1988). El peróxido de hidrógeno produce radicales hidroxilo por la reacción de Fenton en presencia de iones de hierro (Fig. 46) (Halliwell, 1992).

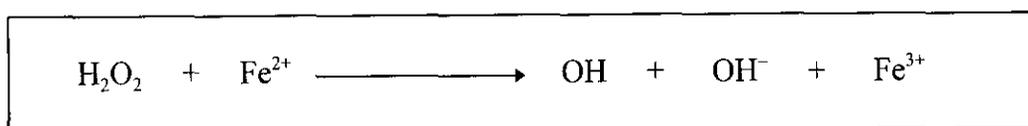


Figura 46. Reacción de Fenton (Halliwell, 1992).

Por autooxidación, el anillo catecol de la DA se transforma en semiquinonas (SQ) o quinonas de DA y especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno y el anión superóxido (O_2^-) (Fig. 47) (Coyle y Puttfarcken, 1993).

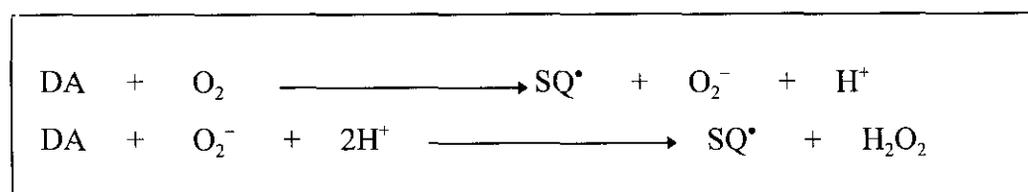


Figura 47. Autooxidación de la dopamina (Coyle y Puttfarcken, 1993).

Esta reacción puede ocurrir de forma espontánea en presencia de hierro u otros metales de transición (Graham, 1978; Hastings, 1995). El radical superóxido no es muy reactivo, por lo tanto, es poco tóxico (Olanow, 1993) y además es dismutado rápidamente por la superóxido dismutasa (SOD) dando lugar a H_2O_2 (Fig. 48) (Halliwell, 1992).

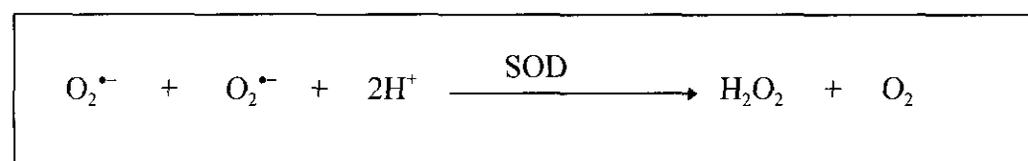


Figura 48. Reacción del anión superóxido con la superóxido dismutasa (Halliwell, 1992).

El peróxido de hidrógeno atraviesa las membranas celulares con mucha facilidad (Halliwell, 1992) y es tóxico en muchos sistemas incluyendo el sistema nervioso central. Sin embargo, su efecto tóxico no es un efecto directo de la molécula sino del radical hidroxilo a que da lugar. El peróxido de hidrógeno es metabolizado normalmente por la enzima catalasa

produciendo agua y oxígeno, pero el cerebro presenta niveles muy bajos de catalasa y relativamente poca cantidad de glutatión peroxidasa (otra enzima encargada de detoxificar H_2O_2) en comparación con el hígado (Halliwell y Gutteridge, 1985; Olanow, 1992). El exceso de H_2O_2 puede dar lugar, mediante la reacción de Fenton, a radicales hidroxilo (Fig. 46).

Entre las especies reactivas de oxígeno, los radicales hidroxilo son los más lesivos (Halliwell, 1992; Coyle y Puttfarcken, 1993). Reaccionan rápidamente con una gran variedad de moléculas biológicas incluyendo el ADN, lípidos de membrana y carbohidratos (Halliwell, 1992).

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema nervioso central contiene niveles bajos de los agentes que protegen frente a los factores oxidativos, y niveles altos de hierro. Estos dos factores, junto con un aumento en la formación de radicales hidroxilo inducido por MDMA, podrían, en conjunto, dar lugar a una situación de estrés oxidativo. El estrés oxidativo se define como un incremento en la generación de especies derivadas del oxígeno que supera la capacidad de las medidas antioxidantes del organismo para neutralizarlas (Halliwell, 1992).

V.2 Dopamina y neurodegeneración por MDMA

Estudios sobre la farmacología de MDMA, así como sobre posibles agentes neuroprotectores, sugieren que la dopamina desempeña un papel en el proceso neurodegenerativo. Por ejemplo, Stone y col. (1988) demostraron que la disminución a largo plazo del contenido de 5-HT cerebral producida por MDMA era atenuada por el inhibidor de la síntesis de dopamina, α -metil-p-tirosina, o por reserpina, compuesto que provoca un vaciamiento de las vesículas de monoaminas. Schmidt y col. (1990b) observaron que la inyección en el estriado de la selectiva neurotoxina dopaminérgica, 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) bloqueaba los efectos neurotóxicos de la MDMA sobre las neuronas serotoninérgicas no solamente en el estriado, sino también en otras regiones del cerebro anterior tales como el hipocampo y la corteza. Además, Stone y col. (1988) indicaron que el inhibidor de la recaptación de dopamina, GBR 12909, era neuroprotector. Finalmente, Schmidt y col. (1990b) y Hewitt y Green (1994) demostraron que la administración aguda del antagonista de

dopamina, haloperidol, junto con MDMA, atenuaba la neurodegeneración de los terminales serotoninérgicos producida por esta anfetamina en cerebro.

Sin embargo, datos obtenidos recientemente aconsejan una re-evaluación crítica de los trabajos publicados acerca del efecto neuroprotector de varios compuestos. Actualmente está demostrado que algunos fármacos atenúan el daño neuronal únicamente porque inducen hipotermia (Farfel y Seiden, 1995a,b; Malberg y col., 1996, Colado y col., 1998a) o, al menos, previenen la hipertermia inducida por MDMA (O'Shea y col., 1998b, Colado y col., 1998b). Concretamente, α -metil-p-tirosina actúa como neuroprotector debido a su capacidad para producir hipotermia (Malberg y col., 1996), y haloperidol, abole la respuesta hipertérmica de la MDMA, de tal manera que cuando los animales se mantienen a una temperatura ambiente alta, el efecto protector del haloperidol desaparece (O'Shea y col., 1998b). Se puede concluir, por tanto, que α -metil-p-tirosina y haloperidol proporcionan protección a causa de su efecto sobre la temperatura corporal y no mediante un mecanismo neuroprotector selectivo.

Estos hallazgos, a su vez, pusieron en duda la validez de hipótesis anteriores según las cuales la dopamina desempeña un papel clave en la expresión de la neurotoxicidad de la MDMA; hipótesis basadas en diversas observaciones, entre ellas el hecho de que la MDMA altera la liberación de dopamina (Johnson y col., 1986; Schmidt y col., 1987; Hiramatsu y Cho, 1990; Nash, 1990; Nash y Brodtkin, 1991) y que la administración de L-3,4-dihidroxifenil alanina (L-DOPA) potencia el daño neuronal inducido por MDMA (Schmidt y col., 1991). Esta controversia nos ha estimulado a llevar a cabo estudios para comprobar la validez de estas observaciones y además, para evaluar si la administración de L-DOPA altera el incremento en la formación de radicales libres que se produce como consecuencia de la inyección de MDMA.

En cuanto a la alteración del metabolismo de la dopamina producido por MDMA, ambos grupos de investigación, Johnson y col. (1986) y Schmidt y col. (1987) demostraron que MDMA inducía la liberación de [3 H]dopamina de cortes de estriado, y Steele y col. (1987) observaron que la MDMA inhibía la recaptación de [3 H]dopamina en sinaptosomas estriatales. Estudios posteriores, mediante técnicas de voltametría *in vivo* (Yamamoto y Spanos, 1988) o microdialisis (Nash, 1990; Hiramatsu y Cho, 1990; Gough y col., 1991) mostraron que la administración de MDMA produce un rápido incremento en la concentración extracelular de

dopamina y una disminución en los niveles de sus metabolitos, los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y homovanílico (HVA). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, utilizando la técnica de la microdiálisis intracerebral *in vivo*, confirman el efecto de la MDMA sobre los niveles estriatales de dopamina, DOPAC y HVA observándose cambios similares a los publicados por los grupos de Nash y Gough en lo que se refiere a la magnitud de la respuesta y a su aparición temporal (Nash, 1990; Gough y col. 1991). Los cambios inmediatos producidos por MDMA sobre los niveles de dopamina y DOPAC son considerablemente mayores que los observados en tejido postmortem 4 h después de la administración de la droga.

Tras la administración de MDMA, la concentración de HVA en el dializado disminuye en una proporción similar a la de DOPAC, sin embargo, los cambios en los niveles extracelulares de HVA aparecen mas tarde que los observados en DOPAC (Fig. 34). Esta diferencia en el tiempo de aparición de los cambios producidos por MDMA sobre los niveles extracelulares de DOPAC y HVA podría reflejar el hecho de que HVA es un metabolito secundario de la dopamina que deriva principalmente del DOPAC que se forma intraneuronalmente, aunque también de manera secundaria se forma a partir de la 3-metoxitiramina que a su vez procede del metabolismo de la dopamina (Westerink & Spaan, 1982). Por lo tanto, la disminución tardía que se observa en los niveles de HVA en relación con los de DOPAC puede ser debido a un incremento inicial en los niveles de 3-metoxitiramina y su posterior conversión a HVA por acción de la catecol-O-metil-transferasa. Estos datos sugieren que la MDMA ejerce dos acciones diferentes sobre la actividad dopaminérgica *in vivo*: la primera consistiría en incrementar la liberación de dopamina, y la segunda en disminuir el metabolismo intraneuronal de este neurotransmisor (reflejado por una reducción en los niveles extracelulares de DOPAC y HVA). Estos cambios en los metabolitos de la dopamina son probablemente el resultado del efecto bloqueante de la MDMA sobre la recaptación de dopamina (menos dopamina estaría disponible para ser metabolizada a DOPAC) y de su capacidad para inhibir la MAO. En el estriado de rata *in vivo*, la dopamina se metaboliza principalmente por la MAO-A (Kato y col., 1986) y la MDMA actúa como un inhibidor competitivo de la actividad de la MAO-A (Leonardi y Azmitia, 1994). Una reducción en la síntesis de dopamina tras la administración de MDMA también explicaría la disminución en la concentración extracelular de DOPAC y HVA; sin embargo, esta hipótesis

es improbable puesto que MDMA no altera la actividad de la tirosina hidroxilasa en el estriado (Stone y col., 1986).

El mecanismo por el cual MDMA aumenta la liberación de dopamina es desconocido. A menudo se ha postulado que la MDMA al igual que otros derivados anfetamínicos potencia la liberación de dopamina por un mecanismo de intercambio facilitado que utiliza el sistema transportador de la recaptación de dopamina (Raiteri y col., 1979; Fischer y Cho, 1979; McMillen, 1983). Sin embargo, varios grupos de investigación han demostrado que los agonistas de los receptores 5-HT₂ potencian la liberación de dopamina inducida por MDMA, mientras que los antagonistas la inhiben (Nash, 1990; Schmidt y col., 1990a, 1994; Yamamoto y col., 1995; Gudelsky y col., 1994). Parece, por tanto, que la liberación de 5-HT inducida por MDMA desempeña un papel clave en la liberación de dopamina. Si a esto se añaden los efectos inhibitorios producidos por MDMA sobre la recaptación de la dopamina (Steele y col., 1987) y sobre la monoaminoxidasa (Leonardi & Azmitia, 1994), se podría sugerir que el intercambio mediado por el transportador no es necesariamente un factor determinante en el incremento de los niveles extracelulares de dopamina subsiguientes a la administración de MDMA.

El aumento en la concentración extracelular de dopamina que se observa tras la administración de MDMA es similar en magnitud al producido por altas dosis de metanfetamina (Baldwin y col., 1994). Sin embargo, MDMA se comporta como una neurotoxina serotoninérgica selectiva, mientras que metanfetamina produce daño neuronal sobre terminales serotoninérgicos y dopaminérgicos (Baldwin y col., 1994). Se podría sugerir, por tanto, que la liberación de dopamina inducida por estos derivados anfetamínicos no está relacionada con los cambios neurodegenerativos, aunque sí con los efectos agudos producidos por ambas anfetaminas sobre el comportamiento. MDMA y metanfetamina originan un incremento de la actividad locomotora, cambios posturales y movimientos estereotipados (Callaway y col., 1990; Callaway y Geyer, 1992), efectos que se han relacionado con un incremento en la liberación de dopamina a nivel del estriado y núcleo *accumbens* (Kelly y col., 1975; Freed y Yamamoto, 1985).

En este estudio observamos que cuando L-DOPA se administra 2 h después de MDMA, la concentración extracelular de dopamina incrementa, por encima de la que se detecta en ratas tratadas con MDMA únicamente, a las 3 h de la administración de la droga. Las concentraciones de DOPAC y HVA también aumentan significativamente en el mismo periodo de tiempo. Estos cambios reflejen la existencia de un incremento en la síntesis y liberación de dopamina provocado por L-DOPA. A pesar de existir un incremento en la liberación de dopamina y posiblemente en la función dopaminérgica, L-DOPA no potenció la neurotoxicidad de la MDMA 7 días más tarde. Estos datos discrepan de los publicados por el grupo de Schmidt (Schmidt y col., 1991). Estos autores observaron que la neurotoxicidad inducida por MDMA es potenciada por L-DOPA. En el estudio llevado a cabo por el grupo de Schmidt se utilizó una dosis de L-DOPA significativamente más alta que la utilizada en esta Tesis Doctoral, dosis que no pudimos evaluar porque provocaba un alto índice de mortalidad. Entre ambos estudios existen evidentes diferencias metodológicas. En el estudio objeto de esta Tesis Doctoral se han utilizado ratas Dark Agouti, raza que está demostrado es más sensible que otras (Sprague Dawley, Wistar y Lister Hooded) a los efectos neurotóxicos de MDMA y *p*-cloroanfetamina (Colado y col., 1995; Murray y col., 1996). No obstante, tras la administración de la dosis más alta posible de L-DOPA, no se detectó potenciación de la neurotoxicidad inducida por MDMA. Tampoco conseguimos inducir neurotoxicidad en ratas inyectadas con una dosis sub-tóxica de MDMA (5 mg kg⁻¹) y L-DOPA, como describieron Schmidt y col., (1991). Aún mas, una dosis baja de MDMA 5 mg kg⁻¹, también aumentó la liberación de dopamina a nivel estriatal y sin embargo, no produjo daño neuronal 7 días mas tarde.

Para investigar más en profundidad esta discrepancia entre nuestros datos y los del grupo de Schmidt (Schmidt y col., 1991) estudiamos el efecto de la L-DOPA sobre la formación de radicales libres inducida por MDMA. La L-DOPA mediante su conversión a dopamina podría incrementar la producción de radicales hidroxilo por autooxidación de la dopamina. De nuevo, no encontramos ninguna evidencia de que el aumento en la concentración de 2,3- y 2,5-DHBA inducido por MDMA fuera potenciado por la administración de L-DOPA. Considerados en conjunto estos resultados indican lo siguiente: 1) no existe una evidencia clara de la participación de la dopamina en la neurotoxicidad de la

MDMA y 2) el incremento en la formación de radicales hidroxilo que se detecta tras la administración de MDMA no procede de la autooxidación de la dopamina.

Un factor que podría explicar esta discrepancia es el grado de hipertermia producido por la administración de L-DOPA a ratas tratadas con MDMA. En nuestro laboratorio y en otros, se ha observado que una hipertermia sostenida potencia el daño neurotóxico producido por MDMA (Colado y col., 1998b; Broening y col., 1995), posiblemente porque la hipertermia conduce a un aumento de la formación de radicales libres (Kil y col., 1996). En el estudio del grupo de Schmidt no se monitorizaron los cambios producidos en la temperatura corporal de los animales. Si la L-DOPA hubiera producido una hipertermia sostenida en la raza de ratas utilizada por estos autores, en lugar del efecto transitorio que nosotros observamos, el daño neurotóxico estaría probablemente aumentado. Sin embargo, este mecanismo no indica que la dopamina desempeñe un papel principal en la neurodegeneración inducida por MDMA tal y como ha sido propuesto por otros (Stone y col., 1988; Schmidt y col., 1991).

Finalmente, señalar que los resultados descritos en esta Tesis Doctoral plantean una pregunta compleja. En la rata, pero no en el ratón (Laverty y Logan, 1990), MDMA produce una pérdida neurodegenerativa de terminales nerviosos serotoninérgicos, dejando los terminales dopaminérgicos inalterados (Schmidt y Kehne, 1990), afirmación que es apoyada por los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral (Tabla 2). Por consiguiente, cabe preguntarse: ¿cuál es el mecanismo implicado en esta selectividad?. Es importante mencionar que metanfetamina que también incrementa los niveles extracelulares de 5-HT y dopamina (Baldwin y col., 1994) y la formación de radicales libres (Giovanni y col., 1995) produce una degeneración neurotóxica de neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas (Gibb y col., 1990; Green y col., 1992; Baldwin y col., 1994). Si nuestra hipótesis fuera correcta y el incremento en la concentración extracelular de dopamina no reflejara un intercambio mediado por el transportador, entonces relativamente poca cantidad de MDMA estaría penetrando en el terminal nervioso dopaminérgico donde sería metabolizado a compuestos neurotóxicos capaces de generar radicales libres por autooxidación. Esto podría explicar, en parte, la carencia de un efecto neurotóxico de MDMA sobre los terminales nerviosos dopaminérgicos, puesto que sería razonable asumir que la MDMA se metabolizaría de la misma manera en neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas.

Otra posible explicación para el daño selectivo subsiguiente a la administración de MDMA sería que los metabolitos neurotóxicos de MDMA y metanfetamina difiriesen en su capacidad para producir neurotoxicidad. Se ha demostrado que un metabolito de la MDMA, concretamente dihidroximetilamfetamina (DHMA, Hiramatsu y col., 1990; Colado y col., 1995) postulado como neurotóxico, no es tóxico para las neuronas dopaminérgicas (Johnson y col., 1992).

Como resumen de lo anterior señalar que los resultados mencionados indican que MDMA ejerce un efecto agudo y pronunciado sobre el metabolismo de la dopamina en cerebro pero no hay evidencia de que estos cambios estén implicados en la degeneración neurotóxica producida a largo plazo sobre neuronas serotoninérgicas por esta droga de abuso.

VI. CONCLUSIONES

1. MDMA provoca una destrucción de los terminales nerviosos serotoninérgicos en el cerebro de la rata por un mecanismo que implica la formación de radicales hidroxilo. Estas especies reactivas de oxígeno no proceden de la metabolización de la dopamina que se libera masivamente tras la administración de la droga.
2. El incremento en la formación de radicales hidroxilo subsiguiente a la administración de MDMA se produce en los terminales nerviosos serotoninérgicos.
3. El efecto degenerativo de la PCA sobre neuronas serotoninérgicas implica también, probablemente, la producción de radicales libres, mientras que fenfluramina produce daño neuronal por un mecanismo diferente.
4. La hipertermia producida por MDMA no es un factor determinante en los efectos neurotóxicos de la MDMA puesto que PBN atenúa la neurotoxicidad sin alterar la respuesta hipertérmica. La hipertermia tampoco es fundamental en el proceso neurodegenerativo producido por fenfluramina; esta anfetamina es equipotente a la MDMA para producir daño neuronal y sin embargo no altera la temperatura corporal de los animales.
5. MDMA, inmediatamente después de su administración, modifica significativamente el metabolismo de la dopamina en el cerebro de la rata, pero no hemos encontrado ninguna evidencia indicativa de que este efecto esté relacionado con la degeneración de terminales serotoninérgicos producida a largo plazo por la MDMA.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Addae, J.I. y Stone, T.W. (1988) Effects of anticonvulsants on responses to excitatory amino acids applied topically to rat cerebral cortex. *Gen. Pharmacol.*, 19:455-462.

Ahtee, L. (1975) Dextromethorphan inhibits 5-hydroxytryptamine uptake by human blood platelets and decreases 5-hydroxyindoleacetic acid content in rat brain. *J. Pharm. Pharmacol.*, 27:177-180.

Ali, S.F., Newport, G.D., Scallet, A.C., Binienda, Z., Ferguson, S.A., Bailey, J.R., Paule, M.G. y Slikker, W. Jr (1993) Oral administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) produces selective serotonergic depletions in the nonhuman primate. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:91-96.

Ames, M.M., Nelson, S.D., Lovenberg, W. y Sasame, H.A. (1977). Metabolic activation of para-chloroamphetamine to a chemically reactive metabolite. *Commun. Psychopharmacol.*, 1:455-460.

Anderson, G.M., Braun, G., Braun, U., Nichols, D.E. y Shulgin, A.T. (1978) Absolute configuration and psychotomimetic phenylalkylamines. *NIDA Research Monograph*, 22, Rockville, Maryland, EE.UU.

Appel, N.M., Contrera, J.F. y De Souza, E.B. (1989) Fenfluramine selectively and differentially decreases the density of serotonergic nerve terminals in rat brain: evidence from immunocytochemical studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 249:928-943.

Auerbach, S.B., Minzenberg, M.J. y Wilkinson, L.O. (1989) Extracellular serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in hypothalamus of the unanesthetized rat measured by in vivo dialysis coupled to high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: dialysate serotonin reflects neuronal release. *Brian Res.*, 499:281-290.

Azmitia, E.C., Murphy, R.B. y Whitaker-Azmitia, E.C. (1990) MDMA (Ecstasy) effects on cultured neurons: evidence for Ca²⁺-dependent toxicity linked to release. *Brain Res.*, 510:97-103.

Baldwin, H.A., Colado, M.I., Murray, T.K., De Souza, R.J. y Green, A.R. (1993) Striatal dopamine release *in vivo* following neurotoxic doses of the neuroprotective drugs, chlormethiazole and dizocilpine. *Br. J. Pharmacol.*, 108:590-596.

Barrett, P.J. y Taylor, G.T. (1993) 'Ecstasy' ingestion: a case report of severe complications. *J. R. Soc. Med.*, 86:233-234.

Battaglia, G., Yeh, S.Y. y De Souza, E.B. (1988) MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 29:269-274.

Battaglia, G., Yeh, S.H., O'Hearn, E., Kuhar, M.J., Molliver, M.E. y De Souza, E.B. (1987) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin

- terminals in rat brain: Quantification of neurodegeneration by measurements of [³H] paroxetine-labeled serotonin uptake sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242:911-916.
- Battaglia, G., Zaczek, R. y De Souza, E.B. (1990) MDMA effects in the brain: Pharmacologic profile and evidence of neurotoxicity from neurochemical and autoradiographic studies. En: *Ecstasy: The Clinical, Pharmacological and Neurotoxicological Effects of the Drug MDMA*. (ed. Peroutka, S.J.), Kluwer Academic Press, Norwell, Massachusetts, pp. 151-170.
- Bedford-Russell, A.R., Schwartz, R.H. y Dawling, S. (1992) Accidental ingestion of "ecstasy" (3,4-methylenedioxymethamphetamine). *Arch. Dis. Child.*, 67:1114-1115.
- Benazzi, F. y Mazzoli, M. (1991) Psychiatric illness associated with MDMA ('ecstasy') abuse. *Lancet*, 338:1520.
- Benkirane, S., Arbilla, S. Langer, S.Z. (1987) A functional response to D₁ dopamine receptor stimulation in the central nervous system: inhibition of the release of [³H]serotonin from the rat substantia nigra. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 335:502-507.
- Benveniste, H. (1989) Brain Microdialysis. *J. Neurochem.*, 52:1667-1679.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. y Diemer, N.H. (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracellular microdialysis. *J. Neurochem.*, 43:1369-1374.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. y Diemer, N.H. (1987) Regional cerebral glucose phosphorylation and blood flow after insertion of a microdialysis fiber through the dorsal hippocampus in the rat. *J. Neurochem.*, 49:729-734.
- Benveniste, H., Hansen, A.J. y Ottosen, N.S. (1989) Determination of rat brain interstitial concentrations by microdialysis. *J. Neurochem.*, 52:1741-1750.
- Berger, U.V., Gu, X.F. y Azmitia, E.C. (1992) The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, *p*-chloroamphetamine, and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. *Eur. J. Pharmacol.*, 215:153-160.
- Binierki, S. y Krajewski, E. (1960) Preparation of dl-1-(3,4-methylenedioxyphenyl)-2-(methylamino)propane. *Acta Polon. Pharm.*, 17:421-425.
- Binierki, S., Muszynski, E., Jagiellowicz, H. y Chojnacka, Z. (1962) Preparation of 1,N-dimehtylveratrylethylamine and 1,N-dimethylpiperonylethylamine. *Acta Polon. Pharm.*, 19:31-35.
- Bonanno, G., Fassio, A., Severi, P., Ruelle, A. y Raiteri, M. (1994) Fenfluramine releases serotonin from human brain nerve endings by a dual mechanism. *J. Neurochem.*, 63:1163-1166.

- Bowyer, J.F., Scallet, A.C., Holson, R.R., Lipe, G.W., Slikker, W. y Ali, S.F. (1991) Interactions of MK-801 with glutamate- glutamine- and methamphetamine-evoked release of [³H]-dopamine from striatal slices. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257:262-270.
- Bradberry, C.W., Sprouse, J.S., Aghajanian, G.K. y Roth, R.H. (1990) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced release of endogenous serotonin from the rat dorsal raphe nucleus in vitro: effects of fluoxetine and tryptophan. *Neurochem. Int.*, 17:509-513.
- Braun, U., Shulgin, A.T. y Braun, G. (1980) Centrally active N-substituted analogs of 3,4-methylenedioxyphenylisopropylamine (3,4-methylenedioxyamphetamine). *J. Pharm. Sci.*, 69:192-195.
- Breese, G.R., Cooper, B.R. y Mueller, R.A. (1974) Evidence for involvement of 5-hydroxytryptamine in the actions of amphetamine. *Br. J. Pharmacol.*, 52:307-314.
- Brodkin, J., Malyala, A. Nash, J.F. (1993) Effect of acute monoamine depletion on 3,4-methylenedioxyamphetamine-induced neurotoxicity. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 45:647-653.
- Broening, H.W., Bower, J.F. y Slikker, W. Jr. (1995) Age-dependent sensitivity to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant (±)-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275:325-333.
- Brown, C. y Osterloh, J. (1987) Multiple complications from recreational ingestion of MDMA ('Ecstasy'). *JAMA*, 258:780-781.
- Busto, R., Dietrich, W.D., Globus, M.Y., Valdes, A., Steinberg, P. y Gringberg, W.D. (1987) Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 7 :729-738.
- Butcher, S.P., Fairbrother, I.S., Kelly, J.S. Arbuthnott, G.W. (1988) Amphetamine-induced dopamine release in the rat striatum: an *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.*, 50:347-355.
- Caccia, S., Ballabio, M., Guiso, G., Rochetti, M y Garattini, S. (1982) Species differences in the kinetics and metabolism of fenfluramine isomers. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 258:15-28.
- Cadet, J.L., Ladenheim, B., Baum, I., Carlson, E. y Epstein, C. (1994) CuZn-superoxide dismutase (CuZn SOD) transgenic mice show resistance to the lethal effects of methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxyamphetamine (MDMA). *Brain. Res.*, 655:259-262.

- Callaway, C.W. y Geyer, M.A. (1992) Stimulant effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in the nucleus *accumbens* of rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 214:45-51.
- Callaway, C.W., Rempel, N., Peng, R.Y. y Geyer, M.A. (1992) Serotonin 5-HT₁ like receptors mediate hyperactivity in rats induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neuropsychopharmacology*, 7:113-127.
- Campbell, D.B. (1971) Plasma concentration of fenfluramine and its metabolite, norfenfluramine, after a single and repeated oral administration. *Br. J. Pharmacol.*, 43:465P-466P.
- Campkin, N.T.A. y Davies, U.M. (1992) Another death from ecstasy. *J. R. Soc. Med.*, 85:61.
- Cao, W., Carney, J.M., Duchon, A., Floyd, R.A. y Chenon, M. (1988) Oxygen free radicals involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci. Lett.*, 88:233-238.
- Capdevila, M. (1995) *MDMA o el Éxtasis químico*. Los Libros de la Liebre de Marzo, Barcelona.
- Cappon, G.D., Broening, H.W., Pu, C., Morford, L. y Vorhees, C.V. (1996) α -Phenyl-N-*tert*-butyl nitron attenuates methamphetamine-induced deletion of striatal dopamine without altering hyperthermia. *Synapse*, 24:173-181.
- Carlsson, A., Kehr, W., Lindqvist, M., Magnusson, T. y Atack, C.V. (1972) Regulation of monoamine metabolism in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 24:371-384.
- Carney, J.M. y Floyd, R.A. (1991) Protection against oxidative damage to CNS by α -phenyl-*tert*-butyl-nitron (PBN) and other spin-trapping agents. A novel series of nonlipid free radical scavengers. *J. Mol. Neurosci.*, 3:47-57.
- Carpenter, C.L., Marks, S.S., Watson, D.L. y Greenberg, D.A. (1988) Dextromethorphan and dextrorphan as calcium channel antagonists. *Brain Res.*, 439:372-375.
- Chadwick, I. S., Linsby, A., Freemont, A.J., Doran, B., Curry, P.D. (1991) Ecstasy, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), a fatality with coagulopathy and hyperthermia. *J. Royal Soc. Med.*, 84:371.
- Chang, A.S., Frinka, J.V., Chen, D.N. y Lam, D.M. (1989) Characterization of a genetically reconstituted high-affinity system for serotonin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:9611-9615.
- Cheng, H. Y, Liv, T., Feuerstein, G. y Barone, F.C. (1993) Distribution of spin trapping compounds in rat blood and brain: In vivo microdialysis determination. *Free Rad. Biol. Med.*, 14:243-250.

Chiueh, C.C., Krishna, G., Tulsi, P., Obata, T., Lang, K., Huang, S.J. y Murphy, D.L. (1992) Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus: effect of MPP⁺. *Free Rad. Biol. Med.*, 13:581-583.

Chiueh, C.C., Myyake, H. y Peng, M.-T. (1993) Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced Parkinsonism. *Adv. Neurol.*, 60:251-258.

Cho, A.K. Masayuki, H., DiStefano, E.W., Chang, A.S., Jenden, D.J. (1990) Stereochemical differences in the metabolism of 3,4-methylenedioxymethamphetamine *in vivo* and *in vitro*: A pharmacokinetic analysis. *Metab. Dispos.*, 18:686-691.

Choi, D.W., Peters, S. y Viseskul, V. (1987) Dextrorphan and levorphanol selectively block N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity on cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242:713-720.

Clineschmidt, B.V., Zacchei, A.G., Totaro, J.A., Pflüger, A.B., McGuffin, J.C. y Wishousky, T.I. (1978) Fenfluramine and brain serotonin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 305:222-241.

Clow, D.W., y Jhamandas, K. (1989) Characterization of L-glutamate action on the release of endogenous dopamine from the rat caudate-putamen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248:722-728.

Cohen, G. (1988) Oxygen radicals and Parkinson's disease. En: *Oxygen Radicals and Tissue Injury*. (ed. Halliwell, B.), FASEB, Bethesda, Maryland, EE.UU., pp. 130-135.

Colado, M.I. (1998) Neurotoxicidad inducida por MDMA y su prevención farmacológica. En: *Éxtasis (MDMA): Un abordaje comprehensivo*. (ed. Bobes García, J., Lorenzo Fernández, P y Sáiz Martínez, P.A.), Masson, Barcelona, pp. 41-72.

Colado, M.I., Esteban, B., O'Shea, E., Granados, R. y Green, A.R. (1998a) Evidence that pentobarbitone protects against MDMA-induced neurodegeneration because of hypothermia. Fourth IUPHAR Satellite Meeting on Serotonin, Rotterdam, Holanda.

Colado, M.I., Granados, R., O'Shea, E., Esteban, B. y Green, A.R. (1997a) The role of temperature in the neurodegenerative effect of clomethiazole against MDMA-induced degeneration in rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 122: 304P.

Colado, M.I., Granados, R., O'Shea, E., Esteban, B., y Green, A.R. (1998b) The role of hyperthermia in the mechanism of protection by clomethiazole against MDMA ('ecstasy')-induced neurodegeneration, comparison with the novel NMDA antagonist AR-R1589AR. *Br. J. Pharmacol.*, (en prensa).

Colado, M.I. y Green, A.R. (1994) A study of the mechanism of MDMA ('Ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT neurones using chlormethiazole, dizocilpine and other protective compounds. *Br. J. Pharmacol.*, 111:131-136.

Colado, M.I. y Green, A.R. (1995) The spin trap reagent α -phenyl-N-tert-butyl nitron prevents neurodegeneration following administration of "ecstasy". *Eur. J. Pharmacol.*, 280, 343-346.

Colado, M.I., Murray, T.K. y Green, A.R. (1993) 5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *Br. J. Pharmacol.*, 108:583-589.

Colado, M.I., O'Shea, E., Granados, R., Murray, T.K. y Green, A.R. (1997b) A study of the neurotoxic effect of 'ecstasy' (MDMA) on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy. *Br. J. Pharmacol.*, 121:827-833.

Colado, M.I., Williams, J.L., Green, A.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.

Commins, D.L., Vosmer, G., Virus, R.M., Woolverton, W.L., Schuster, C.R. y Seiden, L.S. (1987a). Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241:338-345.

Commins, D.L., Axt, K.J., Vosmer, G., Seiden, L.S. (1987b) Endogenously produced 5,6-dihydroxytryptamine may mediate the neurotoxic effects of p-chloroamphetamine. *Brain Res.*, 419:253-261.

Commins, D.L., Axt, K.J., Vosmer, G., Seiden, L.S. (1987c) 5,6-Dihydroxytryptamine, a serotonergic neurotoxin, is formed endogenously in rat brain. *Brain Res.*, 403:7-14.

Commins, D.L., Vosmer, G., Virus, R.M., Woolverton, C.R., Schuster, C.R. y Seiden, L.S. (1987a) Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241:338-345.

Coyle, J.T. y Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262:689-695.

Coyle, J.T. y Schwarcz, R. (1976) Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 263:244-246.

Creighton, F.J., Black, D.L., Hide, C. E. (1991) Ecstasy psychosis and flashbacks. *Br. J. Psychiatry*, 159:713-715.

Cross, A.J., Misra, A., Sandilands, A., Taylor, M.J. y Green, A.R. (1993b) Effect of chlormethiazole, dizocilpine and pentobarbital on harmaline-induced increase of cerebellar cyclic GMP and tremor. *Psychopharmacology*, 111:96-98.

Cross, A.J., Snape, M.F. y Green, A.R. (1993a) Chlormethiazole antagonises seizures induced by *N*-methyl-D-aspartate without interacting with the NMDA receptor complex. *Psychopharmacology*, 112:403-406.

Cross, A.J., Stirling, J.M., Robinson, T.N., Bowen, D.M., Francis, P.T. y Green, A.R. (1989) The modulation by chlormethiazole of the GABA_A-receptor complex in rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, 98:284-290.

Dafters, R.I. (1994) Effect of ambient temperature on hyperthermia and hyperkinesia induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") in rats. *Psychopharmacology*, 114:505-508.

Dahlström, A., Fuxe, K. y Hillarp, N.-A. (1965) Site of action of reserpine. *Acta Pharmacol.Toxicol.*, 22:277-292.

Davis, W.M., Catravas, J.D., Waters, I.W. (1986) Effects of an i.v. lethal dose of MDA in the dog and antagonism by chlorpromazine. *Gen. Pharmacology*, 17(2):179-183.

De Deurwaerdère, P., Bonhomme, N., Le Moal, M. y Spampinato, U. (1995) *d*-Fenfluramine increases striatal extracellular dopamine in vivo independently of serotonergic terminals or dopamine uptake sites. *J. Neurochem.*, 65:1100-1108.

Directiva 92/109/EEC de la Unión Europea.

De Souza, E.B., Battaglia, G. y Insel, T. (1990) Neurotoxic effects of MDMA on brain serotonergic neurons: Evidence from neurochemical and radioligand binding studies. *N. Y. Acad. Sci.*, 600:682-698.

De Souza, E.B. y Battaglia, G. (1989) Effects of MDMA and MDA on brain serotonin neurons: Evidence from neurochemical and autoradiographic studies. En: *Pharmacology and Toxicology of Amphetamine and Related Drugs*. (ed. Ashgar, K. y De Souza, E.B.), NIDA Research Monograph, Rockville, pp.196-222.

Dowling, G.P., McDonough, E.T., Bost, R.O. (1987) "Eve" and "Ecstasy": A report of five deaths associated with the use of MDEA and MDMA. *JAMA*, 257:1615-1617.

Downing, J. (1986) The psychological and physiological effects of MDMA on normal volunteers. *J. Psychoactive Drugs*, 18:335-340.

Dray, A. (1979) The striatum and substantia nigra: a commentary on their relationships. *Neuroscience*, 4:1407-1439.

Dray, A., Davies, J., Oakley, N.R., Tongroach, P. y Vellucci, S. (1978) The dorsal and median raphe projections to the substantia nigra in the rat: Electrophysiological, biochemical and behavioral observations. *Brain Res.*, 151:431-442.

- Drew, K.L., O'Connor, W.T., Keher, J. y Ungerstedt, U. (1989) Characterization of gamma-aminobutyric acid and dopamine overflow following acute implantation of a microdialysis probe. *Life Sci.*, 45:1307-1317.
- Duhault, J. y Verdavainne, C. (1967) Modification du taux de serotonine cerebrale chez le rat par le trifluoromethyl-phenyl-2-ethyl aminopropane (fenfluramine 768 2.). *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.*, 170:276-286.
- Duxbury, A.J. (1993) Ecstasy - dental implications. *Br. Dent. J.*, 175:38.
- Dyckhuizen, R.S., Brunt, P.W., Atkinson, P., Simpson, J.G., Smith, C.C. (1995) Ecstasy induced hepatitis mimicking viral hepatitis. *Gut*, 36:939-941.
- Eisner, B. (1989) Ecstasy: The MDMA Story. Ronin Publishing Inc., Berkeley.
- Elks, J. y Hey, D.H. (1943) β -3,4-methylenedioxyphenylisopropylamine. *J. Chem. Soc.*, 15-16.
- Evans, J.G., Feuerlein, W., Glatt, M.M., Kanowski, S. y Scott, D.B. (1986) Chlormethiazole 25 years: recent developments and historical perspectives. *Acta Psychiat. Scand.*, 73:198-219.
- Farfel, G.M. y Seiden, L.S. (1995a) Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. I. Experiments using 3,4-methylenedioxymethamphetamine, dizocilpine, CGS 19755 and NBQX. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272:860-867.
- Farfel, G.M. y Seiden, L.S. (1995b) Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. II. Experiments with methamphetamine, p-chloramphetamine, fenfluramine, dizocilpine and dextromethorphan. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 272:868-875.
- Fibiger, H.C., y Miller, J.J. (1977) An anatomical and electrophysiological investigation of the serotonergic projection from the dorsal raphe nucleus to the substantia nigra in the rat. *Neuroscience*, 2:975-987.
- Finnegan, K.T., Ricaurte, G.A., Ritchie, L.D., Irwin, Y., Peroutka, S.J. y Langston, J.W. (1988) Orally administered MDMA causes a long-term depletion of serotonin in rat brain. *Brain Res.*, 447:141-144.
- Finnegan, K.T., Skratt, J.J., Irwin, Y. y Langston, J.W. (1989) The N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist, dextrorphan, prevents the neurotoxic effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in rats. *Neurosci. Lett.*, 105:300-306.
- Fischer, C., Hatzidimitriou, G., Wlos, J., Katz, J. y Ricaurte, G. (1995) Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animales previously exposed to the recreational drug (\pm)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *J. Neurosci.*, 15:5476-5485.
- Fischer, J.F. y Cho, A.K. (1979) Chemical release of dopamine from striatal homogenates: Evidence for an exchange diffusion model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208:203-209.

Fitzgerald, R.L., Blanke, R.V., Rosencrans, J.A., Glennon, R.A. (1989) Stereochemistry of the metabolism of MDMA to MDA. *Life Sci.*, 45:295-301.

Fitzgerald, J.L., y Reid, J.J. (1993) Interactions of methylenedioxymethamphetamine with monoamine transmitter release mechanisms in rat brain slices. *Naunyn Schmeideberg's Arch. Pharmacol.*, 347:313-323.

Fleckenstein, A. E., Wilkins, D.G., Gibb, J.W. y Hanson, G.R. (1997) Interaction between hyperthermia and oxygen radical formation in the 5-hydroxytryptaminergic response to a single methamphetamine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283:281-285.

Flórez, J. y Pazos, A. (1997) Neurotransmisión en el sistema nervioso central. En: *Farmacología humana*, (ed. Flórez, J., Armijo, J.A. y Mediavilla, A.), Masson, Barcelona, pp.409-434.

Floyd, R.A. (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.*, 4:2587-2597.

Floyd, R.A., Watson, J.J. y Wong, P.K. (1984) Sensitive assay of hydroxyl free radical formation utilizing high pressure liquid chromatography with electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10:221-235.

Fonnun, F. (1988) Transmitter glutamate in mammalian hippocampus and striatum. En: *Glutamine and glutamate in mammals*. (ed. Kvamme, E.), Boca Ratón, CRC Press, 2:57-69.

Frederick, D.L., Ali, S.F., Slikker, W. Jr., Gillam, M.P., Allen, R.R. y Paule, M.G. (1995b) Behavioral and neurochemical effects of chronic methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treatment in rhesus monkeys. *Neurotoxicol. Teratol.*, 17:531-543.

Frederick, D.L., Gillam, M.P., Allen, R.R. y Paule, M.G. (1995a) Acute effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on several complex brain functions in monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 51:301-307.

Fredriksson, A., Eriksson, P. y Archer, T. (1997) MTPT-induced deficits in motor activity: neuroprotective effects of the spin trapping agent, alpha-phenyl-tert-butyl-nitron (PBN). *J. Neural. Transm.*, 104:579-592.

Freed, C.R. y Yamamoto, B.K. (1985) Regional brain dopamine metabolism: A marker for the speed, direction and posture of moving animals. *Science*, 229:62-65.

Freger, B., van Amsterdam, C., Seyfried, C. y Kuschinsky, K. (1998) Effects of α -phenyl-tert-butyl-nitron and selegiline on hydroxyl free radicals in rat striatum produced by local application of glutamate. *J. Neurochem.*, 70:276-280.

Frey, H.H. y Magnussen, M.P. (1968) Different central mediation of the stimulant effects of amphetamine and its p-chloro analogue. *Biochem. Pharmacol.*, 17:1299-1307.

Fujisawa, T. y Deguchi, Y. (1954) Utilization of safrole as medical raw material. VI. New synthesis of 3,4-methylenedioxybenzyl methyl ketone. *J. Pharm. Soc. Jpn.*, 74:975-977.

Fuller, R.W. (1985) Persistent effects of amphetamine, *p*-chloroamphetamine, and related compounds on central dopamine and serotonin neurons in rodents. *Psychopharmacol. Bull.*, 21:528-532.

Fuller, R.W., Perry, K.W. y Molloy, B.B. (1975) Reversible and irreversible phases of serotonin depletion by 4-chloroamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 33:119-124.

Fuller, R.W., Snoddy, H.D. y Robertson, D.W. (1988) Mechanisms of effects of *d*-fenfluramine on brain serotonin metabolism in rats: uptake inhibition versus release. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 30:715-721.

Fuller, R.W., Snoddy, H.D., Wong, D.T. y Bymaster, F.P. (1978) Studies on mazindol as an amine uptake inhibitor. *Commun. Psychopharm.*, 2:223-230.

Fuxe, K., Larnebo, L.-O., Hemberger, B. y Ogren, S.-O. (1975) On the *in vivo* and *in vitro* actions of fenfluramine and its derivatives on central monoamine neurons, especially 5-hydroxytryptamine neurons, and their relation to the anorectic activity of fenfluramine. *Postgrad. Med. J.*, 51:35-45.

Gal, E.M. (1976) The effects of intraventricularly administered *p*-chloroamphetamine and its analogs. *Psychopharmacol. Bull.*, 12:52-54.

Gamella, J.F. y Roldán, A.A. (1997) Drogas de síntesis en España. Patrones y tendencias de adquisición y consumo. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Ediciones Doce Calles, S.L.

Garattini, S., Jory, A., Buczko, W. Samanin, R. (1975) The mechanism of action of fenfluramine. *Postgrad. Med. J.*, 51:27-35.

Gedhill, J.A., Moore, D.F., Bell, D. y Henry, J.A. (1993) Subarachnoid hemorrhage associated with MDMA abuse. *J. Neurol. Neurosur. Psych.*, 56:1036-1037.

Gibb, J.W., Stone, D., Johnson, M. y Hanson, G.R. (1990) Neurochemical effects of MDMA, En: *Ecstasy: The Clinical, Pharmacological and Toxicological Effects of the Drug MDMA*. (ed. Peroutka, S.J.), Kluwer Academic Publishers, Boston, pp.133-148.

Giovanni, A., Liang, L.P., Hastings, T.G. y Zigmond, M.J. (1995) Estimating hydroxyl radical content in rat brain using systemic and intraventricular salicylate: impact of methamphetamine. *J. Neurochem.*, 64:1819-1825.

Globus, M.Y.-T., Busto, R., Lin, B., Schnippering, H. y Ginsberg, M.D. (1995) Detection of free radical formation during transient global ischemia and recirculation: effects on intranschemic brain temperature modulation. *J. Neurochem.*, 65:1250-1256.

González, F.J. y Meyer, U.A. (1991) Molecular genetics of the debrisoquine-sparteine polymorphism. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 50:233-238.

Gorard, D.A., Davies, S.E. y Clark, M.L. (1992) Misuse of Ecstasy. *Br. Med. J.*, 305:309.

Gordon, C.J., Wilkinson, W.P., O'Callaghan, J.P. y Miller, D.B. (1991) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38:339-344.

Gough, B., Ali, S.F., Slikker, W.Jr. y Holson, R. (1991) Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 39:619-623.

Graham, D.G. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.*, 14:633-643.

Graham, D.G., Tiffany, S.M., Bell, Jr, W.R. y Guknecht, J. (1978) Auto-oxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine and related compounds towards C1300 neuroblastoma cells *in vitro*. *Mol. Pharmacol.*, 14:644-653.

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

Green, A.R., Cross, A.J. y Goodwin, G.M. (1995) Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy"). *Psychopharmacology*, 119:247-260.

Green, A.R., Cross, A.J., Snape, M.F. y De Souza, R.J. (1992a) The immediate consequence of middle cerebral artery occlusion on GABA synthesis in mouse cortex and cerebellum. *Neurosci.Lett.*, 138:141-144.

Green, A.R., De Souza, R.J., Williams, J.L., Murray, T.K. y Cross, A.J. (1992b) The neurotoxic effects of methamphetamine on 5-hydroxytryptamine and dopamine in brain: evidence for the protective effect of chlormethiazole. *Neuropharmacology*, 31:315-321.

Green, A.R. y Grahame-Smith, D.G. (1976) Effects of drugs on the processes regulating the functional activity of brain 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 269:487-491.

Green A.R. y Heal, D.J. (1985) The effects of drugs on serotonin-mediated behavioural models. En: *Neuropharmacology of serotonin*. (ed. Green, A.R.), Oxford University Press, Reino Unido, pp.326-365.

Green, A.R. y Murray, T.K. (1989) A simple intravenous method for determining the potencies of anticonvulsants acting through GABAergic mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.*, 41:879-880.

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

Greer, G. y Tolbert, R. (1990) The Therapeutic Use of MDMA. En: *Ecstasy: The Clinical, Pharmacological and Neurotoxicological Effects of the Drug MDMA*. (ed. Peroutka, S.J.), Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, pp.21-35.

Gu, X.F. y Azmitia, E.C. (1993) Integrative transporter-mediated release from cytoplasmic and vesicular 5-hydroxytryptamine stores in cultured neurons, *Eur. J. Pharmacol.*, 235:51-57.

Gudelsky, G.A. y Nash, J.F. (1996) Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J. Neurochem.*, 66:243-249.

Gudelsky, G.A., Yamamoto, B.K. y Nash, J.F. (1994) Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release and serotonin neurotoxicity by serotonin₂ agonists. *Eur. J. Pharmacol.*, 264:325-330.

Hall, E.D., Pazara, K.E. y Braughler, J.M. (1988) 21-Aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. *Stroke*, 19:997-1002.

Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.*, 59:1609-1623.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1985) Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.*, 8:22-26.

Halliwell, B., Kaur, H. y Ingelman-Sundberg, M. (1991) Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note. *Free Radic. Biol. Med.*, 10:439-441.

Hansson, R.C. (1987) Clandestine laboratories production of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Analog*, 9:1-10.

Hardman, H.F., Haavik, C.O., Seevers, M.H. (1973) Relationship of the structure of mescaline and seven analogs to toxicity and behavior in five species of laboratory animals. *Tox. Appl. Pharmacol.* 25:299-309.

Harries, D.P. y De Silva, R. (1992) "Ecstasy" and intracerebral haemorrhage. *Scot. Med. J.*, 37:150-152.

Harrison, N.L. y Simmonds, M.A. (1983) Two distinct interactions of barbiturates and chlormethiazole with the GABAA receptor complex in rat cuneate nucleus *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.*, 80:387-394.

Harvey, J.A. y McMaster, S.E. (1975) Fenfluramine: evidence for a neurotoxic action on a long-term depletion of serotonin. *Psychopharmacol. Comm.*, 1:217-228.

- Harvey, J.A., McMaster, S.E. y Fuller, R.W. (1977) Comparison between the neurotoxic and serotonin-depleting effects of various halogenated derivatives of amphetamine in rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 202:581-589.
- Hastings, T.G. (1995). Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J. Neurochem.*, 64:919-924.
- Hekmatpanah, C.R. y Peroutka, S.J. (1990) 5-Hydroxytryptamine uptake blockers attenuate the 5-hydroxytryptamine-releasing effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and related agents. *Eur. J. Pharmacol.*, 177:95-98.
- Henderson, M.G. y Fuller, R.W. (1992) Dextromethorphan antagonizes the acute depletion of brain serotonin by *p*-chloroamphetamine and H75/12 in rats. *Brain Res.*, 594:323-326.
- Henry, J. (1992) Ecstasy and the dance of death. *BMJ.*, 305:5-6.
- Henry, J.A., Jeffreys, K.J., Dowling, S. (1992) Toxicity and deaths from 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Lancet*, 340:384-387.
- Hensley, K., Carney, J.M., Stewart, C.A., Tabatabaie, T., Pye, Q. y Floyd, R.A. (1997) Nitron-based free radical traps as neuroprotective agents in cerebral ischaemia and other pathologies. En: *Neuroprotective Agents and Cerebral Ischaemia*. (ed. Green, A.R. y Cross, A.J.), Academic Press, London, pp.299-317.
- Hewitt, K.E., y Green, A.R. (1994) Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by the aministration of MDMA ('Ecstasy'). *Neuropharmacology*, 33:1589-1595.
- Hiramatsu, M. y Cho, A.K. (1990) Enantiomeric differences in the effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on extracellular monoamines and metabolites in the striatum of freely-moving rats: an in vivo microdialysis study. *Neuropharmacology*, 29:269-275.
- Hiramatsu, M., Kumangai, Y., Unger, S.E. y Cho, A.K. (1990) Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 254:521-527.
- Huang, N.-K., Wan, F.-J., Tseng, C.-J. Tung, C.-S. (1997) Amphetamine induces hydroxyl radical formation in the striatum of rats. *Life Sci.*, 61:2219-2229.
- Ingelman-Sundberg, M., Kaur, H., Terelius, Y., Persson, J.O. y Halliwell, B. (1991) Hydroxylation of salicylate by microsomal fractions and cytochrome P-450. Lack of production of 2,3-dihydroxybenzoate unless hydroxyl radical formation is permitted. *Biochem. J.*, 276:753-757.

Insel, T.R., Battaglia, G., Johanssen, J., Marra, S. y De Souza, E.B. (1989) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") selectively destroys brain serotonin nerve terminals in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 249:713-720.

Iyer, R.N., Sprouse, J.S., Aghajanian, G.K., Roth, R.H. y Bradberry, C.W. (1994) Tryptophan pretreatment augmentation of p-chloroamphetamine-induced serotonin and dopamine release and reduction in neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 48:1501-1508.

Jaffe, D.B., Marks, S.S. y Greenberg, D.A. (1989) Antagonist drug selectivity for radioligand binding sites on voltage-gated and N-methyl-D-aspartate receptor-gated Ca^{2+} channels. *Neurosci.Lett.*, 105:227-232.

Johnson, M.P., Conarty, P.F. y Nichols, D.E. (1991a) [3H]Monoamine releasing and uptake inhibition properties of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and p-chloroamphetamine analogues. *Eur. J. Pharmacol.*, 200:9-16.

Johnson, M., Elayan, I., Hanson, G.R., Foltz, R., Gibb, J.W., Lim, H.K. (1992) Effects of 3,4-dihydroxymethamphetamine and 2,4,5-trihydroxymethamphetamine, two metabolites of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, on central serotonergic and dopaminergic systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261:447-453.

Johnson, M., Hanson, G.R. y Gibb, J.W. (1988) Effects of dopaminergic and serotonergic receptor blockade on neurochemical changes induced by acute administration of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neuropharmacology*, 27:1089-1096.

Johnson, M.P., Hoffman, A.J. y Nichols, D.E. (1986) Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [3H]serotonin and [3H]dopamine release from superfused rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 132:269-276.

Johnson, M.P., Huang, X., Oberlander, R., Nash, J.F. y Nichols, D.E. (1990) Behavioral, biochemical and neurotoxic actions of the α -ethyl homologue of p-chloroamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 191:1-10.

Jones, C.A., Zempléni, E., Davis, B. y Reynolds, G.P. (1993) Glutamate stimulates dopamine release from the cortical and limbic rat brain in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, 242:183-187.

Kannengiesser, M., Hunt, P.F. y Raynauld, J. (1976) Comparative action of fenfluramine on the uptake and release of serotonin and dopamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 35:35-43.

Kato, T., Dong, B., Ishii, K. Y Kinemuchi, H. (1986) Brain dialysis: In vivo metabolism of dopamine and serotonin by monoamine oxidase A but not B in the striatum of unrestrained rats. *J. Neurochem.*, 46:1277-1282.

Kaufmann, C.A. y Wyatt, R.J. (1987) Neuroleptic malignant syndrome. En: *Psychopharmacology; the third generation of progress* (ed. Meltzer, H.Y.), Raven Press, Nueva York, pp.1421-1430.

- Kelly, P., Seviour, P. y Iverson, S.D. (1975) Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res.*, 94:506-522.
- Kendrick, K.M. (1988) Use of microdialysis in neuroendocrinology. *Meth. Enzymol.*, 168:182-205.
- Kil, Y.Y., Zhang, J. y Piantadosi, L.A. (1996) Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16:100-106.
- Kirsch, J.R., Phelan, A.M., Lange, D.G. y Traystman, R.J. (1987) Reperfusion-induced free radical formation following global ischemia. *Pediatr. Res.*, 21:202A.
- Kleven, M.S., Schuster, C.R. y Seiden, L.S. (1988) Effects of depletion of brain serotonin by repeated fenfluramine on neurochemical and anorectic effects of acute fenfluramine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 246:822-828.
- Kleven, M.S., Woolverton, W.L. y Seiden, L.S. (1989) Evidence that both intragastric and subcutaneously administered MDMA produce 5-HT neurotoxicity in rhesus monkeys. *Brain Res.*, 488:121-125.
- Knecht, K.T. y Mason, R.P. (1993) In vivo spin trapping of xenobiotic free radical metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.*, 303:185-194.
- Köhler, M., Burnashev, N., Sakmann, B. y Seeburg, P.H. (1993) Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron*, 10(3):491-500.
- König, J.F.R. y Klippel, R.A. (1963) The rat brain - a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brainstem. Williams y Wilkins, EE.UU.
- Kreiss, D.S., Wieland, S. Lucki, Y. (1993) The presence of a serotonin uptake inhibitor alters pharmacological manipulations of serotonin release. *Neuroscience*, 52:295-301.
- Kumagai, Y., Lin, L.Y., Hiratsuka, A., Narimatsu, S., Suzuki, T., Yamada, H., Oguri, K., Yoshimura, H. y Cho, A.K (1994) Participation of cytochrome P450-2B and -2D isoenzymes in the demethylenation of methylenedioxymethamphetamine enantiomers by rats. *Mol. Pharmacol.*, 45:359-365.
- Lancelot, E., Revaud, M.-L., Boulu, R.G., Plotkine, M. y Callebert, J. (1997) Alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron attenuates excitotoxicity in rat striatum by preventing hydroxyl radical accumulation. *Free Rad. Biol. Med.*, 23:1031-1034.
- Lassen, J.B. (1974) The effect of p-chloroamphetamine on motility in rats after inhibition of monoamine synthesis, storage, uptake and receptor interaction. *Psychopharmacology*, 34:243-254.

- Laverty, R. y Logan, B.J. (1990) Protection by MK801 and other drugs of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats and mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 183:451-452.
- Lehmann, E.D., Thom, C.H. y Croft, D.N. (1995) Delayed severe rhabdomyolysis after taking ecstasy. *Postgrad. Med. J.*, 71:186-187.
- Leonardi, E.T.K. y Azmitia, E.C. (1994) MDMA (Ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: Comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology*, 10:231-238.
- Lew, R., Sabol, K.E., Chou, C, Vosmer, G.L., Richards, J. y Seiden, L.S. (1996) Methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part II: Radioligand binding and autoradiography studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276:855-865.
- Liester, M.B., Grob, C.S., Bravo, G.L., Walsh, R.N. (1992) Phenomenology of sequelae of 3,4-methylenedioxymethamphetamine use. *J. Nerv. Mental Dis.*, 180:345-352.
- Lim, H.K. y Foltz, R.L. (1991a) *In vivo* formation of aromatic hydroxylated metabolites of 3,4-(methylenedioxy)-methamphetamine in the rat: Identification by ion trap ms/ms and ms/ms/ms techniques. *Biol. Mass Spectrom.*, 20:677-686.
- Lim, H.K. y Foltz, R.L. (1991b) Ion trap tandem mass spectrometric evidence for the metabolism of 3,4-(methylenedioxy)-methamphetamine to the potent neurotoxin 2,4,5-trihydroxymethamphetamine and 2,4,5-trihydroxyamphetamine. *Chem. Res. Toxicol.*, 4:626-632.
- Lim, H.K. y Foltz, R.L. (1988) *In vivo* and *in vitro* metabolism of 3,4-(methylenedioxy)-methamphetamine in the rat: Identification of metabolite using an ion trap detector. *Chem. Res. Toxicol.*, 1:370-378.
- Lin, L.Y, Di Stefano, E.W., Schmitz, D.A., Hsu, L., Ellis, S.W., Lennard, M.S., Tucker, G.T. y Cho, A.K. (1997) Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *Drug Metab. Dispos.*, 25:1059-1064.
- Lindfors, N., Amberg, G. y Ungerstedt, U. (1989) Intracerebral microdialysis: I. Experimental studies of diffusion kinetics. *J. Pharmacol. Meth.*, 22:141-156.
- Logan, B.J., Laverty, R., Sanderson, W.D. y Yee, Y.B. (1988) Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethamphetamine) neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, 152:227-234.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.

- Malberg, J., Sabol, K.E. y Seiden, L.S. (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.
- Manchanda, S. y Connolly, M.J. (1993) Cerebral infarction in association with ecstasy abuse. *Postgrad. Med. J.*, 69:874-889.
- Marsh, J.C., Abboudi, Z.H., Gibson, F.M., Scopes, J., Daly, S., O'Shaunnessy, D.F., Baughan, A.S., Gordon-Smith, E.C. (1994) Aplastic anaemia following exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy"). *Br. J. Haematol.* 88:281-285.
- Maruyama, W., Dostert, P. y Naoi, M. (1995) Dopamine derived 1-methyl-6,7-dihydroxyisoquinolines as hydroxyl radical promoters and scavengers in the rat brain: in vivo and in vitro studies. *J. Neurochem.*, 64:2635-2643.
- Mascaro, Blasco, Barreda, A. y Guevara, J. (1991) Éxtasis: Revisión y puesta al día. *Revista Española de Drogodependencias*, 10:91-100.
- Masseri, V.J., Tizabi, Y. y Sanders-Bush, E. (1978) Evaluation of the neurotoxic effects of *p*-chloroamphetamine: A histological and biochemical study. *Neuropharmacology*, 17:541-548.
- Maura, G., Gemignani, A., Versace, P., Martire, M. y Raiteri, M. (1982) Carrier-mediated and carrier-independent release of serotonin from isolated nerve endings. *Neurochem.Int.*, 4:219-224.
- Maxwell, D.L., Polkey, M.I. y Henry, J.A. (1993) Hyponatremia and catatonic stupor after taking ecstasy. *Br. Med. J.*, 307:1399.
- McCann, U.D. y Ricaurte, G.A. (1991) Major metabolites of (\pm)3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) do not mediate its toxic effects on brain serotonin neurons. *Brain Res.*, 545:279-282.
- McCann, U.D. y Ricaurte, G.A. (1991) Lasting neuropsychiatric sequelae of (\pm) methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') in recreational users. *J. Clin. Psychopharmacol.*, 11:302-305.
- McCann, U.D. y Ricaurte, G.A. (1992) MDMA ('ecstasy') and panic disorder: induction by a single dose. *Biol. Psychiatry*, 32:950-953.
- McCann, U.D., Slate, S.O. y Ricaurte, G.A. (1996) Adverse reactions with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 'Ecstasy'). *Drug Safety*, 15: 107-115.
- McGuire, P.K., Cope, H. y Fahy, T. (1994) Diversity of psychopathology associated with the use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy'). *Br. J. Psychiatry*, 165:391-395.
- McGuire, P. y Fahy, T. (1991) Chronic paranoid psychosis after misuse of MDMA ('ecstasy'). *BMJ*, 302:607.

- McKenna, D.J., Guan, X.-M. y Shulgin, A.T. (1991) 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA) analogues exhibit differential effects on synaptosomal release of ³H-dopamine and ³H-5-hydroxytryptamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38:505-512.
- McKenna, D.J. y Peroutka, S.J. (1990) Neurochemistry and neurotoxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"). *J. Neurochem.*, 54:1-22.
- McMillen, B.A. (1983) CNS stimulants: two distinct mechanisms of action for amphetamine-like drugs. *Trends Pharmacol. Sci.*, 4:429-432.
- Mennini, T., Garattini, S. y Caccia, S. (1985) Anorectic effect of fenfluramine isomers and metabolites: relationship between brain levels and in vitro potencies on serotonergic mechanism. *Psychopharmacology*, 85:111-114.
- Mennini, T., Pataccini, R. y Samanin, R. (1978) Effects of narcotic analgesics on the uptake and release of 5-hydroxytryptamine in rat synaptosomal preparation. *Br. J. Pharmacol.*, 64:75-82.
- Merck, E. (1914) Verfahren zur Darstellung von Alkyloxyaryl-, Dialkyloxyaryl- und Alkylenedioxyarylamino-propanen bzw deren am Stickstoff monoalkylierten Derivaten. Patente alemana #274,350, solicitada 24 diciembre, 1912, otorgada 16 mayo, 1914 a E.Merck en Darmstadt, Alemania.
- Miller, K., Anderholm, D.C. y Ames, M.M. (1986) Metabolic activation of the serotonergic neurotoxin para-chloroamphetamine to chemically reactive intermediates by hepatic and brain microsomal preparations. *Biochem. Pharmacol.*, 35:1737-1742.
- Moghaddam, B. y Bunney, B.S. (1989) Differential effect of cocaine on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens: comparison to amphetamine. *Synapse*, 4:156-161.
- Molliver, M.E., Berger, U.V., Mamounas, L.A., Molliver, D.C., O'Hearn, E.G. y Wilson, M.A., 1990. Neurotoxicity of MDMA and related compounds: Anatomic studies. *N.Y.Acad.Sci.* 640-664.
- Molliver, D.C. y Molliver, M.E. (1990) Anatomic evidence for a neurotoxic effect of (±)-fenfluramine upon serotonergic projections in the rat. *Brain Res.*, 511:165-168.
- Molliver, M.E., O'Hearn, E., Battaglia, G. y De Souza, E.B. (1986) Direct intracerebral administration of MDA and MDMA does not produce serotonin neurotoxicity. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 12:1234.
- Mori, H., Arai, T., Ishii, H., Adachi, T., Endo, N., Makino, K. y Mori, K. (1998) Neuroprotective effects of pterin-6-aldehyde in gerbil global brain ischemia: comparison with those of alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *Neurosci. Lett.*, 241:99-102.

- Mullen, F.M. (1984) Schedules of controlled substances: Proposed placement of 3,4-methylenedioxymethamphetamine into Schedule I. of the Controlled Substances Act. *Fed. Regis.* 49(146):30210-30211.
- Murray, T.K., Williams, J.L., Misra, A., Colado, M.I. y Green, A.R. (1996) The spin trap reagent PBN attenuates degeneration of 5-HT neurones in rat brain induced by p-chloroamphetamine but not fenfluramine. *Neuropharmacology*, 35:1615-1620.
- Nash, J.F. (1990) Ketanserin pretreatment blocks MDMA-induced dopamine release in the striatum as measured by *in vivo* microdialysis. *Life Sci.*, 47:2401-2408.
- Nash, J.F., Arora, R.C., Screiber, M.A. y Meltzer, H.Y. (1991) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on [³H]paroxetine binding in the frontal cortex and blood platelets of rats. *Biochem. Pharmacol.*, 41:79-84.
- Nash, J.F. y Brodtkin, J. (1991) Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced dopamine release: Effect of dopamine uptake inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259:820-825.
- Nash, J.F., Meltzer, H.Y. y Gudelsky, G.A. (1988) Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 245:873-879.
- Nash, J.F., Meltzer, H.Y. y Gudelsky, G.A. (1990) Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on 3,4-dihydroxyphenylalanine accumulation in the striatum and nucleus accumbens. *J. Neurochem.*, 54:1062-1067.
- Nash, J.F. y Nichols, D.E. (1991) Microdialysis studies on 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and structurally related analogues. *Eur. J. Pharmacol.*, 200:53-58.
- Neckers, L.M., Bertilsson, L. y Costa, E. (1976) The action of fenfluramine and p-chloroamphetamine on serotonergic mechanisms: a comparative study in rat brain nuclei. *Neurochem. Res.*, 1:29-35.
- Nedergaard, S., Bolam, J.P. y Greenfield, S.A. (1988) Facilitation of dendritic calcium conductance by 5-hydroxytryptamine in the substantia nigra. *Nature*, 333:174-177.
- Nichols, D.E. (1986) Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: Entactogens. *J. Psychoactive Drugs*, 18:305-333.
- Nichols D.E., Brewster, W.K., Johnson, M.P., Oberlander, R. y Riggs, R.M. (1990) Nonneurotoxic tetralin and indan analogues of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA). *J. Med. Chem.*, 33:703-710.

- Nichols, D.E., Lloyd, D.H., Hoffman, A.J., Nichol, M.B. y Yim, G.K.W. (1982) Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [^3H] serotonin from rat brain synaptosomes. *J. Med. Chem.*, 25:530-535.
- Niddam, R., Arbilla, S., Scatton, B., Dennis, T. y Langer, S.Z. (1985) Amphetamine induced release of endogenous dopamine *in vitro* is not reduced following pretreatment with reserpine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 329:123-127.
- Obata, T. y Yamanaka, Y. (1995) Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation by monoamine oxidase in the rat. *Neurosci. Letts.*, 188:13-16.
- Ogren, S.-O. (1986) Chlormethiazole — mode of action. *Acta Psychiat. Scand.*, 73:13-27.
- Ogren, S.O. y Johansson, C. (1985) Separation of the associative and nonassociative effects of brain serotonin released by p-chloroamphetamine: Dissociable serotonergic involvement in avoidance learning, pain and motor function. *Psychopharmacology*, 86:12-26.
- O'Hearn, E., Battaglia, G., De Souza, E.B., Kuhur, M.J. y Molliver, M.E. (1988) Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: Immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 8:2788-2803.
- Olanow, C.W. (1992) An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 32:2-9.
- Olanow, C.W. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.*, 16:439-444.
- Oliver, C.N., Starke-Reed, P.E., Stadtman, E.R., Liu, G.J., Carney, J.M. y Floyd, R.A. (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:5144-5147.
- Opitz, K. (1967) Anorexigenic phenylalkylamines and serotonin metabolism. *Naunyn-Schmiedenerg's Arch. Pharmacol.*, 259:58-65.
- Osborne, P.G., O'Connor, W.T., Drew, K.L. y Ungerstedt, U. (1990) An *in vivo* microdialysis characterization of extracellular dopamine and GABA in dorsolateral striatum of awake freely moving and halothane anaesthetized rats. *J. Neurosci. Methods*, 34:99-105.
- Osborne, P.G., O'Connor, W.T., Kehr, J. y Ungerstedt, U. (1991) *In vivo* characterization of extracellular dopamine, gaba and acetylcholine from the dorsolateral striatum of awake freely moving rats by chronic microdialysis. *J. Neurosci. Methods*, 37:93-102.
- O'Shea, E., Esteban, B., Granados, R., Green, A.R. y Colado, M.I. (1998b) Role of body temperature on the protection of haloperidol against MDMA-induced neurodegeneration. British Pharmacological Society Meeting, Chester, Reino Unido, P6.

- O'Shea, E., Granados, R., Esteban, B., Colado, M.I. y Green, A.R. (1998a) The relationship between the degree of neurodegeneration of rat brain 5-HT nerve terminals and the dose and frequency of administration of MDMA ('ecstasy'). *Neuropharmacology*, (en prensa).
- Padkin, A. (1994) Treating MDMA ('Ecstasy'). *Anesthesia*, 49:259.
- Pallanti, S. y Mazzi, D. (1992) MDMA (ecstasy) precipitation of panic disorder. *Biol. Psychiatry*, 32: 91-95.
- Parker, E.M. y Cubeddu, L.X. (1986) Effects of d-amphetamine and dopamine synthesis inhibitors on dopamine and acetylcholine neurotransmission in the striatum. II. Release in the presence of vesicular transmitter stores. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 237:193-203.
- Paris, J.M. y Cunningham, K.A. (1991) Lack of serotonin neurotoxicity after intraraphe microinjection of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res. Bull.*, 28:115-119.
- Parli, C.J. y Schmidt, B. (1975) Metabolism of 4-chloroamphetamine to 3-chloro-4-hydroxyamphetamine: evidence for an *in vivo* "NIH Shift" of chlorine. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 10:601-610.
- Paule, M.G., Cranmer, J.M., Wilkins, J.O., Stern, H.P. y Hoffman, E.L. (1988) Quantitation of complex brain function in children: Preliminary evaluation using a nonhuman primate behavioral test battery. *Neurotoxicol.*, 9:367-378.
- Pazos, A. (1997) Mediadores celulares I. Histamina y 5-hidroxitriptamina. Farmacología de la migraña. En: *Farmacología humana*, (ed. Flórez, J., Armijo, J.A. y Mediavilla, A.), Masson, Barcelona, pp.305-326.
- Peroutka, S.J. (1988) Incidence of Recreative Use of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on an Undergraduate Campus. *New Eng. J. Med.*, 317:1542-1543.
- Peroutka, S.J., Newman, H. y Harris, H. (1988) Subjective effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in recreational users. *Neuropsychopharmacology*, 1:273-277.
- Peroutka S.J., Pascoe, N., Faull, K.F. (1987) Monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid in the recreational users of the 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "Ecstasy"). *Res Commun Substance Abuse*, 8:125-138.
- Phillis, J.W. y Cough-Helfman, C. (1990) Protection from cerebral ischemic injury in gerbils with the spin trap agent *N*-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN). *Neurosci. Lett.*, 116:315-319.
- Pifl, C., Pichler, L., Kobinger, W. y Hornykiewicz, O. (1988) The dopamine autoreceptor agonist, B-HT 920, preferentially reduces brain dopamine release *in vivo*: biochemical indices of dopamine, noradrenaline and serotonin in ventriculocisternal perfusates in the cat. *Eur. J. Pharmacol.*, 153:33-44.

- Radzik, D.M., Roston, D.A. y Kissenger, P.T. (1983) Determination of hydroxylated aromatic compounds produced in a superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals by liquid chromatography/electrochemistry. *Analyt. Biochem.*, 131:458-464.
- Raiteri, M., Cerrito, F., Cervoni, A.M. y Levi, G. (1979) Dopamine can be released by two mechanisms differentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 208:195-202.
- Ricaurte, G., Bryan, G., Strauss, L., Seiden, L., Schuster, L. (1985) Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science*, 229:986-988.
- Ricaurte, G.A., DeLanney, L.E., Irwin, I. y Langston, J.W. (1988a) Toxic effect of MDMA on central serotonergic neurons in the primate: Importance of route and frequency of drug administration. *Brain Res.*, 446:165-168.
- Ricaurte, G.A., DeLanney, L.E., Wiener, S.G., Irwin, Y. y Langston, J.W. (1988c) 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates. *Brain Res.*, 474:359-363.
- Ricaurte, G.A., Forno, L.S., Wilson, M.A., DeLanney, L.E., Irwin, I., Molliver, M.E. y Langston, J.W. (1988b) (\pm)3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *JAMA*, 260:51-55.
- Ricaurte, G.A., Martello, A.L., Katz, J.L. y Martello, M.B. (1992) Lasting effects of (\pm)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on central serotonergic neurons in nonhuman primates: Neurochemical observations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261:616-622.
- Roberts, L. y Wright, H. (1993) Survival following intentional massive overdose of 'ecstasy'. *J. Accid. Emerg. Med.*, 11:53-54.
- Ross, S.B. (1976) Antagonism of the acute and long-term biochemical effects of 4-chloroamphetamine on the 5-HT neurons in the rat brain by inhibitors of the 5-hydroxytryptamine uptake. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 39:456-476.
- Rothwell, P.M. y Grant, R. (1993) Cerebral venous sinus thrombosis induced by ecstasy. *J. Neurol. Neurosur. Psych.*, 56:1035.
- Rowland, N.E., y Carlton, J. (1986) Neurobiology of an anorectic drug: fenfluramine. *Prog. Neurobiol.*, 27:13-62.
- Rudnick, G. y Wall, S.C. (1992) The molecular mechanism of Ecstasy [3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:1817-1821.
- Sabol, K.E., Lew, R., Richards, J.B., Vosmer, G.L. y Seiden, L.S. (1996) Methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part I: Synaptosomal uptake and tissue concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 276:846-854.

Sabol, K.E., Richards, J.B. y Seiden, L.S. (1992b) Fenfluramine induced increases in extracellular hippocampal serotonin are progressively attenuated in vivo during a four-day fenfluramine regimen in rats. *Brain Res.*, 571:64-72.

Sabol, K.E., Richards, J.B. y Seiden, L.S. (1992a) Fluoxetine attenuates the DL-fenfluramine-induced increase in extracellular serotonin as measured by in vivo dialysis. *Brain Res.*, 585:421-424.

Sanders-Bush, E., Bushing, J.A. y Sulser, F. (1972) Long term effects of *p*-chloroamphetamine on tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in brain. *Eur. J. Pharmacol.*, 20:385-388.

Satchell, S.C. y Connaughton, M. (1994) Inappropriate antidiuretic-hormone secretion and extreme rises in serum creatinine kinase following MDMA ingestion. *Br. J. Hos. Med.*, 51:495.

Scanzello, C.R., Hatzidimitiou, G., Martello, A.L., Katz, J.L. y Ricaurte, G.A. (1993) Serotonergic recovery after (\pm)3,4-(methylenedioxy)methamphetamine injury: Observations in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 264:1484-1491.

Schifano, F. (1991) Chronic atypical psychosis associated with MDMA ('ecstasy') abuse. *Lancet*, 338:1335.

Schifano, F. y Magni, G. (1994) MDMA ('ecstasy') abuse: psychopathological features and craving for chocolate - a case series. *Soc. Biol. Psychiatry*, 36 :763-767.

Schmidt, C.J. (1987a) Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxy-methamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 240:1-7.

Schmidt, C.J. (1987b) Acute administration of methamphetamine: Comparison with the neurochemical effects of its N-desmethyl and N-ethyl analogs. *Eur. J. Pharmacol.*, 136:81-88.

Schmidt C.J., Abbate, G.M., Black, C.K. y Taylor, V.L. (1990a) Selective 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 255:478-483.

Schmidt, C.J., Black, C.K., Abbate, G.M. y Taylor, V.L. (1990b) Methylenedioxymethamphetamine-induced hyperthermia and neurotoxicity are independently mediated by 5-HT₂ receptors. *Brain Res.*, 529:85-90.

Schmidt, C.J., Black, C.K. y Taylor, V.L. (1990c) Antagonism of the neurotoxicity due to a single administration of methylenedioxymethamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 181:59-70.

Schmidt, C.J., Black, C.K. y Taylor, V.L. (1991) L-DOPA potentiation of the serotonergic deficits due to a single administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *p*-chloroamphetamine or methamphetamine to rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 203:41-49.

Schmidt, C.J., Black, C.K., Taylor, V.L., Fadayel, G.M., Humphreys, T.M., Nieduzak, T.R. y Sorensen, S.M. (1992) The 5-HT₂ receptor antagonist, MDL 28,133A, disrupts the serotonergic-dopaminergic interaction mediating the neurochemical effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Eur. J. Pharmacol.*, 220:151-159.

Schmidt, C.J. y Kehne, J.H. (1990) Neurotoxicity of MDMA: neurochemical effects. *Ann. NY Acad. Sci.*, 600:665-681.

Schmidt, C.J., Levin, J.A. y Lovenberg, W. (1987) In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 36:747-755.

Schmidt, C.J. y Lovenberg, W. (1985) In vitro demonstration of dopamine uptake by neostriatal serotonergic neurons of the rat. *Neurosci. Lett.*, 59:9-14.

Schmidt, C.J., Sullivan, C.K. y Fadayel, G.N. (1994) Blockade of striatal 5-hydroxytryptamine₂ receptors reduced the increase in extracellular concentrations of dopamine produced by the amphetamine analogue 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Neurochem.*, 62:1382-1389.

Schmidt, C.J. y Taylor, V.L. (1987) Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine. *Biochem. Pharmacol.*, 36:4095-4102.

Schmidt, C.J., y Taylor, V.L. (1988) Direct central effects of acute methylenedioxymethamphetamine on serotonergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 156:121-131.

Schmidt, C.J., Wu, L. y Lovenberg W. (1986) Methylenedioxymethamphetamine: A potentially neurotoxic amphetamine analogue. *Eur. J. Pharmacol.*, 124:175-178.

Schwartz, D., Hernandez, L. y Hoebel, B.G. (1989) Fenfluramine administered systemically or locally increases extracellular serotonin in the lateral hypothalamus as measured by microdialysis. *Brain Res.*, 482:261-270.

Sen, S. y Phillis, J.W. (1993) α -Phenyl-tert-butyl nitron (PBN) attenuates hydroxyl radical production during ischaemia-reperfusion injury of rat brain: An EPR study. *Free Rad. Res. Commun.*, 19:255-265.

Series, H.G., Cowen, P.J. y Sharp, T. (1994) p-Chloroamphetamine (PCA), 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and d-fenfluramine pretreatment attenuates d-fenfluramine-evoked release of 5-HT *in vivo*. *Psychopharmacology*, 116:508-514.

Shearman, J.D., Satsangi, J., Chapman, R.W.G., Ryley, N.G. y Weatherhead, S. (1992) Misuse of Ecstasy. *Br. Med. J.*, 305:309.

Sherman, A., Gal, E.M., Fuller, R.W. y Molloy, B.B. (1975) Effects of intraventricular p-chloroamphetamine and its analogues on cerebral 5-HT. *Neuropharmacology*, 14:733-737.

Shulgin, A.T. y Nichols, D.E. (1978) Characterization of three new psychomimetics. En: *The Psychopharmacology of Hallucinogens*. (ed. Stillman, R. y Willette, R.), Pergamon Press, New York, pp.74-83.

Shulgin, A.T. (1986) The background and chemistry of MDMA. *J. Psychoactive Drugs*, 18:291-304.

Shulgin, A.T. (1990) History of MDMA. En: *Ecstasy: The Clinical, Pharmacological and Neurotoxicological Effects of the Drug MDMA*. (ed. Peroutka, S.J.), Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, pp.1-20.

Siegal, R.K. (1986) MDMA: Nonmedical use and intoxication. *J. Psychoactive Drugs*, 18:349-354.

Simon, R.P., Swan, J.H., Griffiths, T. y Meldrum, B.S. (1984) Blockade of N.methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*, 226:850-852.

Simpson, R.L. y Rumack, R.H. (1981) Methylenedioxyamphetamine: clinical description of overdose, death and review of pharmacology. *Arch. Int. Med.*, 141:1507-1509.

Singarajah, C. y Lavies, N.G. (1992) An overdose of ecstasy: a role for dantrolene. *Anaesthesia*, 47:686-687.

Slikker, W. Jr, Ali, S.F., Scallet, A.C., Frith, C.H., Newport, G.D. y Bailey, J.R. (1988) Neurochemical and neurohistological alterations in the rat and monkey produced by orally administered methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 94:448-457.

Slikker, W. Jr, Holson, R.R., Ali, S.F., Kolta, M.G., Paule, M.G., Scallet, A.C., McMillan, D.E., Bailey, J.R., Hong, J.S. y Scalzo, F.M. (1989) Behavioral and neurochemical effects of orally administered MDMA in the rodent and nonhuman primate. *Neurotoxicology*, 10:529-542.

Smilkstein, M., Smolinske, S.C y Rumack, B.H. (1987) A case Mao inhibitor/MDMA: agony after ecstasy. *Clin. Toxicol.*, 25:149-159.

Snape, M.F., Colado, M.I. y Green, A.R. (1994) Chlormethiazole and dizocilpine block the behavioural, but not the neurotoxic effects of 5,7-dihydroxytryptamine in mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 74:40-42.

Solowij, N., Hall, W. y Lee, N. (1992) Recreational MDMA use in Sydney: a profile of 'ecstasy' users and their experiences with the drug. *Br. J. Addict.*, 87:1161-1172.

Spanos, L.J. y Yamamoto, B.K. (1989) Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+)-MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behaviour in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 32:835-840.

Sprague, J.E., Huang, X., Kanthasamy, A. y Nichols, D.E. (1995) Attenuation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity with the serotonin precursors tryptophan and 5-tryptophan. *Life Sci.*, 55:1193-1198.

Sprague, J.E. y Nichols, D.E. (1995) The monoamine oxidase-B inhibitor *l*-deprenyl protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273:667-673.

Spouse, J.S., Bradberry, C.W., Roth, R.H. y Aghajanian, G.K. (1989) MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) inhibits the firing of dorsal raphe neurons in brain slices via release of serotonin. *Eur. J. Pharmacol.*, 167:375-383.

Steele, T.D., Nichols, D.E. y Yim, G.K.W. (1987) Stereochemical effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and related amphetamine derivatives on inhibition of uptake of [³H]monoamines into synaptosomes from different regions of rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 36:2297-2303.

Steele, T.D., McCann, U.D. y Ricaurte, G.A. (1994) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): Pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*, 89:539-551.

Steranka, L.R., y Rhind, A.W. (1987) Effect of cysteine on the persistent depletion of brain monoamines by amphetamine, *p*-chloroamphetamine and MPTP. *Eur. J. Pharmacol.*, 133:191-197.

Steranka, L.R. y Sanders-Bush, E. (1979) Long-term effects of fenfluramine on central serotonergic mechanisms. *Neuropharmacology*, 18:895-903.

Stewart, C.W., Bowyer, J.F. y Slikker, W., Jr (1997) Elevated environmental temperatures can induce hyperthermia during *d*-fenfluramine exposure and enhance 5-hydroxytryptamine (5-HT) depletion in the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283:1144-1150.

Stone, D.M., Johnson, M., Hanson, G.R. y Gibb, J.W. (1988) Role of endogenous dopamine in the central serotonergic deficits induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 247:79-87.

Stone, D.M., Hanson, G.R. y Gibb, J.W. (1989) In vitro reactivation of rat cortical tryptophan hydroxylase following in vivo inactivation by methylenedioxymethamphetamine. *J. Neurochem.*, 53:572-581.

Stone, D.M., Hanson, G.R. y Gibb, J.W. (1987b) Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in rats and mice. *Neuropharmacology*, 26:1657-1661.

Stone, D.M., Merchant, K.M., Hanson, G.R. y Gibb, J.W. (1987a) Immediate and long-term effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on serotonin pathways in brain of rat. *Neuropharmacology*, 26:1677-1683.

- Stone, D.M, Stahl, D.C, Hanson, G.R. y Gibb, J.W. (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.
- Suárez, R.V. y Reimersma, R. (1988) "Ecstasy" and sudden cardiac death. *Am. J. For. Med. Path.*, 9:339-341.
- Tehan, B. (1993) Ecstasy and dantrolene. *BMJ*, 306:146.
- Thorén, P. y Sjölander, M. (1993) Chlormethiazole attenuates the derangement of sensory evoked potential (SEP) induced by i.c.v. administration of NMDA. *Psychopharmacology*, 111:256-258.
- Tossman, U. y Ungerstedt, U. (1986) Microdialysis in the study of extracellular levels of amino acids in the rat brain. *Acta Physiol. Scand.*, 128:9-14.
- Trulson, M.E. y Jacobs, B.L. (1976) Behavioral evidence of rapid release of CNS serotonin by PCA and fenfluramine. *Eur. J. Pharmacol.*, 36:149-154.
- Tucker, G.T., Lennard, M.S., Ellis, S.W., Woods, H.F., Cho, A.K., Lin, L.Y., Hiratsuka, A., Schmitz, D.A. y Chu, T.Y.Y. (1994) The demethylation of methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem. Pharmacol.*, 47:1151-1156.
- Ugedo, L., Grenhoff, J. y Svensson, T.H. (1989) Ritanserin, a 5-HT₂ receptor antagonist, activates midbrain dopamine neurons by blocking serotonergic inhibition. *Psychopharmacology*, 98:45-50.
- United States Department of Justice, Drug Enforcement Administration (1985) Fact Sheet.
- Ungerstedt, U. (1984) Measurement of neurotransmitter release by intracranial dialysis. En: *Measurement of Neurotransmitter Release In Vivo*, (ed. Marsden, C.A.), John Wiley & Son Ltd, pp.81-105.
- Ungerstedt, U. (1991) Introduction to intracerebral microdialysis. En: *Microdialysis in the Neurosciences*, (Robinson, T.E. y Justice Jr., J.B.), Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp.3-22.
- Ungerstedt, U., Herrera-Marschitz, M., Jungnelius, U., Ståhle, L., Tossman, U. y Zetterström, T. (1982) Dopamine synaptic mechanisms reflected in studies combining behavioural recordings and brain dialysis. En: *Advances in Dopamine Research*, (Kotisaka, M., Shomori, T., Tsukada, Y., y Woodruff, G.M.), Pergamon Press, New York, pp.219-231.
- Vincens, M., Enjalbert, A., Lloyd, K.G., Paillard, J.J., Thuret, F., Kordon, C. y Lechat, P. (1989) Evidence that chlormethiazole interacts with the macromolecular GABA_A-receptor complex in the central nervous system and in the anterior pituitary gland. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.*, 339:397-402.

Wages, S.A., Church, W.H. y Justice, J.B. Jr (1986) Sampling considerations for on-line microbore liquid chromatography of brain dialysate. *Analyt. Chem.*, 58:1649-1655.

Wake, D. (1995) Ecstasy overdose: a case study. *Intens. Crit. Care Nurs.*, 11:6-9.

Walsh, T., Carmichael, R. y Chestnut, R. (1994) A hyperthermic response to 'ecstasy'. *Br. J. Hosp. Med.*, 51: 476.

Westerink, B.H.C. y De Vries, J.B. (1988) Characterization of in vivo dopamine release as determined by brain microdialysis after acute and subchronic implantations: Methodological aspects. *J. Neurochem.*, 51:683-687.

Westerlink, B.H.C. y Spaan, S.J. (1982) On the significance of endogenous 3-methoxytyramine for the effects of centrally acting drugs on dopamine release in the rat brain. *J. Neurochem.*, 38:680-686.

White, S.R., Duffy, P y Kalivas, P.W. (1994) Methylenedioxymethamphetamine depresses glutamate-evoked neuronal firing and increases extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleu accumbens. *Neuroscience*, 62:41-50.

Wichems, C.H., Hollingsworth, C.K. y Bennett, B.A. (1995) Release of serotonin induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and other substituted amphetamines in cultured fetal raphe neurons: further evidence for calcium-independent mechanisms of release. *Brain Res.*, 695:10-18.

Wilson, M.A., Ricaaurte, G.A. y Molliver, M.E., (1988) Distinct morphologic classes of serotonergic axons in primates exhibit differential vulnerability to the psychotropic drug 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Neuroscience*, 28:121-137.

Wong, E.H.F., Kemp, J.A., Priestly, T., Knight, A.R., Woodruff, G.N. y Iversen, L.L. (1986) The anticonvulsant MK 801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7104-7108.

Wrona, M.Z., Goyal, R.N., Turk, D.J., Blank, C.L. y Dryhurst, G. (1992) 5,5'-dihydroxy-4,4'-bitryptamine: A potentially aderrant neurotoxic metabolite of serotonin. *J. Neurochem.*, 59:1392-1398.

Wrona, M.Z. y Dryhurst, G. (1991) Interactions of 5-hydroxytryptamine with oxidative enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 41:1145-1162.

Wu, R.-M., Chiueh, C.C., Pert, A. y Murphy, D.L. (1993) Apparent antioxidant effect of l-deprenyl on hydroxyl radical formation and nigral injury elicited by MPP⁺ in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*, 243:241-247.

Yamamoto, B.K., Nash, J.F. y Gudelsky, G.A. (1995) Modulation of methylenedioxymethamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction

between serotonin and γ -aminobutyric acid in the substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273:1063-1070.

Yamamoto, B.K. y Spanos, L.J. (1988) The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 148:195-203.

Yeh, S.Y. (1996) Attenuation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity by phenyl-t-butyl nitron (PBN) in rats. *Am. Sci. Neurosci. Abst.*, 749.2.

Young, F.L. (1986) Opinion and Recommended Ruling, Findings of Fact, Conclusions of Law and Decision of Administrative Law Judge, Submitted in the Matter of MDMA Scheduling. *Docket 84-48, May 22.*

Yousif, R.Y., Fitzgerald, R.L., Narasimhachari, N., Rosencrans, J.A., Blanke, R.V. y Glennon, R.A. (1990) Identification of metabolites of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 26:127-135.

Yue, T.L., Gu, J.L., Lysko, P.G., Cheng, H.Y., Barone, F.C. y Feuerstein, G. (1992) Neuroprotective effects of phenyl-t-butyl-nitron in gerbil global brain ischemia and in cultured rat cerebellar neurons. *Brain Res.*, 574:193-197.

Zaczek, R., Culp, S. y DeSouza, E.B. (1990) Intrasyntosomal sequestration of [³H]amphetamine and [³H]methylenedioxyamphetamine: Characterization suggests the presence of a factor responsible for maintaining sequestration. *J. Neurochem.*, 54:195-204.

Zhao, O., Pahlmark, K., Smith, M.L. y Siesjö, B.K. (1994) Delayed treatment with the spin trap α -phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol. Scand.*, 152:349-350.

Zigmond, R.E., Schwarzschild, M.A. y Rittenhouse, A.R. (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu. Rev. Neurosci.*, 12:415-461.

Zini, I, Tomasi, A., Grimaldi, R., Vanninin, V. y Agnati, L.F. (1992) Detection of free radicals during brain ischaemia and reperfusion by spin-trapping and microdialysis. *Neurosci. Letts.*, 138:279-282.