

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Cambios inducidos por MDMA sobre la actividad de las
metaloproteinasas e integridad de la barrera
hematoencefálica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Mercedes Pérez Hernández

Directoras

M^a Isabel Colado Megía
M^a Esther O'Shea Gaya
M^a Dolores Gutiérrez López

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



**Cambios inducidos por MDMA sobre la actividad
de las metaloproteinasas e integridad de la barrera
hematoencefálica**

TESIS DOCTORAL

Mercedes Pérez Hernández

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Farmacología



**Cambios inducidos por MDMA sobre la actividad de
las metaloproteinasas e integridad de la barrera
hematoencefálica**

TESIS DOCTORAL

Directoras de Tesis

M^a Isabel Colado Megía

M^a Esther O'Shea Gaya

M^a Dolores Gutiérrez López

Mercedes Pérez Hernández

Madrid, 2016

*“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia,
no podrá comprender su tiranía”*

Frankenstein. Mary Shelley

“A veces he creído hasta en seis cosas imposibles antes del desayuno”

Alicia en el País de las Maravillas. Lewis Carroll

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

Al comienzo de la Tesis he escuchado de multitud de bocas lo mucho que cambia la vida del tesinando durante esta etapa. Cinco años dan para mucho en todos los ámbitos. Por eso, pese a que este libro es un informe de investigación y no una autobiografía, no puedo disociar la simbiosis entre las vivencias personales y las experiencias profesionales. Las muchas horas de dedicación que requiere la investigación, el trabajo en equipo, la colaboración y las reflexiones entre pipeteos y cuantificaciones hilan una madeja que teje el esbozo de una segunda familia. Dicho esto, quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de un modo u otro, me han acompañado durante este recorrido cambiando mi vida y haciendo posible la consecución de esta Tesis Doctoral.

Gracias, en primer lugar, a mis directoras de Tesis por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación. Agradezco su inestimable ayuda pues sin su orientación y consejos esta Tesis no hubiera sido posible. Gracias a Maribel por la confianza depositada en mí y por su apoyo y comprensión en todos los momentos difíciles que me han tocado vivir a lo largo de estos años. A Esther gracias por su cariño y gentileza, por su confianza y por su actitud siempre dispuesta a ayudar. A Lola gracias por su complicidad y su sempiterna alegría contagiosa que da los microlitros de buen rollo necesarios para animar el día.

A mis compañeros de laboratorio. A Franci y Ana gracias por todos los momentos compartidos, por tantas sonrisas y lágrimas que nunca olvidaré. A ellas y también a María, gracias por haberme ayudado a aprender y descubrir tantas cosas de la vida y de mí misma que desconocía. Al actual reparto, gracias por haber estado al pie del cañón en esta segunda parte del partido, la más dura para mí y que sin elección habéis tenido que sufrir vosotros también. A Rebeca gracias por esa sacudida a tiempo (lo siento, ¡tenía que decirlo!) que toda buena amiga acaba dando a la otra, aún antes de saber que lo son. Gracias neniña por ser como eres, como científica, como compañera y sobre todo como persona. A Pableras gracias por haber aparecido un día para trastocar un poco mi mundo, intentando comprender lo incomprensible y revelándome nuevas perspectivas basadas en el cariño y un compañerismo de 10. A Cris gracias por estar ahí, por tu apoyo, tu compañía y tu camaradería. Al resto de compañeros y a la chavalada que ha pasado más o menos fugazmente por el laboratorio a lo largo de los años, gracias por todos los buenos momentos compartidos.

A Manolo, M^a Luisa y Fernando gracias por su asistencia técnica y su amabilidad durante todos estos años. A M^a Elena gracias por su ayuda y su gentileza.

A Marién, con quien he compartido largas horas de experimentación, gracias por su inestimable ayuda siempre con una sonrisa y un gesto amable.

A mis colegas de departamento, tanto a los que aún permanecen como a los que ya volaron, gracias por los buenos ratos y las risas durante las horas de la comida que hemos compartido en multitud de ocasiones. Gracias a todos por tanta amabilidad que me demuestra que el compañerismo llega más allá del propio laboratorio.

A mi familia al completo y a todos mis amigos *de fuera del gremio* gracias por todo el apoyo recibido. A mi madre le agradezco el haberme inculcado esa necesidad imperiosa de comprender y razonar todo cuanto me rodea que tan necesaria es en el mundo de la investigación científica. Gracias madrecita del alma querida por enseñarme y demostrarme cada día que tras hallar obstáculos siempre es posible encauzar el camino y continuar adelante por lo que quieres o por los que amas. Gracias por ser la creadora de esta piña con tantos piñones y mantenerla unida. Gracias por tu coraje. Gracias por tu amor. A mi padre quiero agradecerle la mejor herencia del mundo: la capacidad creativa y el autodidactismo que me permiten ser cada día un poquito más *aprendiz de todo, aunque maestro de nada*. Gracias papichulo por demostrarme lo importante que son en la vida las ilusiones, aunque a veces no se lleguen a alcanzar. A ellos dos, gracias por darme esa mezcla de cualidades y aptitudes que me orientan profesionalmente, además de por haber conseguido con su esfuerzo y sacrificio que yo haya podido llegar hasta aquí. A mis hermanos, hermanas, sobrinos, tíos, primas y gatos, así como a mi nueva familia gracias por vuestro cariño, vuestra confianza en mí y vuestro apoyo incondicional.

Y por último, porque lo bueno se hace esperar, gracias a Carmen por absolutamente todo. Por haber sido la otra parte de un puzzle de dos piezas que me ha mantenido a flote frente a todos los altibajos que he experimentado durante esta embajada. Gracias por no dejar nunca de confiar en mí, aun cuando ni yo misma lo hacía. Gracias por saberlo todo antes que yo sin reprocharlo, por ayudarme a ser consciente de las cosas, por comprenderme en muchos momentos y por respetarme en otros menos comprensibles. Pero sobre todo, Carmelilla gracias por haberme dejado con vida durante la escritura de la Tesis a costa de tu increíble infinita paciencia.

ABREVIATURAS

α-MeDa: α-metildopamina

μm: Micrómetro

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético

5HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina

ACh: Acetilcolina

ACTH: Hormona Adrenocorticotropa

ADC: Coeficiente de difusión aparente

ADH: Hormona antidiurética

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ANOVA: Análisis de la varianza

AP: Proteína adaptadora

AQP4: Aquaporina-4

ATP: adenosin trifosfato

BBG: Brilliant blue G

BHE: Barrera hematoencefálica

BOE: Boletín oficial del Estado

BSA: Albúmina de suero bovino

CB2: Receptores de cannabinoides tipo-2

CIA: Agencia Central de Inteligencia

CYP1A2: Citocromo 1A2

CYP2D: Citocromo 2D

CYP450: Citocromo P-450

DA: Dopamina

DAMP: Patrones moleculares asociados a daño

DAT: Transportador de dopamina

DB: Distrobrevina

DEA: Agencia estadounidense para el Control de Estupefacientes

DG: Distroglucano

DUSP: Fosfatasa de especificidad dual

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEG: Electroencefalografía

EEM: Error estándar de la media

EE.UU: Estados Unidos

ERK: Kinasa regulada por señales extracelulares

g: gramo

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

GSH: Glutathion

GTAasa: Trifosfatasa de guanosina

h: hora

HHA: 3,4-dihidroxianfetamina

HHMA: 3,4- dihidroximetanfetamina

HMA: 4-hidroxi-3-metanfetamina

HMMA: 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina

HMGB-1: Proteína del grupo 1 de alta movilidad

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

i.c.v.: Intracerebroventricular

IgG: Inmunoglobulina G

IL-1 β : Interleuquina-1 β

IL-6: Interleuquina-6

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

i.p.: Intraperitoneal

IRM: Imagen por resonancia magnética

i.v.: Intravenoso

JAM: Moléculas de unión por adhesión

JNK: Kinasa c-jun N-terminal

kDa: Kilodalton

Kg: Kilogramo

LCR: Líquido cefalorraquídeo

L/min: Litro por minuto

LRP-1: receptor de lipoproteínas de baja densidad tipo 1

M: Molaridad

MAO: Monoaminooxidasa

MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos

MAPS: Asociación multidisciplinar para estudios psicodélicos

MDA: 3,4-metilenodioxianfetamina

MDEA: 3,4-metilenodioxietanfetamina

MDMA: 3,4-metilenodioximetanfetamina

Meth: Metanfetamina

min: Minuto

mg: Miligramo

mg/Kg: Miligramo/kilo

ml: Mililitro

mM: Milimolar

MMP: Metaloproteinasa

MT-MMP: Metaloproteinasas de membrana

NA: Noradrenalina

NAT: Transportador de noradrenalina

NF- κ B: Factor nuclear – κ B

ng: Nanogramo

N-Me- α -MeDA: N-metil- α -metildopamina

NO: Monóxido de nitrógeno u óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

OAP: Conjunto ortogonal de partículas

p: p-valor

p38 MAPK: Proteína kinasa activada por mitógenos p38

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1

PBN: α -fenil-N-tercbutilnitrona

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PET: Tomografía por emisión de positrones

PTSD: Trastorno de estrés post-traumático

RAGE: Receptor de productos finales de glicación avanzada

RL: Radicales libres

ROI: Región de interés

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

SB-3CT: 2-[[[4-fenoxifenil)sulfonil]metil] - thiirano

SDS: Dodecilsulfato sódico

SERT: transportador de serotonina

SNC: Sistema nervioso central

SPECT: Tomografía computarizada de emisión monofotónica

syn: Sinucleína

T₂: Tiempo de relajación transversal

TCA: Ácido tricloracético

TE: Tiempo de eco

TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta

TIMP: Inhibidor tisular endógeno de metaloproteinasas

TLR: Receptor de tipo Toll

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

tPA: activador tisular del plasminógeno

TPH: Triptófano hidroxilasa

TR: Tiempo de repetición

UCM: Universidad Complutense de Madrid

uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VEH: vehículo

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VMAT: Transportador vesicular de monoaminas

Vs: *versus*

ZO-1: Zonula occludens

[³H]: Tritio

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	13
BLOQUE I: MDMA	13
1. Aspectos generales	13
2. Historia de la MDMA	13
3. MDMA en España	14
4. Consumo	15
5. Formatos	16
6. Química y síntesis	18
7. Farmacocinética	18
8. Toxicidad y mortalidad	20
9. Adicción y dependencia	21
10. Efectos de la administración de MDMA en rata	22
10.1. Disfunción neuroquímica y neurotoxicidad	22
10.2. Estrés oxidativo	25
10.3. Neuroinflamación	26
10.4. Hipertermia	27
10.5. Efectos fisiológicos	28
10.6. Efectos comportamentales y alteraciones cognitivas	28
11. Efectos de la MDMA en primates no humanos	28
12. Efectos del consumo de MDMA en humanos	29
12.1. Efectos neuroquímicos y neurotóxicos	30
12.2. Efectos fisiológicos y psicológicos	31
BLOQUE II: BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	34
1. Aspectos generales	34
2. Fisiología de la BHE	35
3. Estructura de la BHE: Unión neurovascular	36
3.1. Células endoteliales	38

3.2. Lámina basal	40
3.3. Astrocitos	42
3.4. Pericitos	44
3.5. Neuronas	44
3.6. Microglía perivascular y pericitos circulantes	45
4. Regulación y alteración patológica de la BHE	45
4.1. Modulación de la integridad de la BHE por proteólisis	47
4.1.1. Metaloproteinasas de matriz	48
4.1.2. Activador tisular del plasminógeno	50
4.2. Estrés oxidativo	51
4.3. Temperatura	52
4.4. Inflamación	52
5. Consecuencias de la alteración patológica de la BHE: edema	55
6. MDMA y alteración de la BHE	56
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. Animales	61
2. Compuestos administrados	61
3. Diseño experimental	62
3.1. Estudio del efecto de la administración de MDMA sobre la permeabilidad de la BHE mediante Azul de Evans	63
3.2. Estudio del efecto de la MDMA sobre la actividad enzimática y la expresión de proteínas implicadas en la integridad de la BHE	64
3.3. Estudio del efecto de la MDMA sobre la formación de edema mediante resonancia magnética: parámetros T ₂ y ADC	65
3.4. Estudio del efecto de la inhibición de la actividad MMP-9 mediante la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA	66
3.5. Estudio del antagonismo de receptores P2X ₇ sobre los efectos inducidos por la administración de MDMA	67
4. Medida de la temperatura rectal	68

5. Extravasación de Azul de Evans	69
6. Extravasación de IgG endógena	69
7. Estudios de expresión mediante inmunohistoquímica	70
8. Estudios de actividad enzimática	72
8.1. Extracción y preparación de muestras	72
8.2. Zimografía en gel para la determinación de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9	72
8.3. Zimografía en gel para la determinación de la actividad caseinolítica de MMP-3	73
8.4. Zimografía en gel para la determinación de la actividad del activador tisular del plasminógeno	73
9. Estudios de expresión proteica mediante Western Blot	74
10. Estudios de resonancia magnética	76
11. Determinación de parámetro de neurotoxicidad	77
11.1. Determinación de los niveles hipocampales de 5-HT y 5-HIAA	77
11.2. Determinación de los lugares de recaptación de 5-HT marcados con [³ H]-paroxetina	78
12. Determinación de la concentración proteica de las muestras	79
12.1. Método de Lowry	79
13.1. Modificación del método de Lowry	79
13. Análisis estadístico de los resultados	80
RESULTADOS	81
BLOQUE I: Efectos de la MDMA sobre la BHE	81
1. Efecto de la MDMA sobre la permeabilidad de la BHE	81
1.1. Extravasación del colorante Azul de Evans	81
1.2. Efecto sobre la extravasación de IgG endógena	82
2. Efecto de la MDMA sobre la integridad de la BHE	83
2.1. Expresión de claudina-5	84
2.2. Expresión de proteínas de la lámina basal	88
3. Efecto de la MDMA sobre la generación de edema	90
3.1. Estudios de resonancia magnética	90

3.2. Efecto de la MDMA sobre la expresión de AQP4	92
4. Efecto de la MDMA sobre las proteasas que regulan la integridad de la BHE	94
4.1. Actividad y expresión de metaloproteinasas de matriz	94
4.2. Actividad y expresión de tPA. Expresión de plasminógeno y de LRP-1...	97
4.3. MAPKs: p38 MAPK, ERK1/2 y JNK	98
5. Efecto de la administración del inhibidor de gelatinasas, SB-3CT sobre la alteración de la BHE inducida por MDMA	100
5.1. Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la actividad y en la expresión de MMP-9	100
5.2. Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la fosforilación de p38 MAPK	102
5.3. Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de claudina-5	102
5.4. Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la generación de edema	103
5.5. Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de AQP4	104
5.6. Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios Inducidos por MDMA en expresión de LRP-1	105
5.7. Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la temperatura rectal	106
BLOQUE II: BHE, neuroinflamación y neurotoxicidad	108
6. Efecto de la MDMA sobre la respuesta neuroinflamatoria	108
6.1. Activación microglial	108
6.2. Activación astrocitaria	110
6.3. Expresión del receptor P2X ₇	112
6.4. IL-1 β y HMGB-1	114
7. Efecto del antagonismo de receptores P2X ₇ sobre los cambios inducidos por MDMA en la respuesta neuroinflamatoria	114
7.1. Efecto de BBG y A-438079 sobre la expresión del receptor P2X ₇	114
7.2. Efecto de BBG sobre la activación microglial y astrocitaria	116

7.3. Expresión de BBG sobre la expresión de IL-1 β	119
8. Efecto del antagonismo de receptores P2X ₇ sobre los cambios inducidos por MDMA en la BHE	119
8.1. Efecto de la administración de BBG sobre la alteración de la permeabilidad de la BHE inducida por MDMA: IgG endógena	120
8.2. Efecto del antagonismo de receptores P2X ₇ sobre la alteración inducida por MDMA en la expresión de laminina y colágeno-IV	121
8.3. Efecto del antagonismo con BBG sobre los cambios inducidos por MDMA en la actividad de MMP-9 y MMP-3	125
8.4. Efecto de la administración de BBG sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de tPA y plasminógeno	125
9. Efecto de la inhibición de la actividad MMP-9 mediante SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la respuesta neuroinflamatoria	126
9.1 Efecto de SB-3CT sobre la activación microglial y astrocitaria	126
10. Efecto del antagonismo de receptores P2X ₇ sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA	129
10.1. Niveles tisulares de 5-HT, 5-HIAA y densidad SERT	129
11. Efecto de la administración de BBG y A-438079 sobre la hipertermia inducida por MDMA	129
DISCUSIÓN	133
CONCLUSIONES	153
REFERENCIAS	155
ANEXO	173

RESUMEN

Cambios en la actividad metaloproteinasas y en la integridad de la barrera hematoencefálica inducidos por MDMA

INTRODUCCIÓN

La 3,4-metilendioxitmetanfetamina (MDMA), comúnmente denominada *éxtasis*, es una droga psicoactiva de diseño cuya administración periférica produce liberación masiva e inmediata de monoaminas [1] y neurotoxicidad serotoninérgica a largo plazo [2-6]. A corto plazo activa la respuesta neuroinflamatoria [7-10] e induce hipertermia [1, 11] en correlación a la magnitud del daño neurotóxico en ratas. Tanto el metabolismo de la MDMA como el de las monoaminas induce de forma inmediata la generación de especies reactivas de oxígeno que participan notablemente en la neurotoxicidad [1]. Algunos de estos efectos, concretamente el intenso estrés oxidativo, la activación de la respuesta inflamatoria y la hipertermia cerebral, son factores implicados en la alteración de la barrera hematoencefálica (BHE) en patologías como la isquemia, la esclerosis múltiple, la epilepsia o las enfermedades neurodegenerativas, [12-20]. Las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y las especies reactivas de oxígeno pueden modificar la permeabilidad o integridad de la BHE a través de la producción o activación de proteasas [15, 21]. La microglía y los astrocitos son capaces de producir estos mediadores durante la respuesta neuroinflamatoria. Uno de los principales receptores involucrados en la activación glial en condiciones de daño tisular es el receptor P2X₇ [22-25].

Las enzimas proteolíticas metaloproteinasas (MMPs) y serín-proteasas como el activador tisular del plasminógeno (tPA) pueden modular la permeabilidad de la BHE al degradar proteínas de la lámina basal y de las uniones estrechas. El incremento en la actividad de estas proteasas es frecuente en patologías que cursan con alteración de la barrera [14, 26-29]. Las principales MMPs involucradas en este contexto son las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y la estromelina-1 (MMP-3) [15, 30-32]. El tPA participa en la producción y activación de MMP-9 mediante su interacción con el receptor de lipoproteínas de baja densidad tipo 1 (LRP-1) y en la activación de MMP-3 por plasmina que se genera a partir del plasminógeno, su principal sustrato [31, 33, 34]. La alteración de la BHE puede facilitar la entrada de agua al tejido desde la sangre y producirse un desequilibrio electrolítico que desencadenaría la formación de edema vasogénico [35-37]. En conjunto, todas las consecuencias derivadas de la alteración de la BHE contribuirían, en última instancia a producir o agravar el daño tisular, la disfunción neuronal y la neurodegeneración [16].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a las evidencias de que la MDMA produce estrés oxidativo, hipertermia y la activación de la respuesta neuroinflamatoria, factores todos ellos que median la alteración de la BHE, parece razonable pensar que esta droga pueda inducir la alteración de la BHE en el hipocampo de la rata. Por lo tanto, esta Tesis Doctoral se centra en el estudio del efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la permeabilidad de la BHE y la integridad de las uniones estrechas y la lámina basal, además de su regulación mediante proteasas. También se analizó la implicación de la respuesta neuroinflamatoria en dichos cambios y su efecto sobre la neurotoxicidad a largo plazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para responder a los objetivos planteados se estudió el efecto de una dosis neurotóxica de MDMA (12,5 mg/Kg i.p.) sobre la BHE en el hipocampo de ratas macho *Dark Agouti*. Se analizó el efecto temporal (1, 3, 6 y 24 h) de la MDMA sobre la extravasación de trazadores (Azul de Evans e IgG endógena), la expresión de proteínas (claudina-5, laminina, colágeno-IV y AQP4) y la generación de edema. También se estudió la progresión temporal de la expresión y la actividad proteolítica de MMP-2, MMP-9, MMP-3 y del tPA, determinándose además la expresión de su sustrato, plasminógeno y del receptor LRP-1, así como la expresión de las principales MAPKs (p38, ERK1/2 y JNK). Para evaluar la implicación de MMP-9 en los cambios inducidos por MDMA se administró el inhibidor SB-3CT (25 mg/Kg i.p.). Por otro lado, se estudió el efecto temporal de la droga sobre la respuesta neuroinflamatoria analizando la expresión de marcadores específicos de microglía (OX-42) y astrocitos (GFAP), así como la de receptores P2X₇, de IL-1 β y de la proteína asociada a daño tisular, HMGB-1. Para evaluar el papel de la respuesta neuroinflamatoria en los cambios inducidos por MDMA sobre la BHE, se administraron los antagonistas de receptores P2X₇, *Brilliant Blue G* (BBG, 50 mg/Kg i.p.) y A-4378079 (2 inyecciones de 30 mg/Kg, i.p.). Finalmente, se evaluó el efecto de BBG sobre la disminución de los niveles de 5-HT y 5-HIAA y del transportador SERT producida por MDMA a los 7 días.

RESULTADOS

La administración de una única dosis neurotóxica de MDMA produce, en el hipocampo de la rata, un incremento de la extravasación de azul de Evans (2 h) y de IgG endógena (1 y 3 h)

que revelan la alteración de la permeabilidad de la BHE. Además, la integridad de la BHE está alterada puesto que la expresión de claudina-5 (1 y 3 h), laminina y colágeno-IV (1, 3, 6 y 24 h) están disminuidas. Por otro lado, MDMA produce edema difuso determinado mediante imágenes de resonancia magnética. El incremento en el parámetro T_2 (desde 2,5 hasta al menos 6 h) indica la formación de edema, que desaparece a las 24 horas. El parámetro ADC se modifica de forma temporal más sutilmente apreciándose diferencias entre 3 (valor máximo) y 6 horas (valor mínimo). La expresión de AQP4 perivascular varía tras la administración de MDMA en aparente correlación con la progresión del edema. En primer lugar ocurre una disminución de la expresión del canal (1 h) concomitante con los cambios detectados en la BHE, mientras que posteriormente (6 h) se encuentra sobreexpresado. Esto sugiere que el edema transitorio generado como consecuencia de los cambios en la BHE podría estar resolviéndose por la sobreexpresión de AQP4 (6 h) que mediaría la acumulación de agua intracelular.

Aunque la MDMA no afecta a la expresión ni a la actividad de la metaloproteínasa constitutiva MMP-2, produce un incremento en las de MMP-9 (1 h) y MMP-3 (3 h), así como en la expresión (1 y 3 h) y actividad (3 h) de tPA. En correlación temporal al aumento en la actividad tPA se encuentra disminuida la expresión de plasminógeno. Aparte de contribuir a la alteración de la BHE al producir plasmina a partir de plasminógeno, tPA podría estar participando en la activación de MMP-3. Además, su interacción con el receptor LRP-1, cuya expresión está incrementada a la hora, podría ser la responsable de la activación MMP-9. La expresión de MAPKs también se analizó, observándose que únicamente la fosforilación de p38 está incrementada por la droga (1 h), mientras que disminuyen pERK1/2 (1 h) y pJNK (3 y 6 h). Atendiendo a los resultados la primera proteasa que parece estar involucrada en la alteración inicial de la BHE inducida por MDMA es la MMP-9, puesto que su expresión y actividad se encuentran incrementadas ya a la hora, tiempo al cual ocurre la disminución en la expresión de claudina-5, laminina y colágeno-IV. En base a esto, se estudió el efecto de su inhibición mediante SB-3CT sobre algunos de los cambios inducidos por MDMA. El tratamiento con el inhibidor previene la disminución de claudina-5, el aumento en LRP-1 y los cambios en la expresión de AQP4, además del incremento inicial en el parámetro T_2 , es decir, en la formación de edema. Sin embargo, no modificó el incremento en la fosforilación de p38 por MDMA, ni en el parámetro T_2 a las 6 horas. Este último resultado indica que podría estar generándose edema de carácter intracelular a partir de las 6 horas por causas independientes de la alteración de la BHE inducida por MDMA.

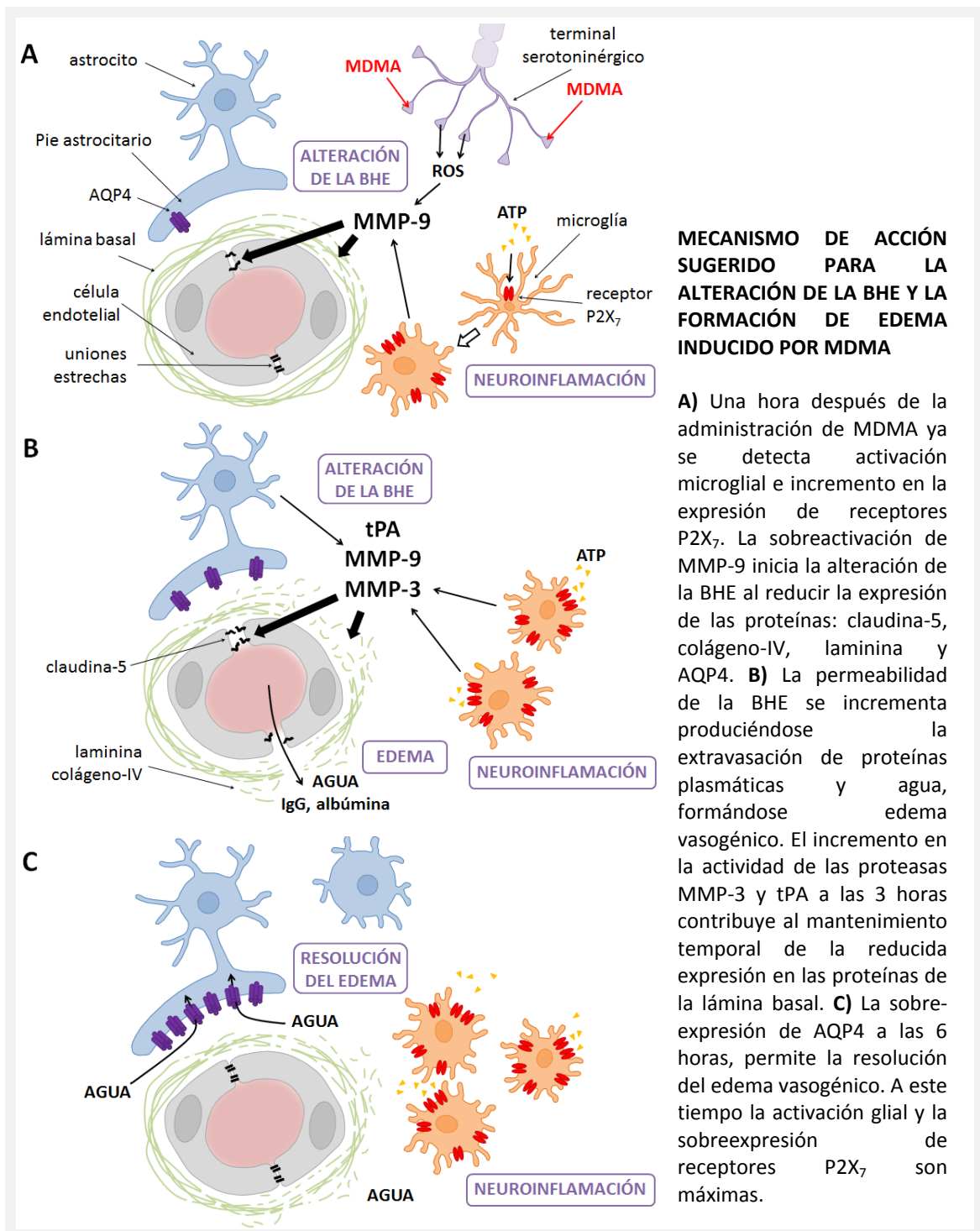
Por otro lado, la administración de MDMA produce la activación de la respuesta neuroinflamatoria detectándose un aumento en la expresión de OX-42 microglial (3 y 6 h), de GFAP astrocitario (6 h) y de los receptores P2X₇ (1, 3 y 6 h) además de producir un incremento (3h) en la expresión de IL-1 β y HMGB-1. El antagonismo de receptores P2X₇ mediante BBG previene el aumento de la expresión tanto de los propios receptores como de OX-42 microglial, aunque no previene los cambios inducidos por MDMA sobre GFAP ni IL-1 β . Esto sugiere que tras la administración de MDMA la señalización a través de receptores P2X₇ desencadena la activación de la microglía en el hipocampo, mientras que el aumento en la expresión de GFAP y la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 β ocurrirían mediante otro mecanismo independiente. Además, BBG previene la sobreexpresión y sobreactivación de MMP-9 y MMP-3 producidas por MDMA, así como los cambios en la expresión de tPA y plasminógeno. En concordancia con estos resultados, el uso de antagonistas de receptores P2X₇ previene la degradación de laminina y colágeno-IV y el incremento en la extravasación de IgG que produce la droga. Estos resultados muestran la implicación de la señalización a través de receptores P2X₇ en la alteración inicial de la BHE tras la administración de MDMA. No obstante, la inhibición de MMP-9 no afecta a la expresión ni de OX-42, ni de GFAP, por lo que la respuesta neuroinflamatoria producida por MDMA podría contribuir a la inducción de la alteración de la BHE, pero no ser consecuencia de ella. Aunque la IL-1 β es un factor que induce la producción de MMPs, los resultados indican que la IL-1 β no es el factor responsable del incremento inducido por MDMA en la expresión y/o actividad de las proteasas estudiadas.

Considerando la protección ejercida por BBG se ensayó su efecto sobre la disfunción serotoninérgica que produce MDMA para determinar si dicha disfunción está relacionada con los cambios en la BHE y en la activación microglial detectados a corto plazo. El tratamiento con BBG no previno la disminución de 5-HT, 5-HIAA ni de SERT que produce la droga, por lo que la neurotoxicidad serotoninérgica parece desarrollarse independientemente de los procesos inmediatos relacionados con la activación de receptores P2X₇. Estos resultados no excluyen la posibilidad de que la sobreexpresión de IL-1 β pueda estar involucrada en la neurotoxicidad producida por MDMA en el hipocampo de la rata.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta Tesis Doctoral permiten concluir que la administración de una única dosis neurotóxica de MDMA produce a corto plazo y de manera transitoria, en el hipocampo de la rata, la alteración de la integridad y la permeabilidad de la BHE. La

sobreactivación de proteasas tras la administración de MDMA sería la responsable de la disminución de la expresión de proteínas de la lámina basal y de las uniones estrechas, produciéndose el incremento de la permeabilidad de la barrera a proteínas plasmáticas y agua que generaría edema transitorio. Estas alteraciones en la BHE parecen estar relacionadas con la activación microglial inducida por MDMA, mediante un mecanismo que involucra la señalización por receptores P2X₇.



SUMMARY

Metalloproteinases activity and blood-brain barrier integrity changes induced by MDMA

INTRODUCTION

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), commonly named *ecstasy*, is a psychoactive designer drug. MDMA peripheral administration induces the immediate massive release of monoamines [1] and a long-term serotonergic neurotoxicity [2-6]. In addition, MDMA activates a short-term neuroinflammatory response [7-10] and induces hyperthermia [1, 11] correlating with the long-term cerebral neurotoxicity in rats. Furthermore, both MDMA and monoamine metabolism produce oxygen and nitrogen reactive species which are strongly implicated in MDMA neurotoxicity [1]. Various of the consequences of MDMA, in particular the intense oxidative stress, the inflammatory response and the cerebral hyperthermia, are factors involved in blood-brain barrier (BBB) integrity and permeability disruption in ischemia, multiple sclerosis, epilepsy or neurodegenerative disorders [12-20]. There are evidences showing proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) and oxygen reactive species could modify BBB permeability or integrity through the production or activation of proteases [15, 21]. As a result of the activation of the neuroinflammatory response, microglia and astrocytes are capable of producing these mediators. One of the receptors involved in activating glial cells during tissue injury is the purinergic receptor, P2X₇. High extracellular ATP levels released after cellular injury could activate P2X₇ receptors, which subsequently increase glial reactivity through inflammasome activation [22-25].

Proteolytic enzymes metalloproteinases (MMPs) and serine proteases such as tissue plasminogen activator (tPA), could modulate BBB permeability by degrading tight junction and basal lamina proteins. The increase in proteolytic activity of these proteases is often detected in pathologies that are accompanied by BBB alterations [14, 26-29]. In this context, the most studied MMPs are gelatinases (MMP-2 and MMP-9) and stromelysin-1 (MMP-3) [15, 30-32]. The interaction between tPA and low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) induces MMP-9 production, whereas plasmin formed from tPA-induced plasminogen proteolysis stimulates MMP-3 activation [31, 33, 34]. BBB alteration could facilitate the access of water from blood vessels to tissue and disrupt the electrolytic balance leading to vasogenic edema [35-37] and seizures [16, 17, 38]. Overall, BBB disruption could contribute to damaging or enhancing tissue injury, to neuronal dysfunction and to neurodegeneration [16].

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

On the basis of the evidence that MDMA induces hyperthermia, oxidative stress and a neuroinflammatory response, all of which are factors that disrupt the BBB, it is reasonable to propose that MDMA could induce alterations in BBB permeability in rat hippocampus. This Doctoral Thesis is therefore focused on determining the effect of a neurotoxic dose of MDMA on BBB permeability and on tight-junction and basal lamina integrity as well as evaluating the role of proteases in mediating the effects. Furthermore, we explore the involvement of the neuroinflammatory response in the aforementioned effects and in the long-term neurotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

In order to achieve the proposed objectives, we studied the effect of a single neurotoxic dose of MDMA (12.5 mg/Kg i.p.) on BBB integrity in the hippocampus of *Dark Agouti* male rats. We determined the temporal effect (1, 3, 6 and 24 hours after MDMA administration) of the drug on tracer extravasation (Evans Blue and endogenous IgG), protein expression (claudin-5, laminina, collagen-IV and AQP4) and edema formation. In addition, we studied the time-course of MDMA-induced effects on MMP-2, MMP-9, MMP-3 and tPA expression and activity. We also assayed the major tPA substrate, plasminogen, and LRP-1 expression, as well as MAPK (p38, ERK1/2 and JNK) expression. To determine MMP-9 participation in the MDMA-induced changes, we administered the selective gelatinase inhibitor SB-3CT (25 mg/Kg i.p.). Furthermore, we studied the temporal effect of MDMA on the neuroinflammatory response by analyzing expression of microglial (OX-42) and astrocytic (GFAP) markers, as well as P2X₇ receptor, IL-1 β and tissue damage-associated protein HMGB-1 expression. To evaluate the role of neuroinflammatory response on BBB MDMA-induced changes we administered the P2X₇ receptor antagonists *Brilliant Blue G* (BBG, 50 mg/Kg i.p.) and A-4378079 (2 injections of 30 mg/Kg i.p.). Finally, we studied the effect of BBG on the long-term MDMA-induced decreases in 5-HT and 5-HIAA concentrations and SERT density determined.

RESULTS

The administration of a single neurotoxic dose of MDMA increases Evans Blue (2 h) and endogenous IgG (1 and 3 h) extravasation in rat hippocampus indicative of disruption of BBB permeability. Besides the permeability, MDMA also modifies BBB integrity, since it decreases

claudin-5 (1 and 3 h), laminin and collagen-IV (1, 3, 6 and 24 h) expression. Furthermore, MDMA produces edema determined by magnetic resonance imaging. The increase in T_2 from 2.5 to almost 6 hours after MDMA administration indicates edema formation which disappears after 24 hours. MDMA induces subtle temporal alterations in the ADC value between 3 (maximum value) and 6 hours (minimum value). Perivascular AQP4 expression changes temporally where also detected in apparent association with edema progress. MDMA first reduces AQP4 expression (1 h) concomitant with BBB integrity and permeability changes, and subsequently increases it (6 h). These results suggest that transitory edema is formed after MDMA-induced disruption of the BBB and is suppressed at 6 hours possibly as a consequence of increased AQP4 expression and intracellular water content.

In addition to changes in BBB permeability and integrity, MDMA increases both activity and expression of the inducible MMPs, MMP-9 (1 h) and MMP-3 (3 h), but not of the constitutive MMP-2. Moreover, MDMA produces an increment in tPA activity (3 h) and expression (1 and 3 h). MDMA-induced tPA overactivation is temporally correlated with decreased plasminogen expression. According to these results, tPA, as well as contributing to BBB disruption by producing plasmin from plasminogen, could also be participating in the activation of MMP-3. In addition, LRP-1 expression is augmented 1 hour after MDMA administration and the interaction LRP-1/tPA at this time might be responsible for MMP-9 activation. We also determined the effect of MDMA treatment on MAPK expression. Only p38 phosphorylation is increased (1 h) after MDMA administration, whereas pERK1/2 (1 h) and pJNK (3 and 6 h) are decreased. These results suggest that MMP-9 might be the first protease involved in the initial MDMA-induced BBB alteration since its activity and expression are increased at the same time that we detect decreases in claudin-5, laminin and collagen-IV expression. Based on this, we determined the effect of inhibiting MMP-9 activity with SB-3CT on the MDMA-induced changes. SB-3CT prevents the MDMA-induced claudin-5 decrease, the LRP-1 increase and the changes in AQP4 expression, as well as the early T_2 augmentation that is, edema formation. Nevertheless, MMP-9 inhibition by SB-3CT modifies neither the increase in p38 expression, nor the T_2 increase at 6 hours due to MDMA. This last result seems to indicate that MDMA could be producing intracellular edema 6 hours after its administration, in a different manner to the earlier BBB disruption-induced vasogenic edema.

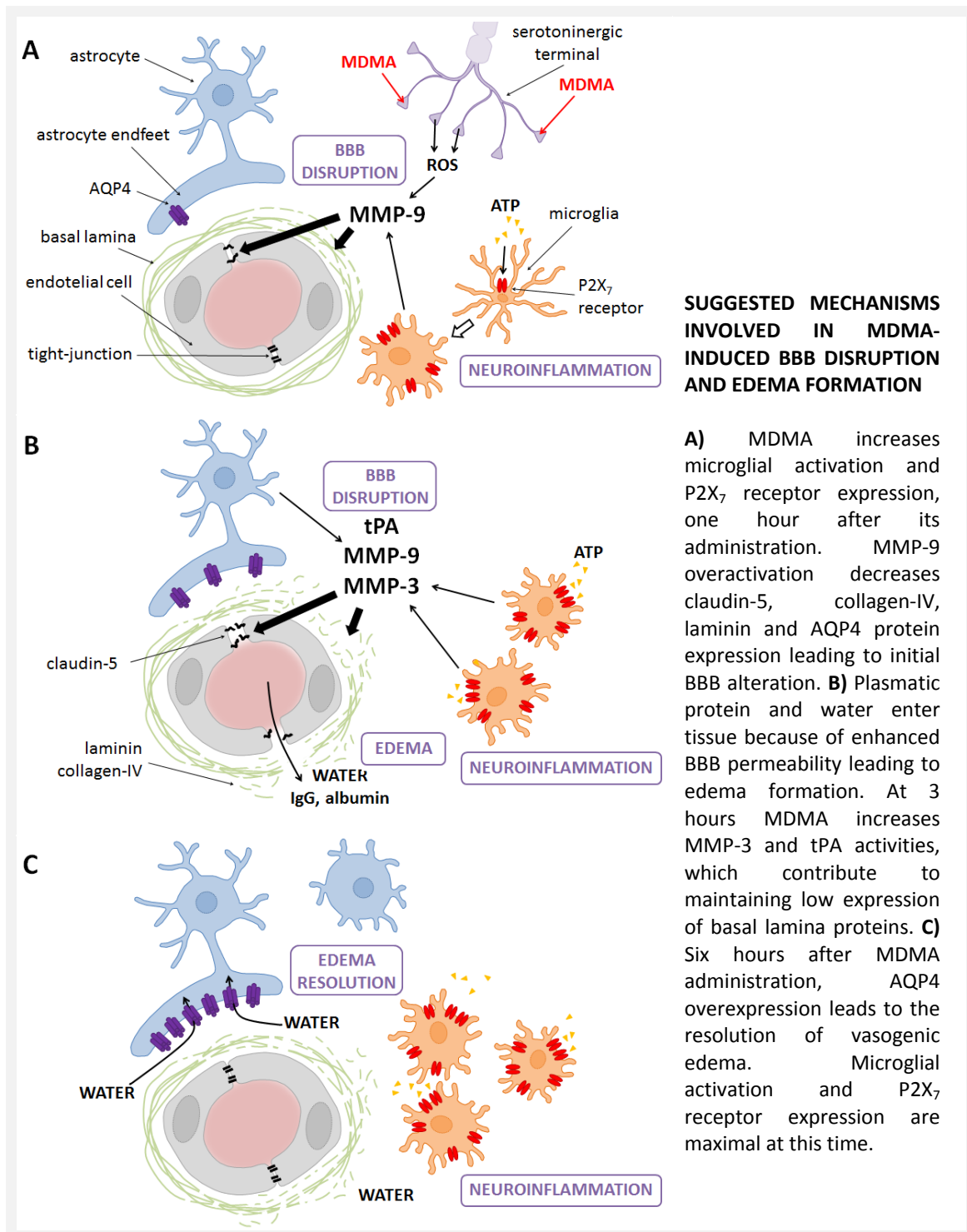
MDMA administration also activates a neuroinflammatory response which is reflected by the increases in microglial OX-42 (3 and 6 h), astrocytic GFAP (6 h) and P2X₇ receptor (1, 3 and 6 h) expression. Furthermore, MDMA augments hippocampal levels of IL-1 β and the tissue

damage-associated protein HMGB-1 at 3 hours. P2X₇ receptor antagonism by BBG administration prevents MDMA-induced increases in receptor and OX-42 expression, but not GFAP and IL-1 β increments. This suggests that P2X₇ receptor signalling triggers microglial activation in hippocampus after MDMA administration, whereas increases in GFAP and IL-1 β expression may be produced by other independent mechanisms. Moreover, BBG prevents the MDMA-induced overexpression and overactivation of both MMP-3 and MMP-9, as well as the changes in tPA and plasminogen expression. Additionally, P2X₇ receptor antagonism prevents laminin and collagen-IV degradation and IgG extravasation produced by MDMA. These results suggest that signalling through the P2X₇ receptor is involved in the early MDMA-induced BBB disruption. However, MMP-9 activity inhibition by SB-3CT does not alter the effects of MDMA on OX-42 and GFAP expression. Consequently, activation of the neuroinflammatory response induced by MDMA could contribute to altering the BBB, but it is not a result of BBB disruption. Although it is known that IL-1 β may induce MMP expression, the results obtained following P2X₇ receptor antagonism indicate that this cytokine is not implicated in the MDMA-induced increase in protease expression and activity.

Taking into account the preventative action of BBG, we evaluated the effect of the antagonist on the serotonergic depletion induced by MDMA 7 days after its administration, with the aim of determining if there is a connection between said effect and the short-term microglial activation and BBB disruption. BBG treatment fails to prevent MDMA-induced 5-HT, 5-HIAA and SERT decreases, indicating that the long-term serotonergic neurotoxicity is independent of the P2X₇ receptor signalling related events following MDMA administration. These results, however, do not exclude the possibility that IL-1 β overexpression might be involved in the modulation of MDMA-induced neurotoxicity in rat hippocampus.

CONCLUSIONS

The results presented in this Doctoral Thesis enable us to conclude that a neurotoxic dose of MDMA produces short-term transitory disruption of BBB integrity and permeability in rat hippocampus. MDMA-induced protease overactivation may be responsible for decreasing tight-junction and basal lamina protein expression leading to an increase in BBB permeability to plasmatic protein and water that ultimately produces transitory edema. These BBB alterations appear to be related to MDMA-induced microglial activation involving a P2X₇ receptor signalling mechanism.



INTRODUCCIÓN

BLOQUE 1. MDMA

1. Aspectos generales

La 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) es un **derivado anfetamínico** con carácter **psicoactivo**. Comúnmente a esta droga se la conoce como *éxtasis*, *XTC*, *Adam* (en América), *E* (en Europa)[39] y actúa como un **estimulante** del sistema nervioso central (SNC) con propiedades **simpaticomiméticas**.

La MDMA, pertenece al grupo de las denominadas “drogas de síntesis” o “drogas de diseño”. Con este nombre se denomina al grupo de sustancias que **no existen en la naturaleza**, cuya síntesis en el laboratorio se comenzó a llevar a cabo por químicos clandestinos con la intención de producir moléculas de semejanza estructural y fisiológica con otras drogas psicoestimulantes y alucinógenas sin fines médicos [40].

2. Historia de la MDMA

A pesar de que el consumo de esta droga se puso de moda a mediados de los años 80, fue sintetizada mucho antes, en 1912 por la compañía farmacéutica alemana Merck como un producto intermediario en la producción de otros compuestos con posible valor comercial, pero sin tener por sí misma ningún tipo de aplicación farmacológica [41, 42]. Los documentos referidos a los primeros estudios farmacológicos de la MDMA que realizó la empresa en 1926 se perdieron como consecuencia de los bombardeos de la Segunda Guerra Mundial [42]. Posteriormente, en los años 50 se estudió su toxicidad, conservándose datos de estas fechas sobre el primer estudio de la droga en animales de experimentación [41]. En estas fechas, la MDMA fue una de las muchas drogas ensayadas en los procedimientos de experimentación llevados a cabo por la Armada Militar de EE.UU. [40]. Fue incluida en el proyecto de investigación ilegal secreto MK-ULTRA de la Agencia Central de Inteligencia (CIA) de los EE.UU. en el que, mediante experimentación en humanos se buscaba identificar y desarrollar drogas y procedimientos para interrogar y torturar prisioneros y debilitar su resistencia a la confesión. No obstante, nunca llegó a utilizarse realmente debido a que uno de los voluntarios del programa de pruebas murió accidentalmente por una sobredosis. La Armada Militar estadounidense perdió entonces el interés en la MDMA y destruyó muchos de los documentos acerca de estas investigaciones [42].

El primer documento científico conocido sobre los efectos fisiológicos de esta droga en humanos fue publicado en 1978 por Shulgin y Nichols [43]. Desde entonces y a principios de la década de los 80, la MDMA fue utilizada en EE.UU. por algunos psicoterapeutas con el fin de incrementar la autoestima del paciente y facilitar la comunicación con el terapeuta [44]. Debido a su habilidad para **promover la comunicación emocional** e **incrementar la empatía**, la MDMA y otras drogas relacionadas, comenzaron a denominarse “entactógenos” o “empatógenos” [42]. También fue en estas fechas cuando la droga llegó a la calle y por primera vez en California, en el año 1984 comenzó a conocerse como *éxtasis* [44]. A pesar de las argumentaciones sobre los beneficios de la droga por algunos de los psicoterapeutas de la época, en 1985 la Agencia Estadounidense para el Control de Estupefacientes (US Drug Enforcement Administration, DEA) prohibió su uso y la clasificó en la Lista I de sustancias controladas al considerarla una droga con **alto potencial de abuso, cuestionar su valor clínico** y evidenciar que su principal metabolito, la MDA **induce degeneración de los terminales de neuronas serotoninérgicas en el cerebro**. De manera análoga, fue igualmente clasificada en otros países como Canadá y Reino Unido [45]. A pesar de ello, la polémica que generó el uso de MDMA para la apertura emocional en psicoterapia hizo que comenzara a distribuirse en la calle como droga recreativa [42].

Actualmente, la asociación norteamericana MAPS (Multidisciplinary Association for Psychedelic Studies; www.maps.org) está realizando ensayos clínicos para probar su potencial como una posible ayuda farmacológica para el tratamiento del trastorno de estrés postraumático en psicoterapia [46-48], bajo la aprobación de la DEA [49].

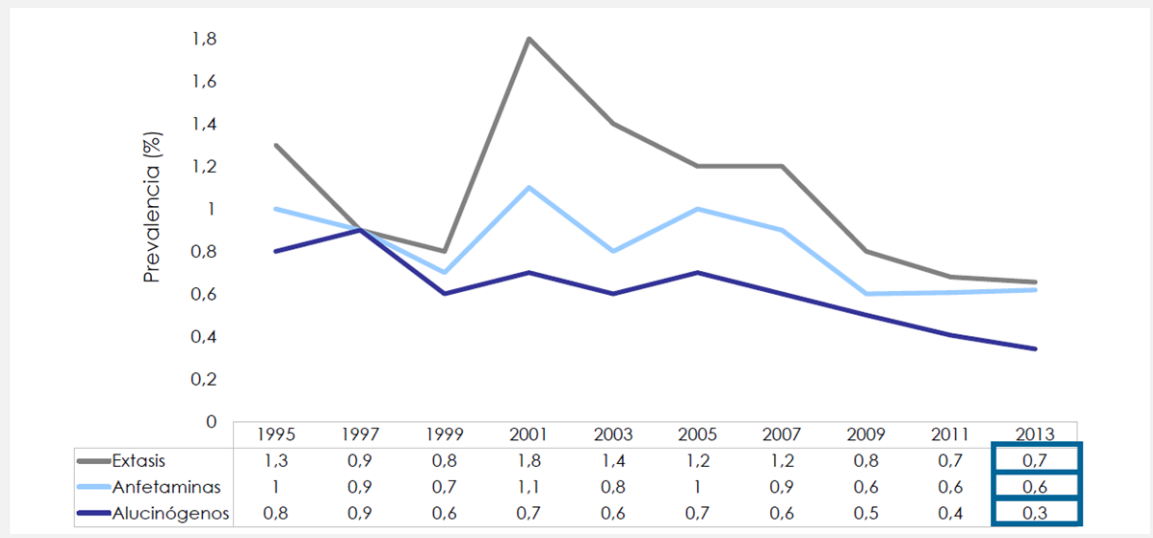
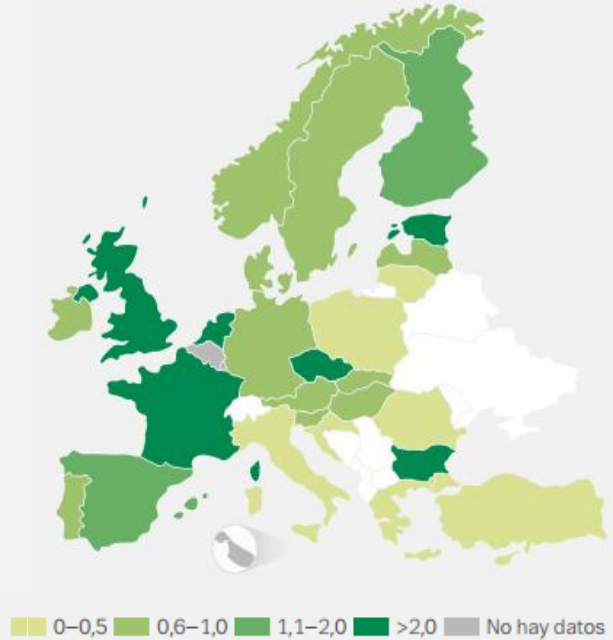
3. MDMA en España

La MDMA es una droga de **uso social** y su consumo se ha visto frecuentemente asociado a fiestas “*raves*” (fiestas de baile con música electrónica y espectáculo de luces de larga duración) [50]. La mayor polémica sobre la MDMA surge en los años 90 con la aparición de la llamada “*ruta del bakalao*”, una ruta por carretera que unía Madrid y Valencia, por la que circulaban miles de jóvenes todos los fines de semana recorriendo muchos kilómetros de discoteca en discoteca y cuya principal droga de consumo era el *éxtasis*. Actualmente la droga afecta a una gama más amplia de usuarios y se restringe a fines recreativos no sólo en fiestas *raves*, sino también en clubes nocturnos y discotecas [40].

En España, la MDMA considerada como **psicotrópico** (por estar incluida en las listas I, II, III o IV del Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971) está regulada por el Convenio

Internacional sobre Sustancias Psicotrópicas de Viena de 1971 (BOE núm. 218/1976, de 10 de septiembre de 1976) y por el Real Decreto 2829/1977 de 6 de octubre de adaptación a la legislación española [51].

Figura 1. Derecha: porcentaje de prevalencia del consumo de éxtasis entre adultos jóvenes (de 15 a 34 años) en Europa durante 2014. Se estima que consumieron éxtasis 1,8 millones de adultos jóvenes (el 1,4 % de este grupo de edad), oscilando las estimaciones nacionales ente el 0.1% y el 3.1%. Datos obtenidos del Observatorio Europeo de las drogas y las Toxicomanías [52].
Debajo: prevalencia del consumo de éxtasis entre la población española (15 - 64 años): Tras su descenso en los últimos años, actualmente se mantiene estable. Datos extraídos de la encuesta sobre alcohol y drogas en España, EDADES 2013/2014.



4. Consumo

El éxtasis, junto a la metanfetamina y la cocaína, es el estimulante más consumido en Europa. Se estima que 10,6 millones de la población adulta de la Unión Europea han consumido éxtasis en algún momento de su vida. En Europa, el consumo alcanzó su máximo a principios del año 2000, estableciéndose una tendencia a la baja entre 2007 y 2012 debido a la detección y

desmantelamiento de laboratorios clandestinos localizados en los principales países exportadores (Bélgica y los Países Bajos), así como al exhaustivo control de sus precursores [52]. Esta misma tendencia ocurrió también a nivel mundial [53]. Sin embargo, más recientemente ha habido signos de recuperación del mercado del éxtasis debido al comienzo de la utilización de nuevos precursores “enmascarados” que puedan importarse legalmente como sustancias no controladas para luego convertirse en precursores químicos de MDMA, en la producción clandestina [52]. Además, como consecuencia de las nuevas vías de síntesis la droga comercializada actualmente presenta mayores niveles de pureza [52, 53] Estos datos junto al incremento en la tendencia indexada de las infracciones relacionadas con la MDMA suponen signos indicativos del resurgimiento del mercado de la MDMA [52].

5. Formatos

La MDMA es una amina que puede existir como base libre o como sal de varios ácidos. Las bases libres son aceites incoloros insolubles en agua [54] mientras que las sales de MDMA son hidrosolubles y pueden administrarse por vía intravenosa o nasal (inhalación), aunque por **vía oral** es la más frecuente [50, 55]. La sal de MDMA más común es el clorhidrato (MDMA-HCl), aunque también puede encontrarse como fosfato [54].

Durante los últimos 20 años, el principal formato de distribución de la MDMA ha sido en **comprimidos** de pureza variable. Las pastillas (en argot *pastis, pirulas, rulas, tostis*) suelen producirse con distintas formas geométricas y colores. Además están troqueladas con una gran variedad de símbolos, logos e incluso personajes populares que les dan diferentes nombres (*Supermanes, Simpsons, Obamas*) según las modas, para hacerlas más llamativas e incentivar su consumo (Figura 2) [40, 56]. La presentación de la MDMA en forma de comprimidos es uno de los factores que han contribuido a su difusión, al resultar atractiva y de sencilla administración oral, además de ser más económica que otras drogas (5-10 euros la pastilla) lo que las hace accesibles a una amplia variedad de consumidores [54].

La composición y pureza de las pastillas es muy variable y suelen estar **adulteradas** incluyendo mezclas de otras sustancias activas como la mefedrona, MDEA, metanfetamina [57], MDA, cafeína, paracetamol [58, 59] o parametoximetanfetamina (PMMA) [52]. El rango de dosis para uso recreativo varía entre 75-150 mg [40, 55, 58]. Gracias al análisis químico de las pastillas incautadas se sabe que ha existido un aumento del contenido de MDMA por pastilla en los tres últimos años. De modo que en 300 mg de producto, de 80 a 150 mg suele ser MDMA, y llega a

ser incluso más de 200 mg en algunos casos [57-59]. Es activa en humanos a partir de los 75 a 100 mg (1-1,5 mg/Kg de peso) [55]. Lo más frecuente es que los consumidores tomen una o más pastillas, e incluso en algunos casos (25% de los consumidores) más de 4 [57, 58], aunque la cantidad consumida es altamente variable de un consumidor a otro. Los efectos de la droga suelen apreciarse a partir de los primeros 20 minutos desde su ingestión, siendo su efecto máximo a la hora [1]. Sus efectos duran de 3 a 6 horas, y no es raro que los usuarios repitan la dosis cuando los efectos de la primera comienzan a disiparse.



Figura 2. Principales formatos de la MDMA: en polvo (en bolsa de plástico o cápsula) y pastillas con múltiples formas, colores y troquelados. *Imágenes tomadas de www.ectasydata.org*

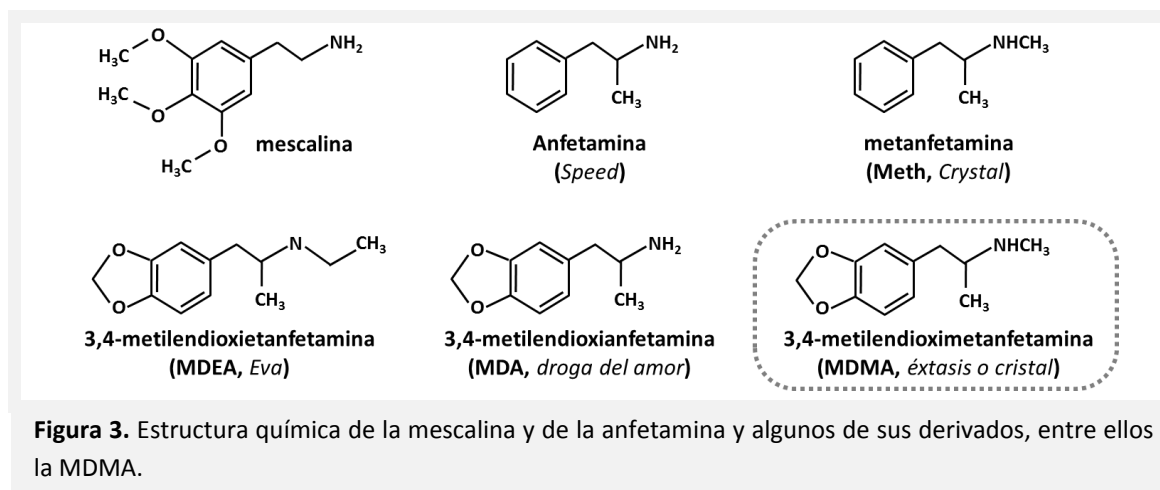
A parte de su presentación en forma de pastillas, cada vez es más frecuente encontrar esta sustancia en forma de **sal cristalizada en polvo** (Figura 2) [52]. En este formato se la conoce como *crystal*, *eme* o *Molly* entre los consumidores, y se distribuye en cápsulas o en el interior de bolsitas de plástico para que el consumidor la esnife o bien introduzca el dedo, lo impregne con la droga y después se lo lleve a la boca [58, 60]. Esta reaparición en Europa de la MDMA en forma cristalina o en polvo de alta pureza parece deberse a su fabricación a partir de precursores no controlados o “enmascaradas” por parte de los productores ilegales [52].

Comúnmente se toma en combinación con otras sustancias legales (alcohol y tabaco) o ilegales (cannabis, cocaína, anfetaminas, alucinógenos), lo que dificulta la interpretación de los resultados obtenidos en estudios de consumidores [46, 60] debido a las interacciones [58].

6. Química y síntesis

Como su nombre indica, la 3,4-metilendioximetanfetamina ($C_{11}H_{15}NO_2$) es un derivado de la metanfetamina (comúnmente denominada *crystal* o *meth*) que presenta un grupo metilendioxi (-O-CH₂-O-) unido en las posiciones 3 y 4 del anillo aromático de la molécula (Figura 3), motivo por el cual también es considerada una anfetamina de anillo sustituido. Por su estructura, es similar a compuestos de carácter alucinógeno como la mescalina [40].

Existen 4 precursores principales para la síntesis de MDMA: safrol, isosafrol, piperonal y 3,4-metilendioxfenil-2-propanona [54], todos ellos contenidos en la Tabla I de Convenio de las Naciones Unidas contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Psicotrópicas de 1988 [53].

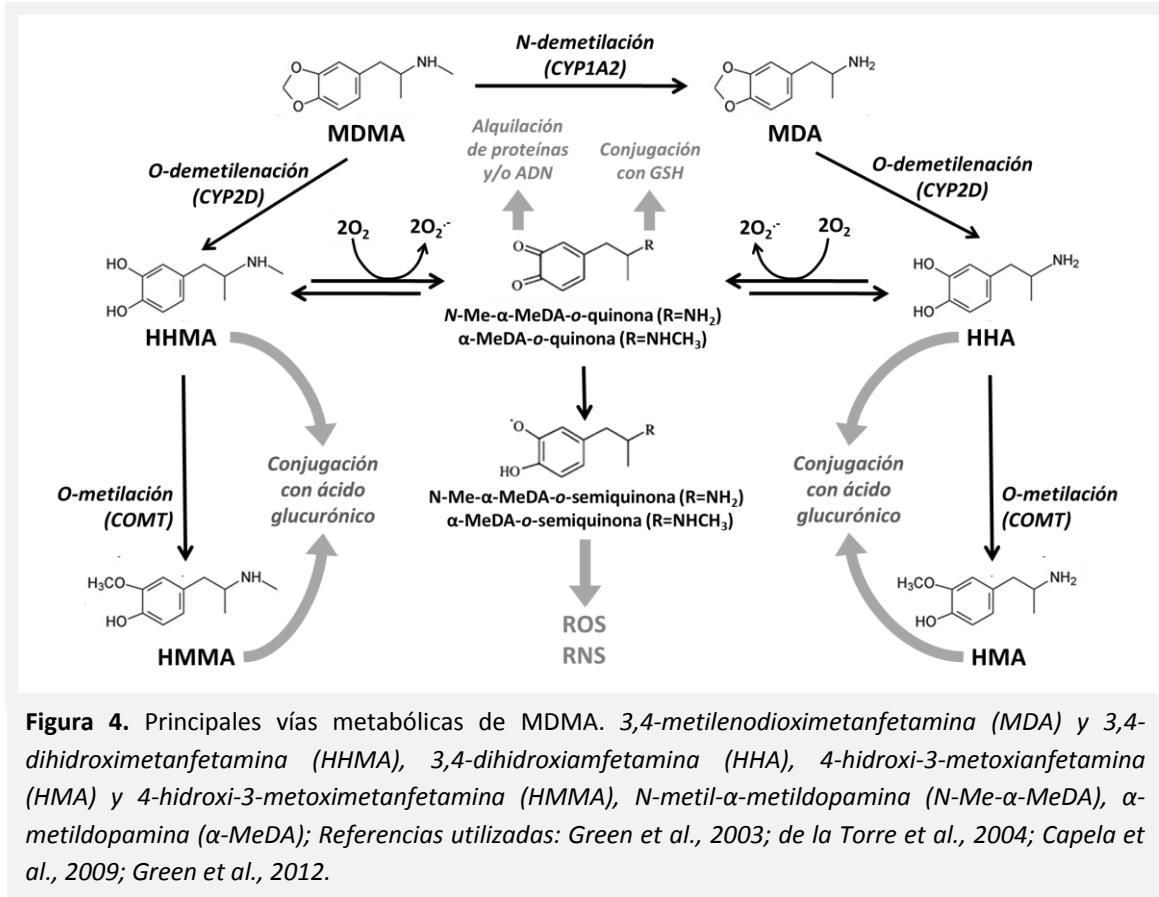


7. Farmacocinética

Tras su consumo por vía oral, la **absorción** de MDMA ocurre en el tracto **gastrointestinal**, alcanzándose la concentración máxima en plasma 2 horas después de la ingestión, siendo su vida media en sangre de 8 horas [40, 55, 61]. La MDMA es activa a dosis de 1 – 1,5 mg/Kg en humanos [50, 61]. En animales de experimentación las dosis letales ensayadas son 98 y 48 mg/Kg i.p. en ratones y ratas respectivamente, y de 22 mg/Kg i.v. en primates [55].

El **metabolismo** de MDMA tiene lugar en **hígado** y en **cerebro** a través del **citocromo P-450 (CYP450)** que produce su desmetilación a metabolitos catecol [1, 56, 61-63]. El metabolismo de la MDMA resulta en la formación de al menos 5 metabolitos principales (Figura 4). Algunos de ellos pueden ser oxidados a σ -quinonas que entran en ciclos de oxidación-reducción y generan

radicales libres, especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*) y de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) además de formar conjugados con glutatión (GSH) reduciendo las defensas antioxidantes [1, 50, 56, 62-64]



La MDMA es un **compuesto quiral**. Sus enantiómeros presentan diferencias farmacológicas entre sí respecto a su actividad, al tiempo de vida media y a la proporción en que se metabolizan a MDA; no obstante se consume o se administra en animales de experimentación como mezcla racémica, lo que minimiza la variabilidad en relación a la farmacocinética [40, 50, 61]. Existen dificultades a la hora de establecer una equivalencia entre la dosis de consumo humano y la administrada en animales de experimentación, debido principalmente a las **diferencias metabólicas entre especies**. La comparación de la dosis en relación a los niveles plasmáticos de MDMA únicamente se correlaciona a dosis bajas (2 mg/Kg en humanos frente a 7 mg/Kg en la rata) [65], puesto que a dosis más altas las diferencias metabólicas hacen que sea preciso incrementar la dosis en rata para lograr niveles plasmáticos de la droga similares a los obtenidos en humanos [50, 61, 65]. Las principales diferencias metabólicas entre rata y humano son el tiempo de vida media de MDMA en plasma (45 minutos en rata frente a 8 horas en humano) y la proporción de MDA generada (24 % del metabolismo

total en rata frente al 10 % en humano) [50]. Además, existen diferencias entre géneros para el metabolismo de MDMA [50] que podrían explicar las discrepancias entre sexos, tanto en ratas como en humanos, respecto a la toxicidad que produce la droga [64].

La eliminación de MDMA y sus metabolitos tiene lugar por **vía renal** de forma moderadamente lenta, aunque también pueden detectarse en saliva, sudor e incluso en el pelo [61]. A pesar de que su vida media en sangre es alrededor de 8 horas, tarda unas 40 horas en eliminarse del organismo en un 95 % [50, 61]. Además, el 40 % de la concentración de metabolitos excretados y el 15 % de la propia MDMA pueden recuperarse desde la orina [61]. Esto, junto al hecho de que muchos de sus metabolitos son farmacológicamente activos explica la persistencia de efectos adversos tras uno o dos días de su consumo [40].

8. Toxicidad y mortalidad

La toxicidad por MDMA puede existir a varios niveles en función del sistema fisiológico más afectado. Existen casos graves registrados de ictericia y fallo hepático con necrosis. Esta toxicidad hepática ocurre como consecuencia de la metabolización hepática de la droga a metabolitos reactivos y generación de estrés oxidativo [40, 46, 56].

Debido al efecto de la MDMA sobre neurotransmisores como la serotonina, dopamina (DA) y especialmente la noradrenalina (NA), su consumo se relaciona con efectos adversos sobre el sistema cardiovascular. Concretamente ocasiona hipertensión, con el riesgo asociado de rotura de vasos sanguíneos y de hemorragia interna y taquicardia, llegando a producir fallo cardiaco y edema pulmonar [40, 46].

El consumo de MDMA puede tener consecuencias graves a nivel cerebral como el desarrollo de convulsiones y ataques epilépticos que es el problema neurológico más frecuentemente asociado. Aunque quizá, el efecto más peligroso sea la respuesta hipertérmica [40, 46, 61, 66]. Esta manifestación es el resultado de la acción directa de la droga sobre los centros reguladores de la temperatura del SNC como el hipotálamo, del aumento en el metabolismo cerebral y de la vasoconstricción periférica de la piel [19, 61]. Además, se relaciona con el incremento de la actividad física y muscular producida por la droga [19] e incentivada por el entorno social de su consumo: locales de baile con ambiente caluroso por el gran acumulo de gente que predisponen a la deshidratación [46, 61]. Los consumidores necesitan ingerir grandes cantidades de agua para evitar el sobrecalentamiento y la principal consecuencia es la

hemodilución e hiponatremia con desarrollo de edema cerebral, que se potencian con la pérdida de sodio durante la sudoración y por el hecho de que MDMA produce una secreción alterada de la hormona antidiurética ADH que agrava la sintomatología [40, 56]. Cuando se produce **hipertermia fulminante** que supera temperaturas de 42 °C, se desencadena una serie de efectos interrelacionados muy graves: rabdomiólisis (daño muscular con mioglobinuria y fallo renal asociados), daño hepático debido a la alta temperatura y a las alteraciones metabólicas, y coagulopatía intravascular diseminada con hemorragias y microinfartos; es decir, fallo multiorgánico que termina en muerte [40, 46, 56, 66, 67].

Las visitas a urgencias y los casos de muertes asociadas a MDMA se relacionan principalmente con todas estas formas de toxicidad [42]. En estos casos, los niveles plasmáticos de MDMA llegan a ser 40 veces superiores a los detectados en consumidores habituales, si bien también se han registrado casos con niveles equivalentes al rango de consumo recreacional. Esto implica que la gravedad de los efectos del consumo de éxtasis es **altamente dependiente de factores ambientales** distintos a la concentración plasmática de la droga. El tratamiento de la toxicidad por MDMA es principalmente sintomático y consiste en enfriar el cuerpo con agua helada y administrar suero salino intravenoso para reducir la hipertermia y sus efectos, así como realizar un lavado de estómago [39, 40, 61], aunque también puede resultar útil administrar fármacos α y β -bloqueantes y relajantes musculares [39]. Por otro lado, también se han descrito muertes por casos de suicidio debidas al desarrollo de un estado de depresión inducida por el consumo de éxtasis o muertes por accidentes debidos a comportamientos arriesgados bajo la influencia de la droga [40].

9. Adicción y dependencia

Hasta ahora, las investigaciones sobre las propiedades adictivas de la MDMA han tenido resultados variables, aunque **los usuarios informan tener síntomas de dependencia**, incluyendo el **consumo continuado a pesar de conocer el daño** físico o psicológico, **tolerancia** (o la disminución de la respuesta a la droga), **dificultad para reducir o dejar de consumir** y los efectos del **síndrome de abstinencia** [46, 60].

Estudios con animales de experimentación indican que **tanto roedores como primates no humanos se auto-administran MDMA**, lo cual indica que la droga tiene efecto sobre los sistemas de recompensa y sugiere su abuso potencial [1, 46, 56, 60]. Además, la administración

repetida de MDMA resulta en una neuroadaptación a largo plazo de la vía mesolímbica dopaminérgica [56].

Por otro lado, se argumenta la improbabilidad de que el desarrollo de dependencia por consumo de MDMA llegue a ser un problema ya que los efectos beneficiosos o placenteros de la droga disminuyen cuando ésta comienza a consumirse con más frecuencia y se acompaña de un incremento en los efectos desagradables que no incentiva, en ningún caso, el consumo con comportamiento dependiente de la droga [40].

En Europa, durante 2014 iniciaron tratamiento de drogodependencia tan sólo unos pocos consumidores por problemas relacionados con el éxtasis: esta droga se mencionó como la principal en menos del 1 % de los consumidores que iniciaron tratamiento por primera vez [52].

10. Efectos de la administración de MDMA en rata

10.1 Disfunción neuroquímica y neurotoxicidad

La administración periférica de MDMA produce un **incremento inmediato en la liberación** de las monoaminas: de **serotonina (5-HT)** en hipocampo, corteza e hipotálamo y de **dopamina** en estriado, núcleo accumbens y corteza prefrontal [1, 46, 56, 68-71] y según algunas evidencias también de **noradrenalina** [1]. Este efecto ha sido demostrado *in vitro* mediante estudios en sinaptosomas y en cortes de cerebro, y en el caso de la liberación de 5-HT y DA también *in vivo* mediante estudios de microdiálisis [69, 70]. Además, la MDMA produce la liberación de acetilcolina (ACh) mediante su efecto directo sobre receptores de histamina H1 [68]; así como de glutamato desde los astrocitos por un mecanismo dependiente de receptores 5-HT_{2A} [72, 73] en el hipocampo de la rata.

Este efecto sobre la liberación masiva de monoaminas es mediado por **la MDMA y/o sus metabolitos** a través de la inhibición de **transportadores de la recaptación de 5-HT (SERT)**, y con menor potencia también de NA (NAT) y de DA (DAT). A través de estos transportadores acceden al interior de los terminales nerviosos y como consecuencia de su interacción revierten el sentido del transporte, bloqueando la recaptura y favoreciendo de esta forma la salida de monoaminas (Figura 5) [1, 46, 56, 63]. Además, dentro del terminal nervioso, la MDMA interacciona con el transportador vesicular de monoaminas (VMAT) alterando la entrada de monoaminas en vesículas sinápticas e incrementando su concentración citoplasmática disponible para ser expulsada al exterior por el funcionamiento reverso de los transportadores

[74]. Este es el principal mecanismo mediante el cual la droga incrementa la concentración extracelular de monoaminas [46], aunque la fusión de vesículas sinápticas dependiente de calcio también ha sido descrita [75].

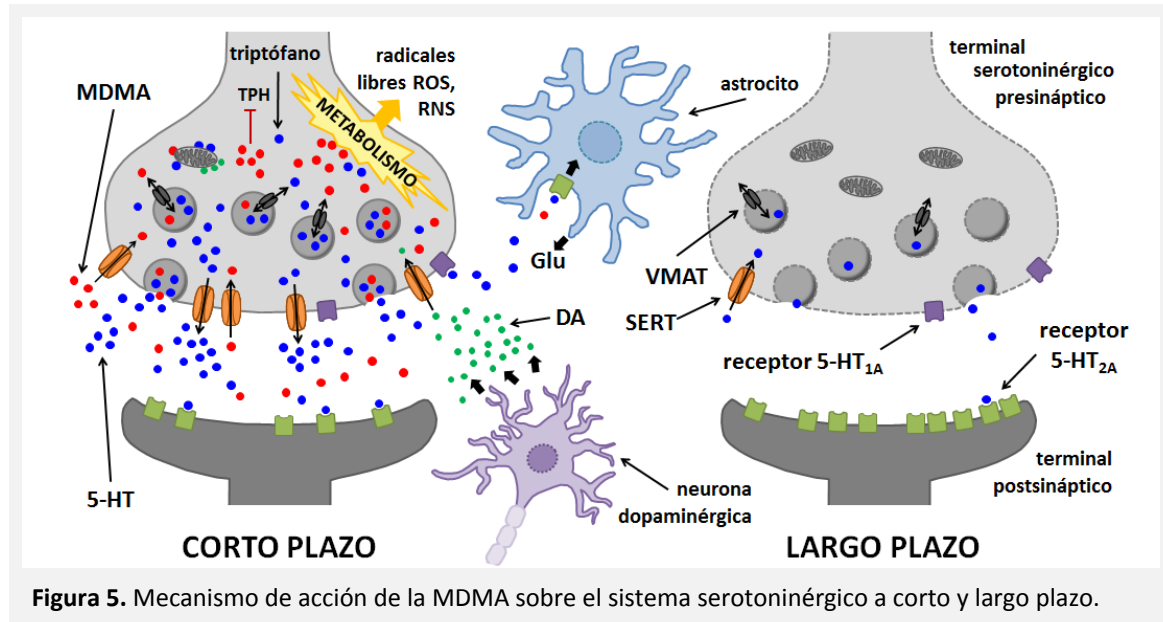


Figura 5. Mecanismo de acción de la MDMA sobre el sistema serotoninérgico a corto y largo plazo.

La MDMA bloquea el catabolismo de las monoaminas al inhibir parcialmente la enzima monoamino oxidasa (MAO) de la membrana mitocondrial externa incrementando el pool de monoaminas citoplasmáticas [1, 56]. Además, **inhibe de forma inmediata e irreversible la actividad de la triptófano hidroxilasa (TPH)**, enzima limitante en la síntesis de 5-HT a partir de triptófano (Figura 5). La inhibición de esta enzima se mantiene durante al menos 8 semanas, recuperándose 32 semanas después [56, 76]. Al producir una inhibición irreversible es necesaria la síntesis de nuevas enzimas para recuperar los niveles basales de 5-HT. Como consecuencia, los niveles tisulares de 5-HT y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), se mantienen reducidos a largo plazo (4 – 12 días después de la administración de MDMA) de forma dependiente de la dosis y de la frecuencia de administración. Este efecto se pone de manifiesto en el hipocampo y la corteza de rata mediante estudios de cromatografía líquida de alta resolución (h.p.l.c., *High-performance liquid chromatography*) [2, 77]. Además, a largo plazo se detecta también una disminución en la densidad de transportadores SERT y en su afinidad por el ligando [2, 4, 11, 78], así como la reducción en los niveles de VMAT [79] y la sobreexpresión de receptores 5-HT_{2A} corticales (Figura 5) como mecanismo de adaptación a la depresión de la transmisión serotoninérgica producida por la MDMA [56]. Estos efectos a largo plazo son específicos para el sistema serotoninérgico, ya que otros neurotransmisores y sus transportadores no se ven afectados [2, 77].

Estas alteraciones a largo plazo son duraderas y pueden apreciarse varias semanas, incluso meses después de la administración de MDMA [1], estando recuperadas de forma región dependiente tras un año [56]. En conjunto, estos efectos suponen evidencias del **potencial neurotóxico selectivo para el sistema serotoninérgico** que tiene la MDMA.

La **neurotoxicidad serotoninérgica** producida por MDMA a largo plazo se previene mediante el pretratamiento con la droga [80, 81] o con fluoxetina, sin verse modificada la hipertermia [82]. Además **es consecuencia de la acción de un metabolito activo de la MDMA generado periféricamente** y no de la propia molécula de MDMA, ya que su infusión directa en el SNC no produce las alteraciones neurotóxicas selectivas indicadas anteriormente, a pesar de inducir la liberación aguda de 5-HT [61, 83]. Concretamente, se ha visto que la α -MeDA conjugada con glutatión o con tioéteres y administrada directamente en el SNC, produce perfiles neurotóxicos [63, 84].

Otras evidencias indican que varios días después de la administración de MDMA ocurre una pérdida de terminales axónicos serotoninérgicos procedentes del núcleo dorsal del rafe [6] en corteza, hipocampo y estriado de la rata. Mediante el marcaje histológico selectivo de 5-HT, TPH y SERT se aprecian rasgos de **degeneración axonal** [85] tras 36 – 48 horas de la administración de MDMA **y disminución de la densidad de fibras axónicas** tras 1-2 semanas [5, 6] que se recupera a los 2-8 meses [5] mediante una re-inervación alterada en algunos casos. Otra evidencia a favor de la alteración de axones serotoninérgicos a largo plazo es la **disminución del transporte anterógrado tras la administración de MDMA** [86].

Respecto a las neuronas propiamente dichas, estudios *in vitro* determinan que la aplicación de **MDMA induce apoptosis en cultivos celulares de corteza e hipocampo** [56, 87]. Esta apoptosis tiene lugar a 40°C en asociación a la activación de caspasa-3 y -8, y puede prevenirse mediante el antagonismo de receptores 5-HT_{2A} o con el uso de antioxidantes, precursores de glutatión (GSH) e inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS) [88, 89]. *In vivo*, **estudios inmunohistológicos** con FluoroJade (marcador de muerte neuronal) **revelan neurodegeneración** en la corteza parietal y perirrinal y en el tálamo 3 días después de la administración de MDMA (20mg/Kg); mientras que la dosis de 10mg/Kg únicamente produce degeneración neuronal en animales que sufrieron hipertermia superior a 40,6°C [90]. También se ha descrito el **incremento de las proteínas Bax y Bcl-2 implicadas en los procesos apoptóticos, en el hipocampo** de rata tras 7 días [91]. Más específica y recientemente se ha visto que el tratamiento con varias inyecciones de MDMA produce una disminución **de**

interneuronas GABAérgicas positivas para parvoalbúmina en el giro dentado [73] y afecta al proceso de neurogénesis [56].

10.2 Estrés oxidativo

El metabolismo de MDMA conduce a la generación de ROS, RNS y a la disminución de las defensas antioxidantes en cardiomiocitos [92] y hepatocitos [93] induciendo la apoptosis de estas células, siendo este el mecanismo principal de toxicidad hepática y cardiovascular [94].

A nivel del SNC puede detectarse, mediante microdiálisis, la producción inmediata de radicales libres en los terminales serotoninérgicos del hipocampo de la rata [95, 96] y un incremento en el grado de peroxidación lipídica 3 y 6 horas después de la administración periférica de MDMA [95, 97]. A parte del metabolismo de MDMA, en el cerebro el metabolismo de monoaminas por la enzima MAO, la activación de la NOS y la hipertermia contribuyen a la generación de radicales libres y estrés oxidativo tras la administración periférica de la droga (figura 6). Los radicales hidroxilos y el peroxinitrito generados por estos mecanismos alteran la función mitocondrial y pueden oxidar moléculas de ADN, lípidos y proteínas (como la TPH, VMAT y proteínas de la cadena de transporte electrónico mitocondrial) perturbando la función celular e iniciando cascadas de señalización que medien los procesos de neurotoxicidad [56, 74, 87].

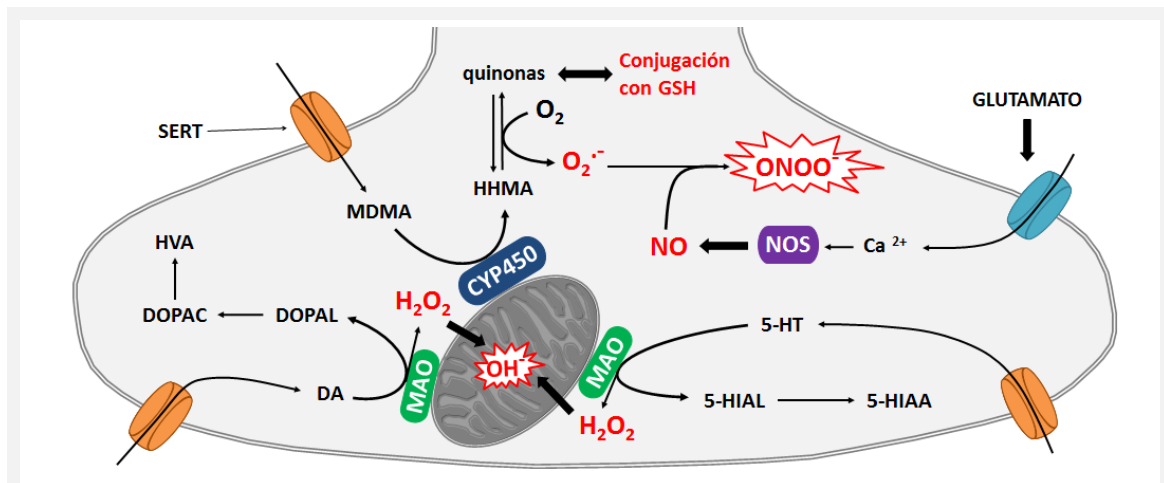


Figura 6. Mecanismos de generación de estrés oxidativo tras la administración de MDMA. 5-HT, serotonina; 5-HIAL, 5-hidroxiindolacetaldehído; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético; DA, dopamina; DOPAL, 3,4-dihidroxifenilacetaldehído; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA, ácido homovalínico; HHMA, 3,4-dihidroximetanfetamina.

De hecho, la generación de **estrés oxidativo tras la administración periférica de MDMA o de sus metabolitos**, parece ser el **principal mecanismo responsable de la neurotoxicidad**

serotoninérgica a largo plazo [68, 74]. La coadministración de MDMA con el agente captador de radicales libres, el α -fenil-N-terbutilnitrona (PBN) [3], con inhibidores de la NOS [56, 98] o con inhibidores de la MAO-B [56] previenen la formación de radicales libres y como consecuencia, la neurotoxicidad. Además, la formación de radicales libres tras la administración de MDMA puede inhibirse al prevenir la hipertermia inducida por la droga [99]. Estudios *in vitro* determinan que la citotoxicidad producida por MDMA en relación a la producción de ROS y RNS, la disminución de GSH, la alteración mitocondrial y la depleción de las reservas de ATP está exacerbada por la hipertermia [100]. Por lo que, su prevención [101, 102] o la generación de hipotermia [103], protegen parcialmente frente a la neurotoxicidad serotoninérgica a largo plazo; si bien es posible observar neurotoxicidad por MDMA en ausencia de hipertermia [2, 67].

10.3 Neuroinflamación

Tras la administración de MDMA, en las regiones donde ocurre daño de los terminales serotoninérgicos, se dispara la respuesta neuroinflamatoria [87]. El término **neuroinflamación** se refiere generalmente a la cascada de eventos que genera modificaciones celulares (microglía, astrogliá y células inmunes infiltradas) y moleculares (citoquinas proinflamatorias, quimioquinas) a modo de respuesta inmune dentro del SNC.

Existen evidencias de la inducción de la **activación microglial** como consecuencia de la administración de MDMA [7]. Los estudios de Orio y *cols.*, (2004) demuestran el **incremento en la expresión del marcador microglial OX-42** y de la densidad de los receptores periféricos de benzodiazepinas, desde 3 horas después de la administración de MDMA hasta 24 y 48 horas respectivamente para cada marcador, tanto en la corteza frontal como en el hipotálamo. Además, existe un incremento inmediato de los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en dichas áreas [8, 74] que puede prevenirse de forma región dependiente mediante el tratamiento con minociclina, un inhibidor de la actividad microglial [10]. También puede observarse a tiempos cortos la colocalización de los marcadores microgliales con el receptor de cannabinoides tipo 2 (CB2), cuya señalización inhibe la activación microglial [7, 9, 87, 104].

Respecto al efecto de la MDMA sobre la astrogliá, algunos estudios indican que la expresión del marcador astrocitario GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) no está alterada [8, 105]. Sin embargo, otras publicaciones revelan un **incremento en la expresión de GFAP** en el contexto de la neurotoxicidad **inducida por la droga** [56, 106-108], manteniéndose en algunos casos esta astrogliosis incluso a largo plazo [109, 110].

Junto al estrés oxidativo, la respuesta neuroinflamatoria supone uno de los factores que contribuyen parcialmente a la neurotoxicidad serotoninérgica a largo plazo por MDMA [7, 9, 10]. La administración de IL-1 β exógena i.c.v. potencia la neurotoxicidad inducida por MDMA a través de una potenciación de la hipertermia [111], mientras que la inhibición de la activación microglial la previene en la corteza frontal, pero no en el hipotálamo [10].

10.4 Hipertermia

Tras la administración de MDMA se produce una característica **respuesta hipertérmica aguda** [1, 11]. Esto se debe, en parte, a la **alteración de la termorregulación** producida por la activación de receptores α -adrenérgicos centrales y periféricos que producen vasoconstricción periférica limitando la disipación de calor por vasodilatación de los vasos de la cola (principal mecanismo termorregulador de la rata) [67, 69, 112]. El mecanismo por el cual la MDMA media la respuesta hipertérmica es multifactorial y parece involucrar a los sistemas de neurotransmisión por 5-HT, DA y NA [56, 71, 112]. El incremento de los niveles de 5-HT induce lo que se denomina **síndrome serotoninérgico** (ver más adelante) y se relaciona con un aumento de temperatura [1, 66]. No obstante, aunque esté involucrada, la 5-HT no parece ser directamente la inductora de la respuesta hipertérmica [112, 113]. De igual forma, el rápido y agudo incremento en los niveles de IL-1 β , que además de ser proinflamatoria es pirógena [67], tampoco parece ser el responsable sino más bien una consecuencia de esta [8, 67, 111].

Esta respuesta hipertérmica es profundamente **dependiente de la temperatura ambiental** [1, 19, 112, 114]: una temperatura ambiental de 4-15°C previene la hipertermia [8, 67, 102, 115], mientras que una temperatura elevada superior a 28°C la potencia hasta el punto de constituir una amenaza para la vida del animal [56, 67, 102]. Además, la temperatura ambiental también afecta a la tasa metabólica y a la pérdida de calor por evaporación [1, 67, 115] alterando la capacidad termorreguladora de los animales de forma duradera incluso hasta varias semanas después de la administración de MDMA [116].

La respuesta hipertérmica puede estar además influenciada por lo que se denomina **toxicidad por agregación**. Se trata del efecto de potenciación de la hipertermia, de la toxicidad y de la letalidad que ocurre cuando, durante el tratamiento con MDMA, los animales se disponen agrupados o agregados frente a lo que ocurriría si estuvieran aislados [1, 19, 56, 67, 112]. Este efecto es análogo a la potenciación de la toxicidad que ocurre en humanos que consumen la droga en ambientes de fiesta atestados de gente [1, 56].

10.5 Efectos fisiológicos

Por sus **propiedades simpaticomiméticas**, la administración de MDMA en rata tiene efectos sobre el sistema cardiovascular (taquicardias, arritmia, incremento en la presión arterial y vasoconstricción) [1, 56, 117] y endocrino (incremento en la secreción de corticosterona y prolactina). También media el aumento en los niveles de **aldosterona, renina y vasopresina** [1].

Además, como consecuencia del incremento inmediato de serotonina extracelular, los animales manifiestan lo que se denomina **síndrome serotoninérgico** [1, 56, 68] que incluye los siguientes síntomas: incremento en la actividad locomotora, hipertermia, piloerección, proptosis, erección peneana, eyaculación, salivación, defecación y dependiendo de la dosis convulsiones e incluso la muerte. El incremento en la actividad locomotora también es consecuencia de la liberación aguda de DA [1]. La mayoría de estos síntomas pueden prevenirse mediante el tratamiento con fluoxetina o antagonistas del receptor 5-HT_{2A} [1].

10.6 Efectos comportamentales y alteraciones cognitivas

Inmediatamente después de la administración de MDMA, los animales incrementan su actividad locomotora y manifiestan una respuesta ansiogénica determinada en campo abierto y en el laberinto de brazos en cruz elevado [56, 118], mientras que varias semanas después su efecto es ansiolítico en estas mismas pruebas [119] y la actividad locomotora se encuentra disminuida [120].

Varios días después de producirse el síndrome serotoninérgico inducido por MDMA, se pone de manifiesto un comportamiento depresivo [56]. Además, como consecuencia de la reducción de la señalización serotoninérgica en regiones como el hipocampo, se observan déficits en el aprendizaje, alteración de la memoria espacial [120] y de reconocimiento no espacial [120, 121] y disminución de las interacciones sociales [56].

11. Efectos de la MDMA en primates no humanos

La administración de MDMA en primates no humanos induce una respuesta hipertérmica a corto plazo [112] y una disfunción preferente del sistema serotoninérgico a largo plazo, equivalentes a las descritas en rata, si bien los primates requieren dosis menores de la droga para obtener efectos similares respecto a la disminución en el contenido de 5-HT y 5-HIAA

y en la densidad de transportadores SERT en varias áreas cerebrales [1, 56, 122]. Los efectos neurotóxicos en primates no humanos se aprecian también tras la administración de una única dosis y tienen lugar a concentraciones plasmáticas equivalentes a las encontradas en consumidores de MDMA [123]. Además, existen evidencias de alteraciones neuronales, así como de una marcada reducción de axones serotoninérgicos en neocórtex y en hipocampo 2 semanas después de la administración de MDMA que se mantiene durante años, apreciándose reorganización de las proyecciones con patrones de inervación anormales tras 18 meses [56, 124, 125].

A nivel comportamental, se han descrito manifestaciones en primates no humanos equivalentes a las observadas en consumidores, tales como disminución del apetito, temblores, bruxismo (apretar y chirriar de dientes) o distonía (contracciones musculares involuntarias que causan movimientos repetitivos o posturas anormales). Estas alteraciones son consecuencia del síndrome serotoninérgico generado por MDMA y, al igual que en humanos, no se correlacionan con los niveles plasmáticos de la droga [126].

12. Efectos del consumo de MDMA en humanos

Las evidencias sobre el efecto de la MDMA en humanos proceden de una gran diversidad de estudios. Existen datos sobre consumidores que asistieron a centros de emergencia tras intoxicación por MDMA [127, 128], estudios post-mortem [129-131] y estudios retrospectivos [132-137] sujetos a una alta variabilidad entre consumidores respecto a las características del consumo (duración y dosificación), a la adulteración de las pastillas ingeridas y al policonsumo, parámetros que dificultan la interpretación de los resultados. Por otro lado, los estudios prospectivos están sujetos a estrictas consideraciones éticas, habiendo sido cuestionado incluso el uso de dosis bajas [138, 139], si bien en la última década han sido aprobados por la DEA ensayos clínicos con MDMA para determinar el potencial de la droga como tratamiento farmacológico coadyuvante a la psicoterapia en individuos con trastorno de estrés post-traumático [46-49].

En cualquier caso, los estudios sobre los efectos de la MDMA en humanos incluyen análisis comportamentales y el uso de técnicas poco invasivas como determinaciones plasmáticas o del líquido cefalorraquídeo (LCR) y estudios de imagen mediante tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) y resonancia magnética.

12.1 Efectos neuroquímicos y neurotóxicos

Al igual que en rata, el consumo de MDMA induce a corto plazo el **incremento de los niveles extracelulares de monoaminas**, especialmente de serotonina, pero también de DA y NA [112]. Esto se pone de manifiesto por la disminución en la concentración de 5-HIAA en el LCR detectada en consumidores como reflejo indirecto de una elevada liberación de 5-HT durante la actividad neuronal [40, 125]. Mediante SPECT también se observa una disminución de receptores 5-HT_{2A} postsinápticos inversamente correlacionada con el periodo de abuso de la droga [56, 125], como respuesta adaptativa a la liberación masiva de 5-HT en la corteza cerebral [40].

Existen evidencias del efecto neurotóxico a largo plazo de la MDMA sobre el sistema serotoninérgico en el cerebro humano [40, 56], mientras que su posible efecto sobre las neuronas dopaminérgicas no está confirmado [140, 141]. El estudio postmortem de un único individuo que consumió MDMA durante un largo periodo de tiempo, revela una reducción de un 50-80% en los niveles de 5-HT y sus metabolitos en varias regiones cerebrales, mientras que los niveles de DA no se encuentran alterados [40, 56, 131]. Por otro lado, las técnicas de PET y SPECT permiten estudiar *in vivo* la densidad de SERT como marcador fiable de la integridad axónica y de daño presináptico [56] y por tanto, de neurotoxicidad serotoninérgica inducida por el consumo de MDMA en humanos [142]. Los consumidores en periodo de abstinencia muestran una reducción dosis dependiente en la disponibilidad de SERT en regiones corticales y subcorticales, que se puede recuperar parcialmente a largo plazo [125, 143]. También se ha demostrado un incremento en la densidad de receptores 5-HT_{2A} postsinápticos en varias áreas corticales, en compensación a la reducción de la señal serotoninérgica y el daño presináptico inducidos por la droga. Este aumento es mayor cuanto más largo fue el periodo medio de consumo [144]. Además, los niveles de SERT son menores en las regiones en que el receptor 5-HT_{2A} está incrementado [145]. Puesto que la señalización serotoninérgica neocortical tiene un papel inhibitorio, la disminución crónica de dicha señalización que tiene lugar a largo plazo tras el consumo de MDMA, induce un incremento en la excitabilidad que se confirma con estudios de resonancia magnética funcional en consumidores [56, 125, 143].

Esta disfunción del sistema serotoninérgico tras el consumo de MDMA parece ser más marcada en mujeres que en hombres, tanto a corto [56] como a largo plazo [125], por lo que aparentemente son más susceptibles a los efectos neurotóxicos de la droga.

A pesar de la variabilidad, los estudios en humanos muestran alteraciones a largo plazo, principalmente sobre el sistema serotoninérgico, por el consumo de MDMA que, pese a no ser siempre concluyentes si son preocupantes ya que pueden suponer cambios funcionales que contribuyan a las afecciones psiquiátricas clínicas o subclínicas y a cambios comportamentales [56, 125].

12.2 Efectos fisiológicos y psicológicos

Por lo general, el consumo recreativo de MDMA está dirigido a la obtención de una serie de **efectos psicológicos y fisiológicos deseables** por el consumidor (Tabla 1). Psicológicamente, tiene los efectos propios de una droga **empatógena** o **entactógena** es decir, euforia, bienestar, percepción sensorial agudizada, mayor sociabilidad, extroversión, un aumento de la cercanía emocional y de la tolerancia hacia los sentimientos de los demás. Este estado de conciencia alterado incluye connotaciones emocionales [40, 46, 55, 56, 61], además de producir alteraciones perceptivas visuales, temporales y táctiles [39, 46]. Al ser una droga estimulante, produce un incremento del estado de vigilia, de la resistencia física y la excitación sexual, reduciendo la sensación de la fatiga y la somnolencia. No obstante, la exageración de estas manifestaciones culmina en el desarrollo de **efectos indeseables** que en ocasiones perduran hasta varios días después del consumo (Tabla 1) [40, 46].

Al igual que en animales de experimentación, el consumo de MDMA produce **hipertermia** que puede llegar a superar los 41°C [66, 67]. Esta respuesta hipertérmica puede agravarse resultando en la forma de toxicidad aguda por MDMA asociada a mortalidad más frecuente [40, 56, 61]. El síndrome serotoninérgico y el incremento en la actividad metabólica conducen al aumento de la temperatura corporal en humanos, según estudios clínicos o estudios en fiestas de baile o discotecas. Los mecanismos por los que se genera hipertermia son similares a los que tienen lugar en animales de experimentación, salvando las diferencias respecto a los mecanismos termorreguladores para la disipación de calor [66].

A pesar de estos efectos agudos desagradables, la mayoría de los consumidores consideran el consumo de MDMA una experiencia más positiva que negativa. No obstante, la repetición cada vez más frecuente del consumo hace que los efectos perjudiciales tengan una mayor manifestación frente a los beneficiosos [40].

Los efectos emocionales y sociales deseables producidos por la droga son, probablemente causados directa o indirectamente por la liberación de 5-HT, prolactina y

oxitocina; mientras que el incremento de dopamina se relaciona con la actividad motora y el estado de euforia. Los cambios fisiológicos serían consecuencia de la liberación de noradrenalina [40] y del incremento agudo en las concentraciones plasmáticas de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), cortisol, hormona del crecimiento y vasopresina [56, 61, 125].

		EFFECTOS AGUDOS	EFFECTOS A LOS POCOS DÍAS DEL CONSUMO	EFFECTOS A LARGO PLAZO
EFFECTOS PSICOLÓGICOS	DESEABLES	<ul style="list-style-type: none"> - Incremento de la vigilia, la resistencia física (reducción de la sensación de fatiga y somnolencia) - Incremento de la excitación sexual - Euforia y sensación de bienestar - Percepción sensorial agudizada - Incremento en la sociabilidad, extroversión y empatía 		
	INDESEABLES	<ul style="list-style-type: none"> - Fuga de ideas (incapacidad de concentrarse en una idea de manera productiva) - Alucinaciones leves - Despersonalización (sentimiento de separación de uno mismo respecto a su cuerpo) - Ansiedad y agitación - Comportamiento extraño e imprudente 	<ul style="list-style-type: none"> - Depresión - Insomnio - Dificultad para concentrarse - Ansiedad - Irritabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Alteraciones de la memoria verbal y visual - Alteración de la toma de decisiones (funciones ejecutivas), en el procesamiento de información, razonamiento lógico y resolución de problemas sencillos - Incremento en la impulsividad y pérdida del autocontrol - Ataques de pánico - Paranoias recurrentes, alucinaciones, despersonalización y episodios psicóticos - Depresión severa y pensamientos suicidas
EFFECTOS FISIOLÓGICOS		<ul style="list-style-type: none"> - Trismo (Incremento de la tensión mandibular) - Bruxismo (apretar y rechinar de dientes) - Incremento en la actividad motora - Hipertermia - Sudoración - Náuseas - Falta de apetito - Dolor de cabeza - Visión borrosa, midriasis - Sequedad de boca - Incremento de la frecuencia cardíaca y de la presión sanguínea 	<ul style="list-style-type: none"> - Dolor muscular en mandíbula, lumbares y extremidades - Náuseas - Falta de apetito - Dolor de cabeza - Visión borrosa - Sequedad de boca - Fluctuaciones en la frecuencia cardíaca y en la presión sanguínea 	<ul style="list-style-type: none"> - Desgaste dental - Fatiga

Tabla 1. Clasificación de los principales efectos psicológicos y fisiológicos producidos por el consumo de MDMA. Datos extraídos de las revisiones de Kalant *et al*, 2001; Meyer, 2013.

El agotamiento de las reservas de 5-HT tras su liberación masiva y la disminución de la transmisión serotoninérgica conduce al desarrollo de confusión, trastornos del sueño y depresión a los pocos días del consumo de MDMA [40], mientras que a largo plazo se asocia a alteraciones psicopatológicas (Tabla 1) [56, 61, 125]. De este modo, el abuso de MDMA

mantenido en el tiempo supondría un factor de vulnerabilidad al desarrollo de trastornos psicóticos, a parte de los efectos psicóticos agudos que de por sí produce la droga [87].

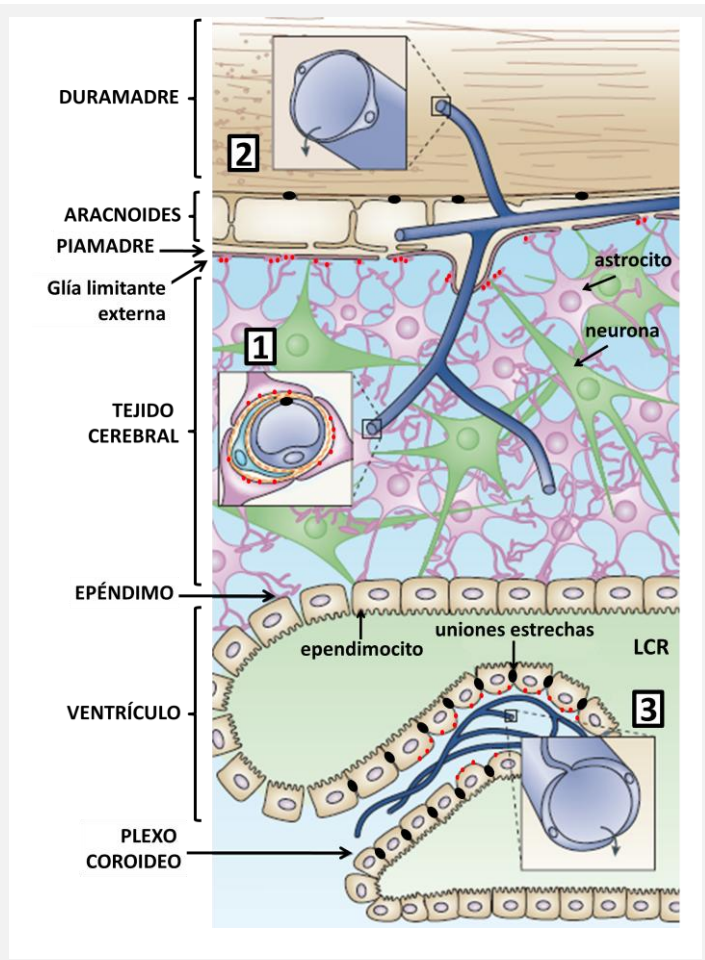
En términos clínicos, se ha relacionado el daño neurotóxico con la pérdida gradual de algunas funciones cognitivas (aprendizaje, memoria y capacidad para el desarrollo de pruebas complejas [56, 61]. Estudios de electroencefalografía (EEG) y PET revelan alteraciones en los espectros de frecuencias de las ondas cerebrales [146], disminución del transportador SERT [147] e hipometabolismo de la glucosa [148, 149] en corteza e hipocampo, efectos relacionados con empeoramiento de la atención, déficits de la memoria verbal y visual, del procesamiento lógico y la toma de decisiones en consumidores de MDMA sometidos a pruebas cognitivas [40, 87, 142, 148]. Aunque en muchos casos estos déficits cognitivos sean sutiles o subclínicos, podrían contribuir a acelerar el proceso de empeoramiento cognitivo propio del envejecimiento [125].

BLOQUE 2. BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

1. Aspectos generales

El SNC es el más sensible del organismo. La señalización química y eléctrica entre las neuronas requiere un microambiente controlado indispensable para una adecuada funcionalidad. Por ello, para mantener la homeostasis existen barreras que separan el fluido intersticial cerebral de la sangre y regulan de forma muy precisa el paso de sustancias [150].

Figura 7. Tipos de barrera dentro del sistema nervioso central. (1) Barrera hematoencefálica. (2) Epitelio aracnoideo que forma la capa media de las meninges. (3) Epitelio de los plexos coroideos con vasos sanguíneos fenestrados, de forma que las uniones estrechas (puntos negros) se localizan a nivel de los endotelios. En los órganos circunventriculares (no representados) los vasos sanguíneos también son fenestrados y las uniones estrechas se encuentran en los tunicos [151]. Los puntos rojos del esquema representan las zonas en las que tiene lugar el movimiento regulado de agua. Por debajo de la piamadre y de los endotelios se encuentra la capa glial limitante externa que también participa en la regulación del flujo de agua [152]. Imagen modificada de Abbott et al, 2006.



La primera evidencia experimental de la existencia de la barrera hematoencefálica (BHE) fue descrita por Paul Ehrlich en 1885 cuando al administrar un marcador coloreado en la circulación sistémica observó que todos los órganos se coloreaban a excepción del SNC. Sin embargo, no fue hasta 1913 cuando él y su discípulo Edwin Goldman sugirieron la existencia de una **barrera entre el SNC y la sangre** tras observar que la inyección de azul tripán en el LCR teñía el SNC pero no el sistema periférico. El médico alemán Lewandowsky fue el primero en utilizar el

término *bulthirnschranke* (barrera hemato-encefálica) para definir esta estructura, a pesar de que experimentos con sustancias, como las anilinas básicas para las que la BHE es permeable, crearon gran controversia acerca de la realidad de su existencia física y de sus propiedades selectivas. Por ello, no fue hasta 1961 con la llegada del microscopio electrónico que se atribuyó la cualidad de barrera selectiva a las propiedades especiales de las **células endoteliales** [13]. En 1967, Reese y Karnovsky observaron que el trazador electrodenso HRP (*Horseradish Peroxidase*) de 40kDa, administrado por vía intravenosa, no alcanzaba inmediatamente el SNC, pero tras tiempos de circulación más largos aparecía en el LCR, en el espacio extracelular de los plexos coroideos, en los vasos sanguíneos de la piamadre y en algunas regiones del diencefalo, zonas todas ellas con vasos sanguíneos fenestrados sin propiedades de barrera hematoencefálica [153].

2. Fisiología de la BHE

Actualmente sabemos que, en la mayoría de los vertebrados, las barreras selectivas que separan la sangre del tejido nervioso o del fluido intersticial se localizan a nivel del endotelio de la microvasculatura del SNC, en el epitelio de los plexos coroideos, en el epitelio aracnoideo (Figura 7) y en los tunicitos de los órganos circunventriculares (área postrema, eminencia media, glándula pineal, órganos subfornical y lámina terminal) [18, 151, 154-156]. Todas estas barreras, incluidas las que existen entre la sangre y la médula espinal y la barrera hematorretiniana, restringen el paso de sustancias entre la sangre y el tejido en que se encuentran [18]. De todas ellas, la BHE establecida a nivel del endotelio vascular es la que constituye la mayor y más extensa superficie de control de los flujos moleculares directamente entre la sangre y las células del SNC [155]. Esta barrera está presente en todas las regiones cerebrales a excepción de aquellas reguladas por el sistema nervioso autónomo y las glándulas endocrinas [29].

La especialización de la BHE permite regular el flujo de sustancias entre la sangre y el parénquima cerebral al **limitar el transporte paracelular**, estableciendo el **transporte transcelular como la vía de paso mayoritaria** [155]. La BHE dispone de mecanismos de transporte especializados (Figura 8) que permiten la entrada de los nutrientes requeridos y favorece la expulsión al torrente sanguíneo de metabolitos o sustancias tóxicas. Además, la combinación de enzimas intracelulares (CYP450) y extracelulares (peptidasas y nucleotidasas), pueden inactivar muchos compuestos neuroactivos tóxicos [151, 157]. Muchos de los transportadores de la cara luminal del endotelio pertenecen a la familia ABC (*ATP-binding Cassette*) que median la expulsión de muchas toxinas y fármacos con diversas estructuras a la sangre [157]. Pese a la baja tasa de endocitosis que tienen las células endoteliales, ciertas

proteínas son transportadas por transcitosis mediada por receptor, mientras que las proteínas plasmáticas que apenas se transportan a través de la BHE, podrían acceder por transcitosis adsortiva (figura 8) [151].

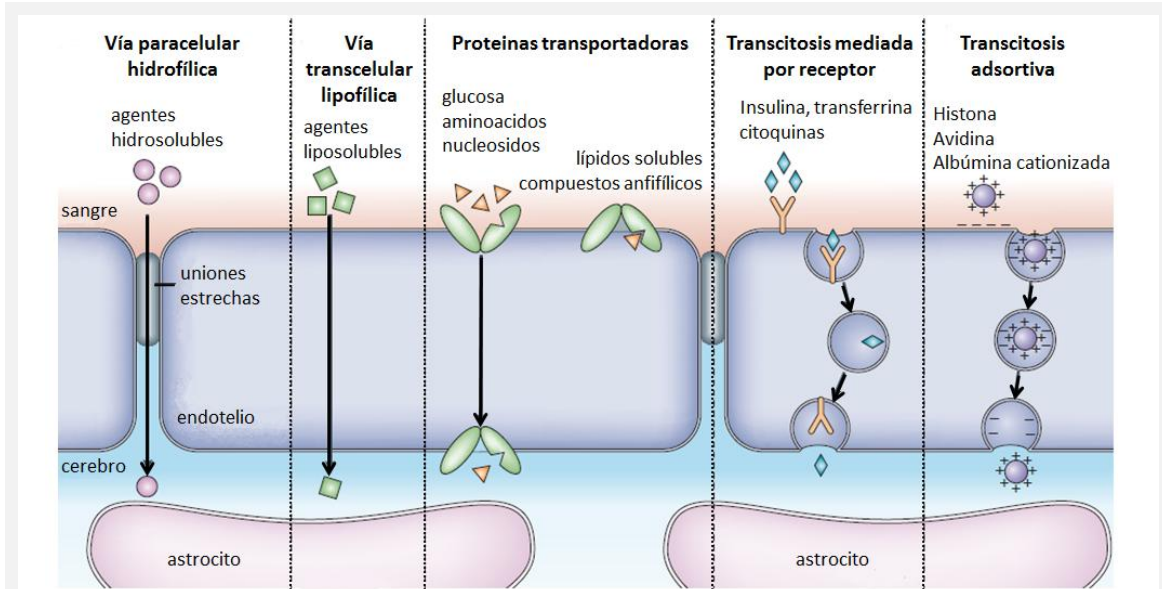


Figura 8. Rutas de acceso a través de la BHE. Imagen modificada de Abbott et al, 2006.

Como resultado de las propiedades físico-químicas del endotelio, la BHE actúa como barrera física, de transporte, enzimática o metabólica e inmunológica [151, 155], y sus principales funciones son:

- Mantener la homeostasis del SNC regulando el balance iónico (manteniendo una baja concentración de potasio y calcio en el espacio intersticial).
- Proporcionar constantemente nutrientes al cerebro.
- Evitar el acceso de xenobióticos, metabolitos y neurotransmisores periféricos al SNC, así como metabolizar, inactivar y expulsar metabolitos neurotóxicos del espacio intersticial, para minimizar la muerte celular y preservar la conectividad neural.
- Impedir el paso libre de sustancias inmunoactivas o proinflamatorias y de células inmunes, participando así en la modulación de la respuesta neuroinflamatoria.

3. Estructura de la BHE: Unión neurovascular

La BHE que existe a nivel del **endotelio especializado** de los vasos sanguíneos cerebrales constituye una **barrera física de difusión selectiva**. Además del endotelio, varios tipos celulares y

no celulares del tejido nervioso participan en el mantenimiento e integridad de la BHE formando la **segunda línea de defensa**. Al conjunto de todos estos elementos se le denomina **unión neurovascular** (Figura 9). El término *neurovascular* se utilizó inicialmente para referirse a la comunicación existente entre grupos de neuronas y células gliales con el endotelio vascular en relación a la regulación del flujo cerebral. Actualmente, el concepto de unión neurovascular se aplica a nivel de los capilares y vasos de pequeño calibre donde, además tiene lugar la función de BHE. La unión neurovascular así entendida constituye la **unidad funcional de la BHE** [13, 16, 151, 154, 155].

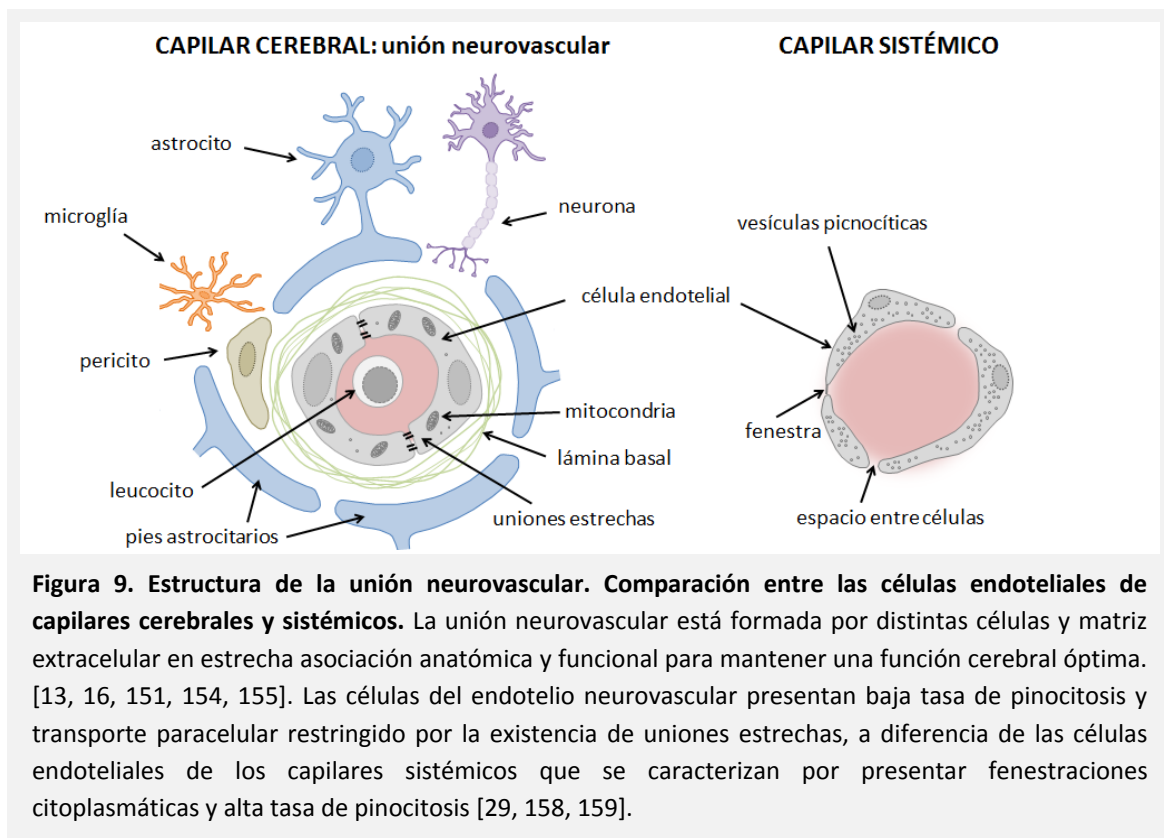


Figura 9. Estructura de la unión neurovascular. Comparación entre las células endoteliales de capilares cerebrales y sistémicos. La unión neurovascular está formada por distintas células y matriz extracelular en estrecha asociación anatómica y funcional para mantener una función cerebral óptima. [13, 16, 151, 154, 155]. Las células del endotelio neurovascular presentan baja tasa de pinocitosis y transporte paracelular restringido por la existencia de uniones estrechas, a diferencia de las células endoteliales de los capilares sistémicos que se caracterizan por presentar fenestraciones citoplasmáticas y alta tasa de pinocitosis [29, 158, 159].

La asociación entre el endotelio y las demás células de la unión neurovascular es **imprescindible** para la formación de la BHE. Tras la angiogénesis, pericitos y astrocitos revisten los vasos en formación e inducen en el endotelio las particularidades que caracterizan la barrera selectiva. Además secretan los elementos que forman la matriz extracelular especializada que envuelve al vaso y que también está implicada en la regulación de la permeabilidad de la BHE [16, 160]. Los astrocitos participan en la regulación de algunos de los sistemas de transporte especializados que presenta el endotelio. [160]. En definitiva, las interacciones recíprocas entre todos los componentes que constituyen la unidad neurovascular, tanto estructurales como funcionales, son imprescindibles para una adecuada funcionalidad de la BHE y del SNC [18].

3.1. Células endoteliales

Las células endoteliales del sistema nervioso presentan características particulares que las diferencian de las que constituyen los vasos sanguíneos en otros tejidos (figura 9), como la presencia **uniones estrechas y adherentes** que suponen **contactos íntimos** que sellan los espacios entre células adyacentes [12, 13, 159]. Aunque la alteración de las uniones adherentes puede afectar a la permeabilidad de la BHE, su función es la de dar estructura al vaso mediante la adhesión de las células con la matriz extracelular [29, 154]. De modo que, son principalmente las **uniones estrechas** las responsables de actuar como barrera al conferir una baja permeabilidad paracelular para las sustancias polares y alta resistencia eléctrica a los vasos, además de restringir el transporte solamente a algunas vías de paso específicas (figura 8) [151]. Además, al localizarse específicamente en la zona apical del endotelio impiden la difusión de lípidos y proteínas de membrana, participando de este modo en la distribución diferencial de proteínas transportadoras entre la zona apical y basolateral, lo que da polaridad al endotelio cerebral [13, 29, 154, 161]

Respecto a su estructura (figura 10), las uniones estrechas están formadas por un intrincado complejo de proteínas integrales y adaptadoras citosólicas. Las **proteínas integrales** interactúan formando homo o heterodímeros con las de otra célula o de otro segmento de membrana para formar los contactos íntimos. Pueden ser de varias clases: moléculas de adhesión (**JAM**, *Junctional Adhesion Molecules*), **claudinas** y **occludina**. Existen varios miembros de la familia de las claudinas y la presencia de uno u otro tipo determina la permeabilidad de la unión. En el endotelio neurovascular la más expresada e involucrada en las propiedades de barrera es la **claudina-5**. La presencia de claudina es **imprescindible** para la formación de las uniones estrechas, mientras que la de occludina no lo es para la formación, aunque sí es importante en la regulación de las uniones [13, 161]. Las proteínas JAMs tampoco son esenciales para la formación de uniones estrechas, pero participan en el establecimiento de la polaridad celular [29, 161].

Las **proteínas adaptadoras citosólicas** son esenciales para la formación de un complejo multimolecular al anclar a las proteínas integrales con la actina del citoesqueleto endotelial. Además, interactúan con proteínas mensajeras como quinasas, proteínas G heterotriméricas y pequeñas GTPasas, para mediar señalización celular bidireccional. La principal proteína de este tipo que se encuentra constituyendo las uniones estrechas del endotelio que forma la BHE es **zonula occludens-1 (ZO-1)** [12, 29, 151, 159].

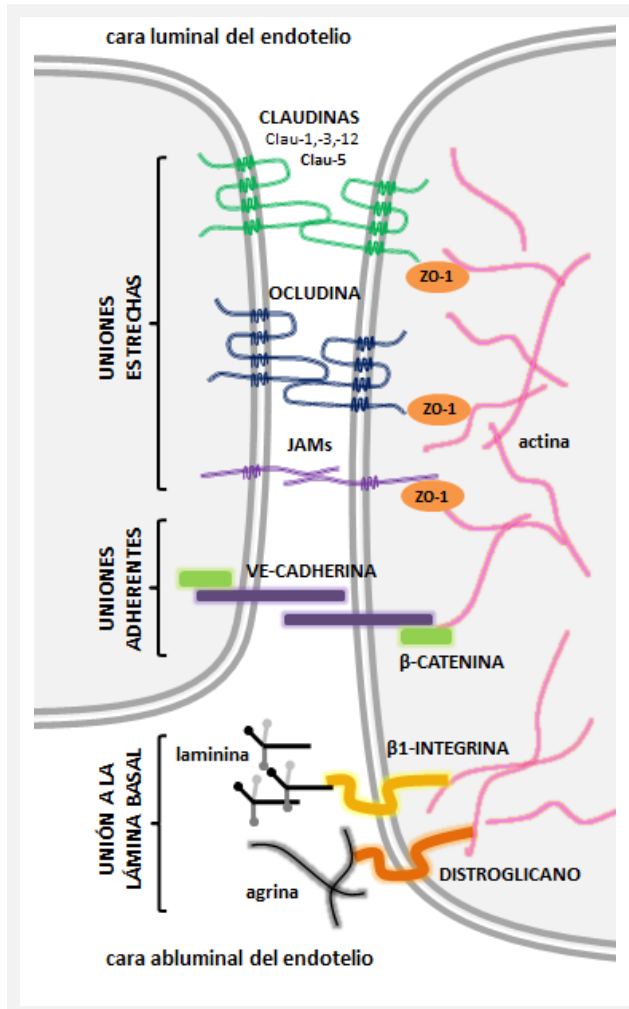


Figura 10. Estructura molecular de las distintas uniones presentes en el endotelio neurovascular. **Uniones estrechas:** formadas por ocludina, claudina o JAMs que interaccionan con la proteína adaptadora citosólica (ZO-1), la cual se ancla a filamentos de actina [13, 151, 159, 162, 163]. **Uniones adherentes:** formadas por la proteína integral homodimérica VE-cadherina que interacciona con la proteína adaptadora citosólica β -catenina. Ambas pueden participar en la regulación de la transcripción génica de claudina-5 [162]. **Uniones del endotelio con la lámina basal:** laminina y agrina pueden interaccionar con β 1-integrina y distroglicano. Estas interacciones regulan la polaridad celular y la transcripción génica de claudina y por tanto, la permeabilidad de los microvasos [162].

Puesto que las uniones estrechas son estructuras dinámicas pueden disociarse o reensamblarse modificando la permeabilidad paracelular. El grado de asociación de proteínas a ambos lados de la membrana de la célula endotelial, especialmente en la cara interna, es decisivo para restringir la permeabilidad y se correlaciona positiva y directamente con la resistencia transepitelial [154]. La baja expresión de claudina-5 se relaciona con la rotura de la BHE y el incremento de la permeabilidad [13, 29, 161]. Sin embargo, ante una pérdida de ocludina el resto de proteínas de las uniones estrechas pueden suplir dicha carencia y mantener la correcta función de la BHE [29]. Además, las uniones estrechas suponen una plataforma de señalización bidireccional [13, 151, 159, 162, 163], de forma que, desde el interior celular la señalización permite el auto-mantenimiento de las uniones, regulando así la permeabilidad; mientras que las señales extracelulares activan vías que producen la disociación de las uniones y modulan la expresión génica de sus componentes [156].

La permeabilidad de la BHE puede estar regulada a nivel de las proteínas de las uniones estrechas por señalización mediada por calcio, degradación proteolítica, fosforilación mediante

cascadas de kinasas, modulación por proteínas G monoméricas e internalización mediante caveolas de las proteínas que las constituyen [13, 29, 159, 161]. Diversos factores como el estrés oxidativo (RL, NO), agentes vasogénicos (VEGF), mediadores inflamatorios (TNF- α) y lipídicos (prostaglandina E2) y agentes infectivos (VIH) desencadenan mecanismos de señalización que terminan por incidir sobre las proteínas de las uniones estrechas [29, 157], induciendo su disociación e incrementando la permeabilidad de la BHE.

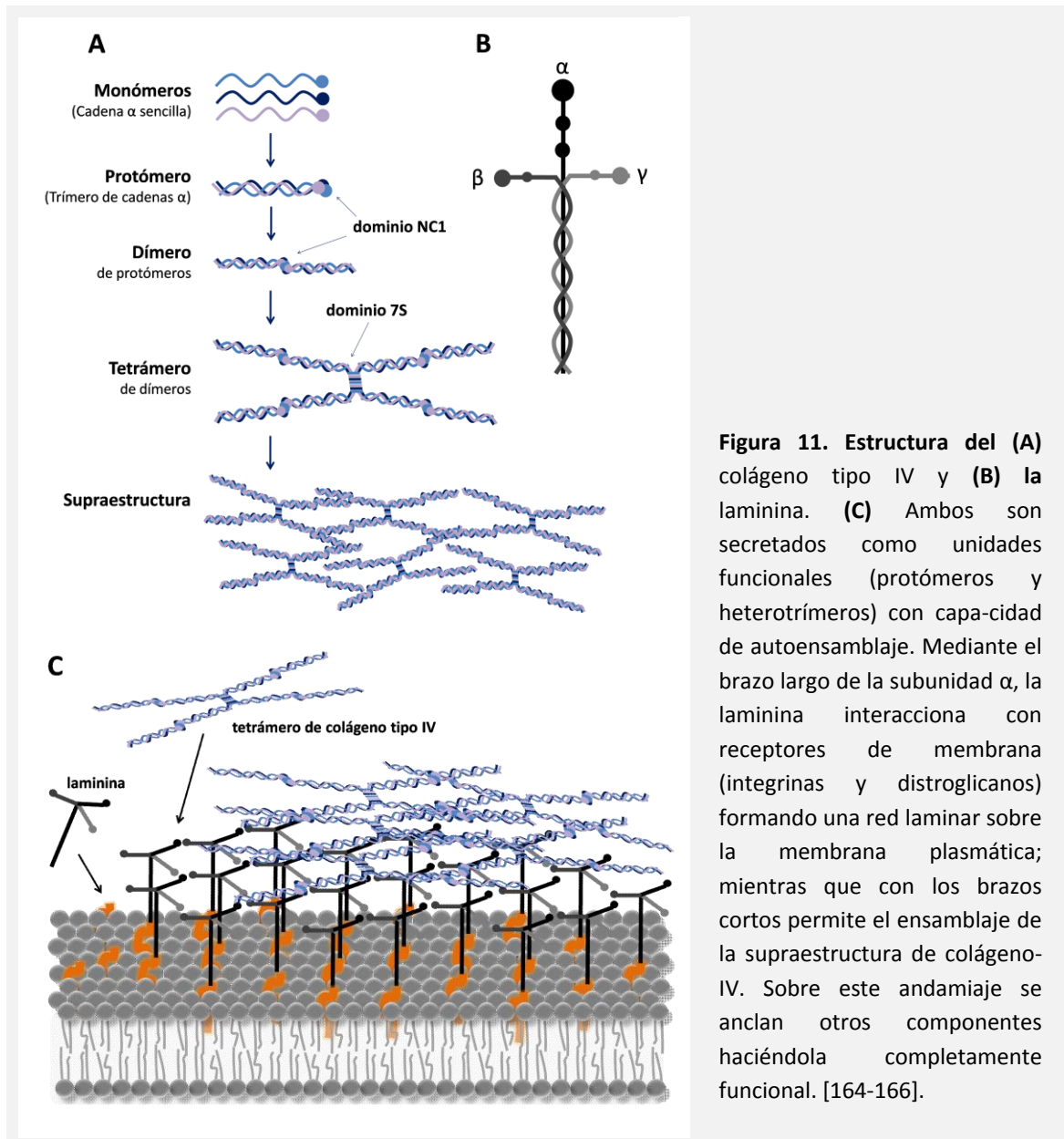
El citoesqueleto endotelial también juega un papel importante en el establecimiento de la integridad de las uniones y en la adherencia con la matriz extracelular. Las alteraciones en la actina pueden modular la permeabilidad de la barrera al comprometer la eficiencia de las uniones estrechas [29, 153]. De acuerdo con las necesidades funcionales o dependiendo de estímulos como mediadores inflamatorios, pueden ocurrir cambios dependientes de calcio y la fosforilación de proteínas que desencadenan la contracción del citoesqueleto ocasionando la retracción de la célula endotelial y el aumento de la permeabilidad de la BHE [29, 160, 162].

3.2. Lámina basal

Lámina basal es el nombre que recibe la **matriz extracelular especializada** íntimamente asociada a los epitelios. Dentro de la unión neurovascular, la lámina basal constituye el único **componente no celular** de la BHE [16]. Es secretada por células endoteliales, astrocitos y pericitos a los que proporciona soporte físico. De este modo, se puede hablar de una lámina basal endotelial que recubre a células endoteliales y pericitos [13] y otra asociada a pies astrocitarios [164]. Además de función estructural, la lámina basal interviene en la regulación del comportamiento de las células que la secretan y contribuye a la baja permeabilidad de la BHE al impedir el movimiento de grandes moléculas cargadas y la migración de leucocitos y células tumorales [164, 165].

Se compone principalmente de las proteínas estructurales **laminina** y **colágeno tipo IV** (figura 11) que se asocian generando una red en forma de lámina que envuelve el vaso, a la que se anclan otros componentes: nidogenos, fibronectina y proteoglicanos heparán sulfato (perlecan y agrina) [12, 29, 166]. Existen distintas isoformas de colágeno IV y de laminina que pueden constituir la lámina basal. El colágeno IV está formado por 3 cadenas: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y una tercera variable $\alpha 3$, 4 ó 5 [167]. La laminina es una estructura heterotrimérica y presenta las cadenas $\alpha 1$ -5, $\beta 1$ y $\gamma 1$. El endotelio vascular expresa principalmente lamininas con cadenas $\alpha 4$ y $\alpha 5$ [164], mientras que la lámina basal generada a partir de los pies astrocitarios se compone de

lamininas formadas por cadenas α 1 y α 2 [164]. Si bien la presencia de una u otra isoforma no afecta a la estructura, la existencia de distintos patrones de expresión espacial y temporal sí tiene relevancia a nivel funcional. Así por ejemplo, la isoforma α 5 de la laminina endotelial inhibe la infiltración leucocitaria [161], mientras que la presencia de α 4 la favorece, regulándose de este modo, a través de la lámina basal, la trans migración celular y el mantenimiento de los privilegios inmunes del SNC [164, 168].



Además de su carácter estructural, la laminina participa en la señalización celular al interactuar con receptores de membrana (figuras 10 y 11) [164-166] y activar vías de señalización intracelular que actúan sobre fosfatasa, kinasas como las MAPK (*Mitogen-*

Activated Protein Kinases), y sobre componentes del citoesqueleto regulando la adhesión celular, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia [169]. Alteraciones de la lámina basal tienen como consecuencia la alteración de las uniones estrechas y la integridad de la BHE [29].

La matriz extracelular sufre una remodelación constante en condiciones fisiológicas. La homeostasis tisular depende de un estricto equilibrio entre la síntesis y degradación de las macromoléculas que constituyen la matriz [170]. Un exceso de degradación de proteínas de la matriz se relaciona con procesos inflamatorios, invasión tumoral y muchas otras patologías que cursan con alteración de la BHE [14, 26-29, 168].

3.3. Astrocitos

El 90% de la superficie abluminal de la microvasculatura cerebral está cubierta por procesos citoplasmáticos de los astrocitos denominados **pies astrocitarios** [158]. Dentro de la unión neurovascular, los pies astrocitarios envuelven al endotelio, a los pericitos y a la lámina basal [29]. También participan en las otras barreras hematoencefálicas localizadas a nivel de los endimocitos de los plexos coroideos y en la zona subpial formando la glía limitante (figura 8) [152].

Los astrocitos secretan componentes de la lámina basal y participan en la inducción y el mantenimiento de las uniones estrechas, de los sistemas enzimáticos especializados y de la localización polarizada de transportadores en las células endoteliales [29, 158, 171]. También pueden modular la permeabilidad de la BHE y producir su incremento controlado en condiciones fisiológicas gracias a la comunicación química recíproca con el endotelio mediante factores solubles [29, 160]. Además, cada astrocito individualmente sostiene la función de una población particular de neuronas de un territorio concreto y las comunica con los segmentos de la microvasculatura a los que se asocia formando la *unidad gliovascular* [151]. De este modo, mantienen el aporte energético a las neuronas y modulan los sistemas de transporte endotelial y el tono vascular con el fin de favorecer la adquisición de sustratos energéticos [35, 160]. De igual forma, regulan la homeostasis del agua, iones, aminoácidos y neurotransmisores controlando la función sináptica y la comunicación celular [151, 158, 172].

La homeostasia del agua es esencial para una función cerebral normal, ya que pequeños cambios en el espacio extracelular pueden afectar gravemente a la concentración iónica y como consecuencia, alterar la excitabilidad neuronal. Por ello, el control del transporte de agua es necesario para la recuperación del equilibrio iónico tras la actividad neuronal [173]. El

mantenimiento de la homeostasia por parte de los astrocitos se debe a sus particulares características morfológicas, a su polaridad y a los distintos receptores y canales específicos que expresan [154]. A lo largo de toda la membrana, pero principalmente concentrados en los pies astrocitarios, se expresan canales de agua **acuaporina-4 (AQP4)** (figura 12). Estos canales actúan en función de los gradientes de iones y median el **flujo bidireccional de agua** entre el cerebro y la sangre [35, 37, 173-175].

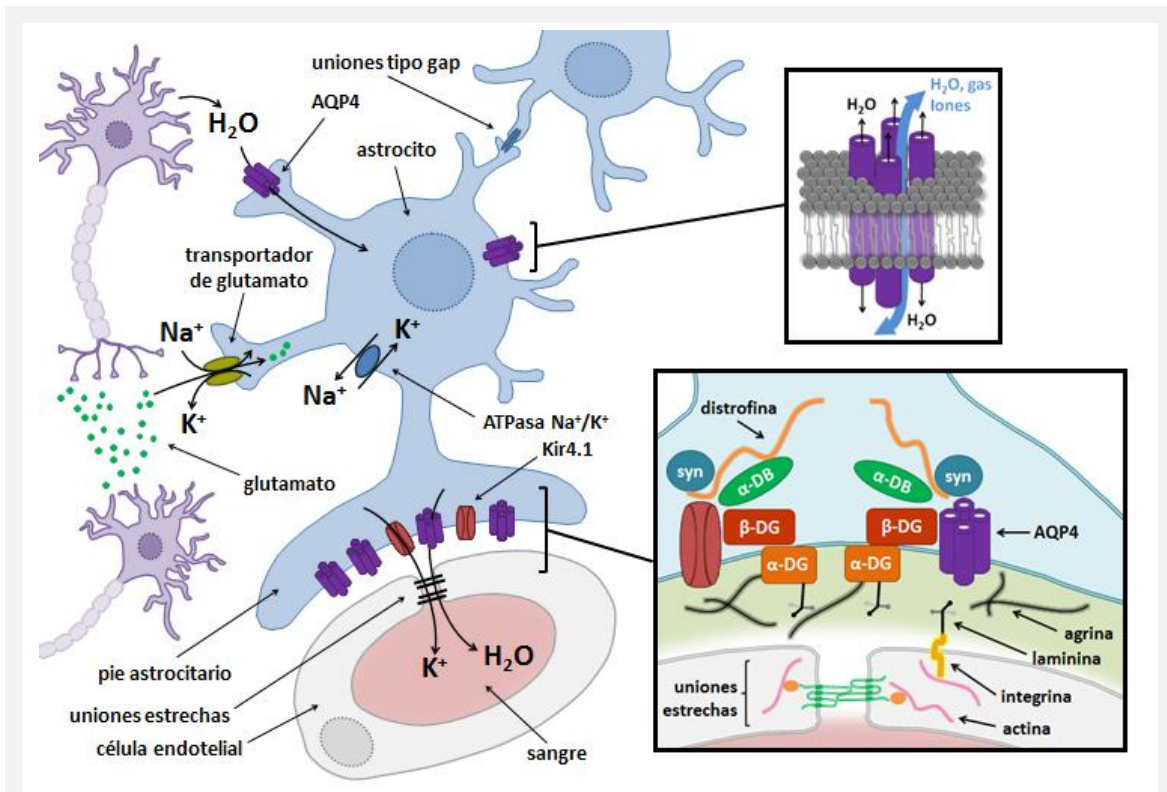


Figura 12. Aclaramiento de glutamato y mantenimiento de la homeostasis de agua e iones sodio y potasio por parte de los astrocitos durante las sinapsis. En el esquema se detalla la estructura de la AQP4 (tetrámero formado por 4 canales permeables al agua, cuyo poro central permite el paso de iones y gases) y de los OAPs (AQP4 y Kir4.1 en asociación a un complejo proteico formado por α -distroglicano (α -DG), β -distroglicano (β -DG), β -distrobrevina (β -DB) y sinucleína (syn). α -DG se une a laminina y agrina de la lámina basal, mientras que β -DB y syn anclan distrofina, un componente del citoesqueleto del astrocito [35, 37, 38, 158, 173, 176].

La localización polarizada de la AQP4 en los pies astrocitarios se debe a que forma agregados supramoleculares denominados **conjuntos ortogonales de partículas (OAPs, Orthogonal Arrays of Proteins)** por su aspecto al microscopio electrónico. Estas estructuras, se localizan en paralelo a las uniones estrechas endoteliales gracias a su interacción con distroglicano y sintrofina que a su vez ancla a los componentes de la lámina basal (figura 12) [158, 173]. Además, AQP4 colocaliza en los pies astrocitarios con el transportador de potasio

Kir4.1. En base a esto, y puesto que el flujo de agua a través de la AQP4 es bidireccional y dependiente del gradiente osmótico [173], la función principal de la AQP4 es la de regular la homeostasia del agua en relación al tamponamiento de potasio (figura 12) [158]. Por lo tanto, la organización de los OAPs permite el establecimiento de estructuras especializadas a través de las cuales se produce el aclaramiento hacia la sangre de agua y potasio captados por el astrocito.

En condiciones fisiológicas, durante la actividad neuronal se liberan neurotransmisores y potasio, mientras que la oxidación de la glucosa genera agua metabólica. Para mantener la homeostasia iónica y el volumen de las sinapsis centrales, el agua y el potasio extracelular generados son captados por los astrocitos y trasladados a otras zonas gracias a la red sincitial que forma la astroglia, para ser eliminados hacia la sangre y el LCR a través de los pies astrocitarios (figura 12) [35, 37, 158, 173]. El desensamblaje de los OAPs, como el que tiene lugar en ratones *knock-out* para α -sintrofina, hace que se pierda la expresión de AQP4 de los pies astrocitarios y como consecuencia, que ocurra una alteración del transporte de agua y un aclaramiento deficiente de potasio [173].

3.4. Pericitos

Los pericitos, son **células con capacidad contráctil** que se localizan en la superficie abluminal del endotelio de capilares, arteriolas y vénulas que carecen de capa muscular [16, 29]. **Rodean parcialmente el endotelio** cubriendo aproximadamente el 22-32% de los capilares [29]. Estas células murales regulan el flujo sanguíneo cerebral, controlando el diámetro del capilar y dando estabilidad al vaso gracias a las proteínas contráctiles que presentan [16, 29, 177]. También pueden actuar como células inmunitarias con capacidad fagocítica [177]. Además regulan la proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de células endoteliales durante la angiogénesis y la permeabilidad vascular, gracias a la comunicación recíproca entre células a través de uniones de tipo *gap* y de factores solubles [157, 158, 177]. Dentro de la BHE, participan en la **síntesis de la lámina basal** [29, 158] e **inducen la distribución localizada de los pies astrocitarios alrededor de los vasos sanguíneos** [178, 179]. Por ello, son esenciales en la formación, maduración y mantenimiento de la BHE [16, 29, 158, 177].

3.5. Neuronas

La relación entre neuronas y microvasculatura resulta imprescindible, ya que la circulación sanguínea cerebral es directamente responsable del aporte energético necesario

para la correcta función neuronal. De este modo, las neuronas regulan el flujo sanguíneo y la permeabilidad de la BHE en función de los requerimientos metabólicos del tejido nervioso [13, 29, 157]. Las neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas, colinérgicas y GABAérgicas pueden inervar el endotelio directamente [13, 157], aunque la señalización también puede llegar través de los astrocitos que responden ante las sinapsis centrales [151]. El resultado de esta inervación es la **modulación de la permeabilidad de la BHE** incrementando la eficiencia del endotelio en el transporte de nutrientes desde la sangre [151]. Además, la pérdida de la inervación neuronal sobre el endotelio de la unión neurovascular se relaciona con un incremento en la permeabilidad de la BHE [13]. Lesiones en el *locus coeruleus* que disminuyen la señalización noradrenérgica, potencian la vulnerabilidad de la BHE a la hipertensión [157]. De igual forma, en patologías neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la pérdida de inervación serotoninérgica cortical se asocia con alteración de la función cerebrovascular [13, 157].

3.6. Microglía perivascular y leucocitos circulantes

En contacto con los vasos sanguíneos del SNC se encuentra la microglía perivascular controlando la respuesta inmune en el cerebro [158]. La microglía inspecciona constantemente el microambiente local pudiendo cambiar de fenotipo y función en respuesta a la alteración de la homeostasia del SNC [29]. Se piensa que la microglía podría interactuar con las células endoteliales y contribuir a las propiedades de BHE, aunque los mecanismos por los que esto ocurriría son desconocidos [17, 29].

Los leucocitos circulantes suponen una fuente de células inmunitarias disponibles ante procesos neuroinflamatorios [158] y participan, junto a la microglía perivascular, en la respuesta inmune dentro del SNC.

4. Regulación y alteración patológica de la BHE

Los cambios en la permeabilidad de la BHE se producen de forma fisiológica como respuesta a variaciones en el pH, en la presión sanguínea y en el suministro de oxígeno y nutrientes [36]. El incremento de la permeabilidad controlado y reversible es necesario para satisfacer los requerimientos del tejido nervioso. Esto es posible gracias a una amplia comunicación recíproca entre todas las células de la unión neurovascular, así como con células inmunes periféricas o células de otros tejidos mediante la señalización por factores solubles (Figura 13) [18]. De este modo, el incremento en la permeabilidad de la BHE, tanto en

condiciones fisiológicas como patológicas, es consecuencia del efecto conjunto de varios factores que actúan a distintos niveles y no necesariamente al mismo tiempo [153]. Aunque estas conexiones están claras conceptualmente, los mecanismos que tienen lugar aún no están bien esclarecidos [18].

Además de los factores solubles, la lámina basal aporta señalización constante mediante la interacción de laminina y agrina con receptores de membrana (integrinas y distroglicanos). La alteración de esta interacción modifica las cascadas de señalización y altera la estructura de las uniones estrechas, del citoesqueleto endotelial [29] y de los OAPs de los pies astrocitarios, incrementando la permeabilidad de la barrera [154].

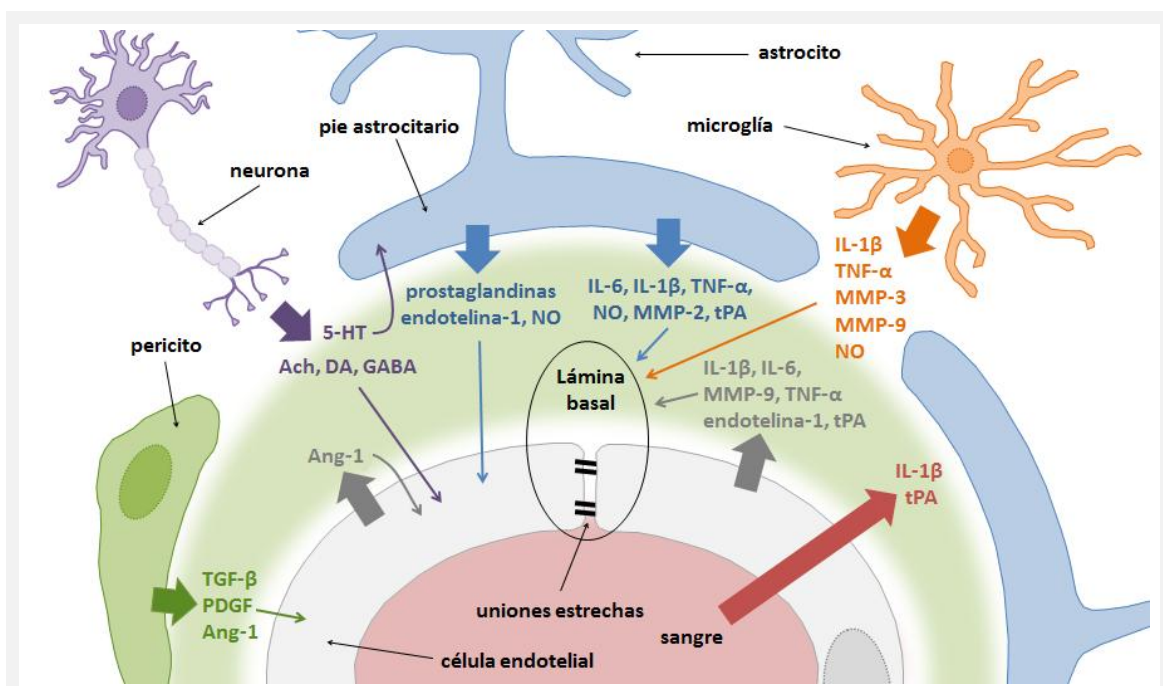


Figura 13. Factores solubles implicados en el control de la permeabilidad de la BHE: Factores como las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α), metaloproteinasas de matriz (MMP-2, -3 y -9), activador tisular del plasminógeno (tPA) y óxido nítrico, pueden ser secretados por varios tipos celulares y actuar incrementando la permeabilidad de la BHE [18, 151, 153, 156, 160]. Las células endoteliales secretan angiopoyetina-1 (Ang-1) constitutivamente para el automantenimiento de la baja permeabilidad endotelial [153, 160, 177]. La inervación neuronal afecta a la función de la barrera. La inervación serotoninérgica directa sobre el endotelio tiene efecto vasoconstrictor, sin embargo, a través de los astrocitos induce la secreción de endotelina, NO y prostaglandinas que median la vasodilatación [156]. Algunos mediadores activos pueden proceder de la sangre y participar en la alteración de la BHE e incluso iniciarla [18].

Por lo general, cualquier alteración en la expresión y/o funcionalidad de los componentes de las uniones estrechas y la lámina basal, o de las células que constituyen la unión neurovascular, puede comprometer la integridad de la barrera incrementando la

permeabilidad [12, 14]. En algunos casos, el incremento de la permeabilidad de la BHE es consecuencia de una patología previa, como ocurre en la isquemia o el daño traumático cerebral, mientras que otras veces, la apertura de la barrera es el acontecimiento que ocurre con anterioridad al desarrollo de la enfermedad, como en la esclerosis múltiple [13].

Del mismo modo, tanto los mecanismos por los que ocurre la rotura de la BHE, como las consecuencias de su alteración, son muy variados y en ocasiones ni siquiera está claro cuáles de ellos son causa y cuáles consecuencia de la rotura [16, 177]. Por ejemplo, el desequilibrio de iones, neurotransmisores y metabolitos en el líquido intersticial que altera la actividad neuronal, es una de las consecuencias del aumento en la permeabilidad; pero también puede ser el causante de la disrupción osmótica de la BHE que conduce a la generación de ataques epilépticos típicos de la epilepsia, la isquemia, infecciones del SNC y desórdenes neurodegenerativos [16]. Lo mismo sucede cuando hablamos de estrés oxidativo o de neuroinflamación. En cualquier caso, el incremento de la permeabilidad de la BHE se asocia a una serie de alteraciones que por lo general, terminan por afectar la actividad neuronal [16]. En la tabla 2 se esquematizan algunos de los principales factores que participan en la alteración de la permeabilidad de la BHE, así como sus consecuencias, en procesos patológicos.

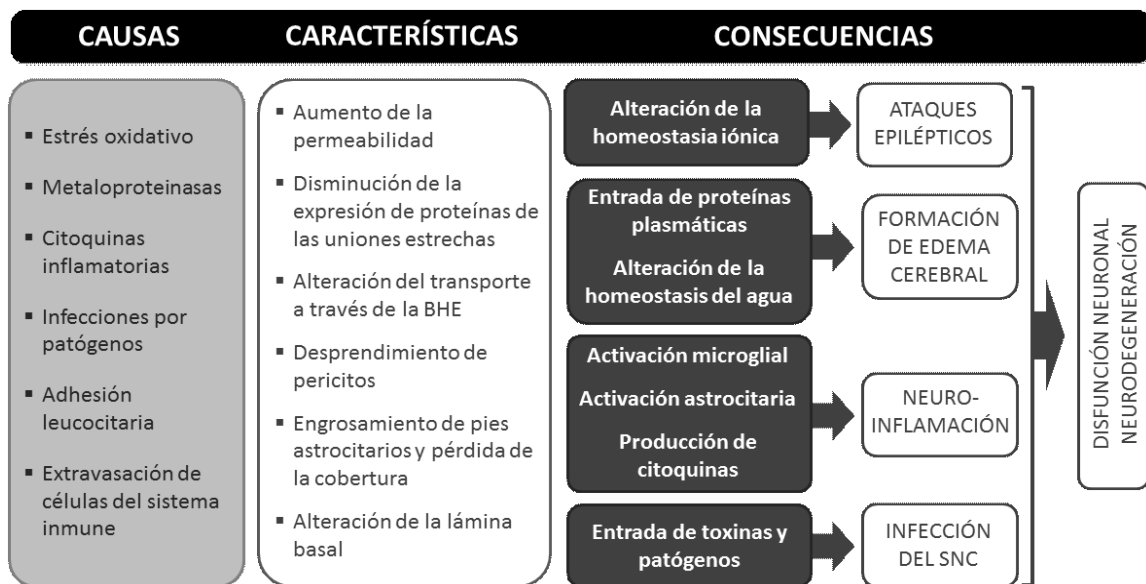


Tabla 2: Causas, características y consecuencias de alteración de la BHE en procesos patológicos [16].

4.1. Modulación de la integridad de la BHE por proteólisis

La degradación de proteínas que constituyen la lámina basal o las uniones estrechas conduce a una alteración de la integridad de la BHE y por tanto, a un incremento en la

permeabilidad. Existen varios tipos de enzimas proteolíticas capaces de mediar esta función, siendo las principales las **metaloproteinasas de matriz (MMPs)** y las **serín-proteasas** como el **activador tisular del plasminógeno (tPA)**. La **sobreactivación** de estas enzimas es frecuente en patologías que cursan con **aumento de la permeabilidad de la barrera** [14, 26-29].

4.1.1. Metaloproteinasas de matriz

Las MMPs son proteasas de **acción extracelular** que están implicadas en todos aquellos procesos fisiológicos que requieren la modificación de la matriz extracelular y remodelación tisular tales como angiogénesis, migración celular, regeneración axonal, remielinización y plasticidad sináptica [14, 26-28, 180]. Asimismo, están involucradas en numerosos procesos patológicos como la inflamación, la isquemia, la aterosclerosis y la metástasis, entre otros [27].

Pueden clasificarse en función de los sustratos que son capaces de degradar, de sus dominios peptídicos y de la similitud de su secuencia (tabla 3) en los siguientes grupos: colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas y MMPs de membrana o MT-MMPs (*Membrane Type MMPs*) [27]. Las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), junto con la estromelisinina-1 (MMP-3), parecen ser las metaloproteinasas que más se han estudiado en relación a la alteración de la BHE en condiciones patológicas [15, 28, 181].

CLASIFICACIÓN	NOMBRE	SUSTRATOS QUE DEGRADA
Colagenasas	MMP-1 Colagenasa 1	<i>Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, gelatina</i>
	MMP-8 Colagenasa 2	<i>Colágeno I, II, III, VII, VIII, X, agrecan, gelatina</i>
	MMP-13 Colagenasa 3	<i>Colágeno I, II, III, IV, IX, X, XIV, gelatina</i>
Gelatinasas	MMP-2 Gelatinasa A	<i>Gelatina, colágeno I, II, III, IV, VII, X, laminina, fibronectina</i>
	MMP-9 Gelatinasa B	<i>Gelatina, colágeno IV, V, laminina, agrina, fibronectina</i>
Estromelisininas	MMP-3 Estromelisinina 1	<i>Fibronectina, colágeno II, IV, IX, X, gelatina, laminina, agrina</i>
	MMP-10 Estromelisinina 2	<i>Colágeno IV, laminina, fibronectina, elastina</i>
	MMP-13 Estromelisinina 3	<i>Colágeno IV, laminina, fibronectina, agrecan</i>
Matrilisininas	MMP-7 Matrilisinina 1	<i>Fibronectina, laminina, colágeno IV, gelatina</i>
	MMP-26 Matrilisinina 2	<i>Fibrinógeno, fibronectina, gelatina</i>
MMPs de membrana (MTP-MMP)	MMP-14 MTP1-MMP	<i>Gelatina, fibronectina, laminina</i>
	MMP-15 MTP2-MMP	<i>Gelatina, fibronectina, laminina</i>
	MMP-16 MTP3-MMP	<i>Gelatina, fibronectina, laminina</i>
	MMP-17 MTP4-MMP	<i>Fibrinógeno, fibrina</i>
	MMP-24 MTP5-MMP	<i>Gelatina, fibronectina, laminina</i>
	MMP-25 MTP6-MMP	<i>Gelatina</i>
Otras	MMP-12 Metaloelastasa	<i>Elastina, fibronectina, colágeno IV</i>
	MMP-19	<i>Agrecan, elastina, fibrilina, colágeno IV, gelatina</i>
	MMP-20 Enamelisina	<i>Agrecan</i>
	MMP-21 XMMP	<i>Agrecan</i>
	MMP-23	<i>Gelatina, caseína, fibronectina</i>
	MMP-27 CMMP	<i>Desconocido</i>
	MMP-28 Epilisina	<i>Desconocido</i>

Tabla 3. Clasificación de las MMPs. *Tabla modificada de Snoek-van Beurden & Von den Hoff, 2005.*

Las MMPs se sintetizan como **zimógeno**: forma proactiva bloqueada por un dominio propéptido que mantiene bloqueado el centro activo (figura 14). Para su activación es necesaria la hidrólisis del enlace formado entre la cisteína del propéptido y el átomo de zinc del centro activo. La proteólisis del propéptido genera una MMP activa de menor peso molecular y puede llevarse a cabo por múltiples estímulos, incluso por otras MMPs activas.

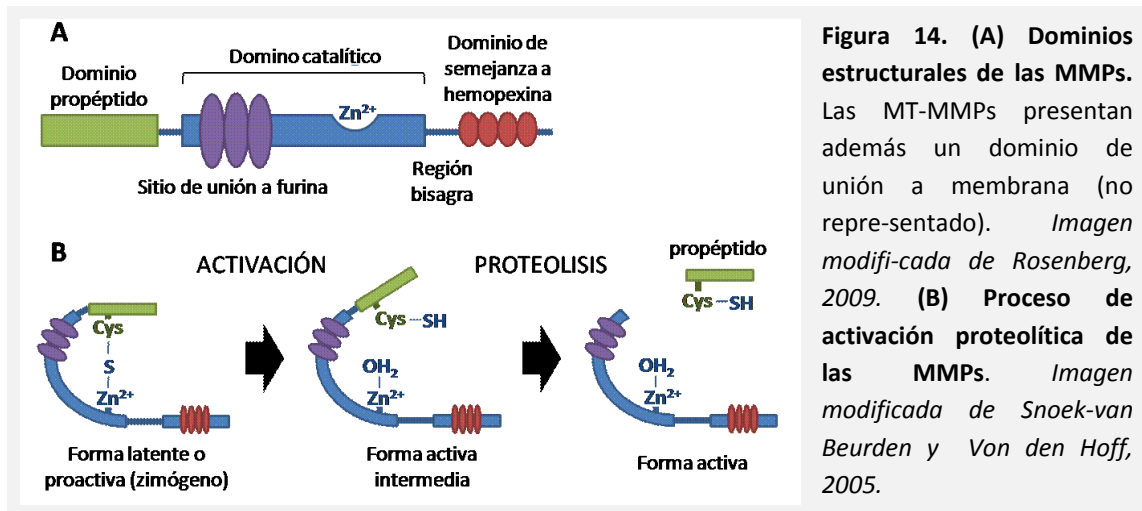


Figura 14. (A) Dominios estructurales de las MMPs.

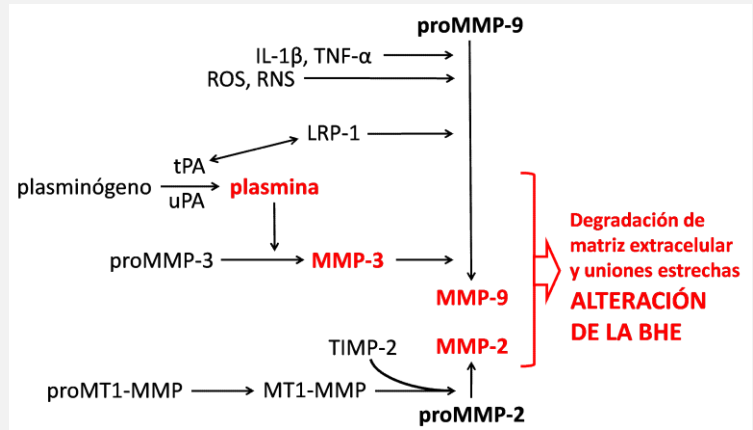
Las MT-MMPs presentan además un dominio de unión a membrana (no representado). *Imagen modificada de Rosenberg, 2009.* **(B) Proceso de activación proteolítica de las MMPs.** *Imagen modificada de Snoek-van Beurden y Von den Hoff, 2005.*

Aparte de la regulación a través de la activación proteolítica del zimógeno, la activación de las MMPs está controlada por sus niveles de secreción y por la actividad de inhibidores tisulares endógenos de metaloproteinasas (TIMPs) que forman complejos con las formas proactivas inactivándolas [27, 182, 183]. Además, la expresión de las MMPs está regulada a nivel transcripcional. Los genes para MMP-2 contienen en su promotor sitios de unión de la proteína activadora 2 (AP2) que determinan la **expresión constitutiva** del gen. MMP-2 se expresa constitutivamente en astrocitos y su acción proteolítica queda restringida a la proximidad celular, debido a que su activación requiere la unión a MT1-MMP (MMP14) y a TIMP-2 (figura 15) formando de este modo un complejo trimolecular asociado a la membrana [14, 26-28]. Por lo tanto, la aparente función de MMP-2 sería la remodelación y mantenimiento de la matriz extracelular en condiciones normales [21].

Sin embargo, MMP-9 y MMP-3 son **inducibles**, ya que sus genes presentan sitios de unión a AP1 y al factor nuclear-κB (NF-κB). Por ello, son regulables por **ROS, citoquinas proinflamatorias** (TNF-α, IL-1β) y otros estímulos que activan cascadas de **MAPKs** (p38, ERK1/2 y JNK) [14, 26-28, 184, 185], además de por **plasmina y otras MMPs** (figura 15). Tanto MMP-9 como MMP-3 **son secretadas y activadas en el espacio extracelular**, por lo que tienen libertad de movimiento y **propagan su acción más allá de la zona de secreción** [14, 26-28]. MMP-9 se expresa principalmente en células endoteliales [21] y leucocitos infiltrados [186], aunque

también pueden expresarla astrocitos y neuronas; mientras que MMP-3 es liberada por la microglía y los pericitos. MMP-3 también puede ser liberada en su forma activa por neuronas apoptóticas sometidas a estrés celular, posiblemente para facilitar su fagocitosis [21].

Figura 15. Mecanismos de activación de las principales MMPs implicadas en la alteración de la BHE. En rojo están señaladas las proteasas implicadas de forma directa en la degradación de proteínas de la lámina basal y las uniones estrechas, incrementando la permeabilidad de la BHE [31, 33, 34].



En muchas patologías que cursan con alteración de la BHE, se ha puesto de manifiesto que el incremento en la expresión o actividad de MMPs por estrés oxidativo o procesos inflamatorios es el responsable de la degradación de las proteínas de la lámina basal y de las uniones estrechas que conducen al incremento en la permeabilidad y alteración de la integridad de la barrera [14, 31, 187, 188].

4.1.2. Activador tisular del plasminógeno

El factor activador tisular del plasminógeno (tPA) es una **serín-proteasa** de acción extracelular. Se encuentra principalmente en la sangre donde actúa como enzima trombolítica degradando su sustrato principal, el **zímogeno plasminógeno**, dando lugar **plasmina**, la cual a su vez degrada la red de fibrina que constituye el trombo [33, 186, 189]. No obstante, el tPA también puede expresarse dentro del SNC. Aunque las células endoteliales son la principal fuente de tPA, **prácticamente todas las células de la unión neurovascular, incluyendo neuronas y microglía, lo expresan y responden a él** [31, 186]. Por otra parte, el tPA también puede proceder de la sangre e introducirse en el SNC mediante transcitosis [186] mediada por el receptor de lipoproteínas de baja densidad tipo 1 (LRP-1) aun estando la BHE intacta [31]. Tanto el tPA de origen exógeno, como el endógeno pueden afectar la funcionalidad del cerebro y resultar neurotóxico [31].

Dentro del SNC el tPA presenta funciones distintas a la trombolisis, generalmente relacionadas con su actividad proteolítica. La **plasmina** resultante de la acción de tPA, **degrada**

componentes de la matriz extracelular y puede hacerlo **por sí misma** o bien de forma indirecta **a través de la activación proteolítica de MMPs** (figura 15) [31, 33, 186]. En cualquier caso, la cascada tPA-plasminógeno/plasmina, al degradar proteínas extracelulares, participa en procesos neurotróficos de plasticidad sináptica, aprendizaje y memoria [33, 186], en fenómenos de migración celular, invasión celular y metástasis [33] y en el incremento de la permeabilidad de la BHE o alteración de su integridad en condiciones patológicas [31, 190].

Tanto el tPA como el plasminógeno parecen unirse a receptores de membrana de forma que la generación proteolítica de plasmina ocurre de manera localizada y regulada sobre la superficie celular [186] donde es inaccesible a inhibidores fisiológicos [31] que sin embargo, inactivan rápidamente a la plasmina soluble [186]. Por otro lado, la regulación de la formación de plasmina también depende de la expresión y actividad de tPA, así como de su inhibidor endógeno principal PAI-1 [186].

Independientemente de su capacidad proteolítica, tPA puede **modificar la permeabilidad de la BHE mediante señalización a través de LRP-1**, del cual es ligando endógeno [36]. Este receptor se localiza en todas las células de la unión neurovascular y su interacción con tPA activa la vía NF- κ B que conduce al incremento en células endoteliales de la expresión de MMP-3 y MMP-9, las cuales actúan degradando los componentes de la lámina basal y las uniones estrechas [15, 31, 33].

4.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es uno de los mediadores clave en la alteración de la BHE que tiene lugar en procesos patológicos [14-16, 187]. Los radicales libres, incluyendo ROS y RNS disparan numerosas cascadas moleculares que terminan alterando la permeabilidad o integridad de la unión neurovascular [15]. En primer lugar, producen daño oxidativo de componentes celulares (proteínas, lípidos y ADN), de forma que la peroxidación de los lípidos de la membrana endotelial incrementa la permeabilidad vascular [191]. Además, median la reorganización del citoesqueleto de las células de la unión neurovascular y regulan al alza la expresión de mediadores inflamatorios [16].

Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno activan MMPs, disminuyen los niveles de inhibidores TIMPs [16] y median la fosforilación de componentes de las uniones estrechas favoreciendo su disociación [29, 157], todo ello a través de un mecanismo que implica la activación de proteínas tirosina kinasa [16]. Posiblemente, **la activación de MMPs es el principal**

mecanismo por el cual los radicales libres alteran la BHE e incrementan la permeabilidad. De forma que el tratamiento con antioxidantes o inhibidores de la NOS atenúan la alteración de la BHE y mejoran la disfunción cerebral en procesos patológicos que cursan con estrés oxidativo, como la isquemia [15].

4.3. Temperatura

Las alteraciones en la temperatura afectan a la permeabilidad de la BHE: una temperatura corporal inferior a la fisiológica (hipotermia) induce una alteración leve de la permeabilidad de la BHE y una reducción del contenido de agua cerebral, mientras que su incremento (hipertermia) se asocia a alteraciones más graves de la barrera y desarrollo de edema [19, 20]. Existen evidencias que demuestran un incremento en la extravasación al parénquima cerebral de proteínas plasmáticas como la albúmina, en condiciones de hipertermia cerebral (38.5 - 39.5°C) [20]. Esta temperatura puede alcanzarse en situaciones no patológicas, como el ejercicio físico intenso en ambientes de alta temperatura [192] o en procesos de estrés agudo. Según estudios en rata, en estas situaciones se aprecia un incremento en la permeabilidad de la BHE en respuesta al aumento de la temperatura corporal y cerebral [193]. De igual modo, la hipertermia que tiene lugar durante los tratamientos antitumorales se relaciona con el incremento en la permeabilidad vascular [194]. En condiciones patológicas la alteración de la BHE relacionada con la hipertermia resulta más grave. De este modo, durante la patología por golpe de calor se altera la barrera, desarrollándose edema cerebral con alteración de las células del SNC [195]. En otras condiciones patológicas en las que ocurre la alteración de la BHE, como la hipoxia [196] o tras el consumo de estimulantes psicomotores [193, 197], este efecto se agrava en relación al aumento de la temperatura.

Es razonable que la alta temperatura cerebral afecte a los componentes de la unidad neurovascular teniendo en cuenta que induce alteraciones en el citoesqueleto, desnaturalización de proteínas, modifica la fluidez de la membrana plasmática y altera la funcionalidad de las proteínas transportadoras; además de alterar la función nerviosa [112], el flujo sanguíneo, el aporte de oxígeno y nutrientes y la respuesta inmune celular [194].

4.4. Inflamación

Numerosas patologías como la sepsis, infecciones por virus, encefalitis, meningitis, esclerosis múltiple, diabetes mellitus y dolor crónico se asocian con alteraciones en la BHE [18,

21, 157]. Tanto los ROS, como el lipopolisacárido, las citoquinas y las prostaglandinas promueven la inflamación [18] desencadenando la generación de mediadores secundarios que, independientemente de si fueron originados de forma periférica o como consecuencia de un proceso neuroinflamatorio [18], alteran la permeabilidad e integridad de la BHE [13, 18].

Durante la inflamación periférica, los mediadores circulantes encuentran su acceso al parénquima cerebral restringido por la BHE. En algunas situaciones, el incremento inicial de la permeabilidad no implica la alteración en la integridad de los componentes de la unión neurovascular, si no que se corresponde con el aumento en la expresión del transportador específico para el elemento inmunoactivo en cuestión o en la vía de transcitosis adsorptiva [18]. Cuando estas sustancias alcanzan el parénquima cerebral pueden actuar sobre las células del SNC (microglía, astrogía y células endoteliales) produciendo la liberación de más mediadores [18], ampliando y propagando de este modo la respuesta inflamatoria que altera la integridad de la BHE.

La neuroinflamación previa a la alteración de la BHE que tiene lugar en patologías del SNC, como la enfermedad de Alzheimer o el ictus isquémico, puede ser la responsable del incremento de la permeabilidad desde el interior del SNC [17] y formación de edema vasogénico [198]. La activación de la **microglía** [29, 199] y la **astrogía** [35, 37, 171, 172] es la consecuencia más característica de la respuesta neuroinflamatoria y ocurre como consecuencia de la activación del inflammasoma inducida por ROS, altos niveles de ATP extracelular y la liberación de proteínas DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*) con patrones moleculares asociadas a daño [22], indicadores todos ellos de daño tisular.

Uno de los principales mecanismos de activación glial es la señalización a través de receptores purinérgicos ionotrópicos P2X₇, capaces de responder a altas concentraciones de ATP extracelular liberado tras el daño neuronal [23-25, 200-202]. Como consecuencia de la activación, las células gliales sufren modificaciones morfológicas (engrosamiento de sus prolongaciones o hipertrofia) y funcionales (secreción de mediadores proinflamatorios) (figura 16). Con frecuencia, esta activación se correlaciona con el incremento en la expresión de marcadores constitutivos (OX-42 microglial y GFAP (*Glial Fibrillary Acid Protein*) astrocitario) y de receptores purinérgicos [23, 203-205] o de endocannabinoides [9, 199] entre otros, implicados en la modulación de la neuroinflamación. Las células gliales activadas secretan **quimioquinas y citoquinas**, como mediadores neuroinflamatorios primarios asociadas a la **producción de radicales libres y proteasas** (mediadores secundarios) [14, 22, 23, 27, 28, 35] que promueven la

degradación de componentes proteicos de la unión neurovascular incrementando la permeabilidad de la BHE [17, 21, 157].

Otro mecanismo de activación de la respuesta neuroinflamatoria implica la señalización a través de la anfoterina o HMGB-1 (*High-Movility group box 1*), una proteína que pertenece al grupo de proteínas DAMP. HMGB-1 se libera por las neuronas dañadas [206, 207] y por la microglía activa [207, 208] y tras su oxidación parcial en condiciones de estrés oxidativo promueve la activación del inflamasoma y la secreción de mediadores inflamatorios en relación a la alteración de la BHE [209, 210]. De este modo actúa como citoquina proinflamatoria y propaga la respuesta neuroinflamatoria [211, 212].

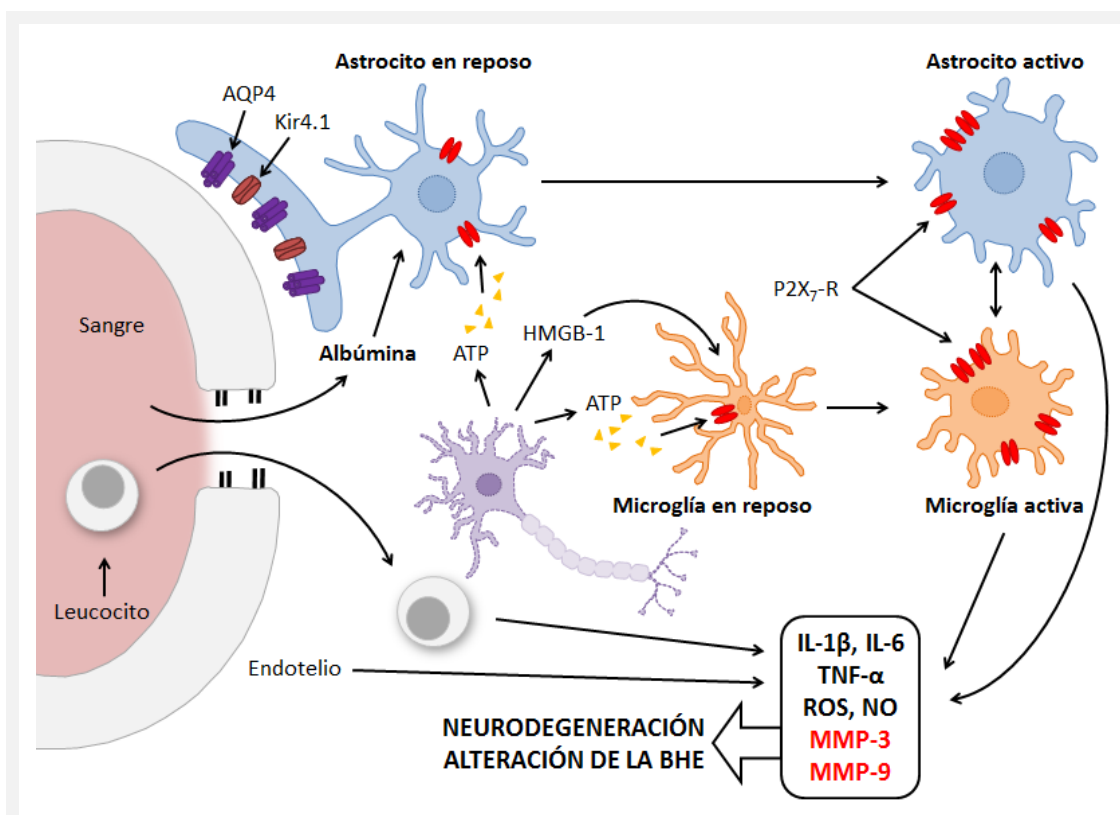


Figura 16: Desarrollo del proceso neuroinflamatorio en relación a la alteración de la BHE. Ante las señales de daño los astrocitos y la microglía sufren un proceso de activación gradual, produciéndose cambios funcionales y estructurales. Las células gliales activas secretan elementos proinflamatorios primarios (negro) cuya liberación conduce a la producción de mediadores secundarios (rojo) que median la alteración de la BHE. La constante exposición de los astrocitos y microglía a los factores desencadenantes del daño y a la secreción de estos mediadores inflamatorios induce la activación mutua entre astrocitos y microglía, a lo largo del proceso neuroinflamatorio, que finalmente dispara la muerte neuronal [172]. La alteración de la BHE implica la apertura de la vía paracelular facilitando la entrada de leucocitos al SNC [157] que contribuyen a la neuroinflamación.

En respuesta a estímulos inmunes, las células endoteliales también son capaces de sintetizar sustancias activas: IL-1, IL-6, interferón, TNF- α , endotelina-1 y MMP-9 que alteran la permeabilidad de la BHE [18]. Estos cambios pueden ir dirigidos al incremento de moléculas de adhesión endotelial necesarios para que tenga lugar la infiltración de células al SNC, pero también contribuyen a la apertura de la BHE [153]. Las células inmunes infiltradas de este modo producen citoquinas, quimioquinas, ROS, MMP-3 y MMP-9 que actúan sobre las uniones estrechas y la lámina basal agravando la alteración de la BHE [21, 157].

5. Consecuencias de la alteración patológica de la BHE: edema

El **edema cerebral** se define como el **exceso de acumulación de agua en el espacio intracelular o extracelular del cerebro** en condiciones patológicas. El aumento del volumen conlleva un incremento de la presión intracraneal y la opresión de la circulación sanguínea pudiendo generar hipoxia e incluso la muerte [37, 213].

A pesar de que la modificación de la permeabilidad de la BHE es un acontecimiento fisiológico, un incremento prolongado de la permeabilidad puede permitir la extravasación y acumulación de proteínas plasmáticas y de fluidos en el espacio perivascular, resultando en la formación de **edema vasogénico** (edema originado por la alteración de la BHE y caracterizado por la acumulación de agua extracelular) [35, 36]. En patologías como la isquemia [214], la encefalomiелitis autoinmune [215] o el daño cerebral por traumatismo [213] en las que existe una alteración de la BHE, el incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos por alteración de las uniones estrechas conduce a la formación de edema vasogénico [37]. En el caso del ictus isquémico, la formación de edema vasogénico ocurre con posterioridad a la generación de edema citotóxico (edema de origen celular caracterizado por la acumulación de agua intracelular) que se produce de forma independiente de la alteración de la BHE [216].

La AQP4 interviene tanto en el desarrollo como en la resolución del edema. En algunos casos, cuando la BHE está alterada y comienza a acumularse agua en la región extracelular, la AQP4 puede sufrir una reorganización hacia los procesos astrocitarios y disminuir su expresión en los pies [35]. Como consecuencia, se previene la introducción de agua en el interior celular con riesgo de generación de edema citotóxico, a pesar de estar favorecida la acumulación de agua extracelular y generación de edema vasogénico. Esta reducción en la expresión perivascular de AQP4 se ha visto directamente relacionada con la disminución de proteínas de la lámina basal o de las proteínas de las uniones estrechas [217]. Una vez que el edema vasogénico

ya se ha generado, puede ocurrir la regulación a la alza de AQP4 perivascular como mecanismo protector en la resolución del edema favoreciendo el movimiento de agua hacia el interior celular y reduciendo la presión intracerebral, contribuyendo con ello a estabilizar la BHE alterada. Como consecuencia, ocurre un engrosamiento o hipertrofia de los astrocitos que puede desembocar en **edema citotóxico**. De este modo, la AQP4 juega un papel dual en la resolución del edema cerebral, ya que favorece la resolución del edema vasogénico pero contribuye a la generación del edema citotóxico [35, 213].

6. MDMA y alteración de la BHE

Debido a su liposolubilidad, la MDMA administrada periféricamente atraviesa fácilmente la BHE [39]. Una vez alcanzan el SNC, la MDMA y sus metabolitos inducen la formación de radicales libres y estrés oxidativo [74, 218, 219] y la activación de la respuesta neuroinflamatoria [9], factores todos ellos que, junto a la hipertermia [8, 69] podrían alterar la integridad y/o la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

Actualmente, tan sólo un estudio examina el efecto de la administración aguda de MDMA sobre la alteración en la BHE, describiendo el desarrollo de edema cerebral con extravasación de albúmina y del trazador Azul de Evans, en relación a la alteración celular tras la administración de una dosis muy alta de MDMA en rata (40 mg/Kg), próxima a la dosis letal [106]. Sin embargo, no existen estudios sobre los mecanismos celulares y moleculares implicados en la alteración de la BHE inducida por MDMA, ni las circunstancias que tienen lugar tras la administración de dosis más moderadas de la droga.

Por otro lado, la alteración de la BHE está mejor descrita tras la administración de metanfetamina, una droga cuyos mecanismos de toxicidad también implica liberación de monoaminas, alto grado de estrés oxidativo e hipertermia [220, 221]. La administración de metanfetamina en ratones altera la BHE, incrementando la extravasación de inmunoglobulina-G [222], de dextrano [223] y de Azul de Evans [224]. Este incremento en la permeabilidad, así como la formación de edema vasogénico, están influenciados por la hipertermia que induce la droga [225]. Además, se ha determinado la disminución en los niveles de expresión de las proteínas ZO-1, claudina-5 y ocludina de las uniones estrechas [223, 224] y de la laminina de la lámina basal [222], como consecuencia del incremento en la actividad de MMP-9 tras la administración de metanfetamina [222, 224].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La administración de una dosis neurotóxica de MDMA produce, inmediatamente después de su administración, una alteración en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) que conduce al incremento en la permeabilidad. Dicha alteración podría contribuir a los efectos deletéreos de la MDMA y estar relacionada con la neuroinflamación y la neurotoxicidad serotoninérgica producida por la droga a corto y a largo plazo, respectivamente.

OBJETIVOS

BLOQUE I: Evaluar el efecto de la MDMA sobre la BHE en el hipocampo de la rata.

- **OBJETIVO 1:** Valorar la permeabilidad de la BHE mediante el análisis de la extravasación de Azul de Evans e inmunoglobulina G endógena.
- **OBJETIVO 2:** Estudiar la integridad de la BHE a través de los cambios en la expresión de proteínas de las uniones estrechas (claudina-5) y de la lámina basal (laminina y colágeno tipo IV).
- **OBJETIVO 3:** Determinar la actividad y expresión de metaloproteinasas (MMP-2, MMP-3 y MMP-9) y la expresión de MAPK (p38, ERK1/2 y JNK) que pudieran estar implicadas en su regulación.
- **OBJETIVO 4:** Evaluar la actividad y expresión del activador tisular del plasminógeno, así como la expresión de su sustrato, plasminógeno y del receptor LRP-1.
- **OBJETIVO 5:** Analizar la formación de edema y los cambios en la expresión del canal de agua, AQP4.
- **OBJETIVO 6:** Estudiar la implicación de la actividad MMP-9, mediante su inhibición con SB-3CT, sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de claudina-5, LRP-1 y AQP4, y en la formación de edema.

BLOQUE II: Establecer una relación entre las alteraciones de la BHE producidas por MDMA y la respuesta neuroinflamatoria y neurotóxica que induce la droga en el hipocampo de la rata.

- **OBJETIVO 7:** Estudiar el efecto de la MDMA sobre la activación de la microglía y la astrogliía a través del análisis de la expresión de marcadores específicos (OX-42, GFAP) y del receptor P2X₇, además de determinar la expresión de la citoquina proinflamatoria IL-1 β y de la proteína HMGB-1 asociada a daño tisular.
- **OBJETIVO 8:** Evaluar la implicación de los receptores P2X₇, mediante la utilización de los antagonistas Brilliant Blue G (BBG) y A-438079, en la respuesta neuroinflamatoria y la alteración de la BHE inducidas por la administración de MDMA.
- **OBJETIVO 9:** Analizar la implicación de la actividad MMP-9, mediante su inhibición con SB-3CT, en la respuesta neuroinflamatoria inducida por MDMA.
- **OBJETIVO 10:** Determinar el papel de los receptores P2X₇, mediante la administración del antagonista BBG, sobre la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por MDMA a largo plazo.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo en ratas macho adultos jóvenes, de la cepa *Dark Agouti*, con un peso comprendido entre 175 - 200 g (8 semanas de edad) (Harlan Laboratories Models) (figura 17). Se eligió esta cepa de ratas por presentar una mayor sensibilidad y homogeneidad a los efectos neurotóxicos producidos a largo plazo por la MDMA [11]. Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura (21 ± 2 °C) y humedad (50 - 55 %) controladas, sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con libre acceso a comida y agua, en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense y conforme a la Regulación Europea y Española: Directiva Europea 2010/63/UE, Real Decreto 1337 de 1 de febrero 2013 (BOE nº34, 8 febrero 2013; Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo).



Figura 17. Rata de la cepa Dark Agouti.

2. Compuestos administrados

- **MDMA:** (\pm) 3,4-metilendioximetanfetamina (clorhidrato): (Lipomed (Arlenheim, Suiza) y Servicio de Estupefacientes y Psicótrpos de la Agencia Española del Medicamento (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad)). Administrada por vía intraperitoneal, a una dosis neurotóxica de 12,5 mg/Kg o 10 mg/Kg, disuelta en una solución salina (0,9 % NaCl). El volumen de inyección utilizado fue de 1 ml/Kg.

- **Brilliant Blue G (BBG):** (B0770, Sigma-Aldrich). Administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 50 mg/Kg. Se disolvió en solución salina (0,9 % NaCl) y se administró con un volumen de inyección de 1 ml/Kg.
- **A-438079:** (2972, Tocris). Administrado por vía intraperitoneal, 2 inyecciones de 30 mg/Kg. Se disolvió en solución salina (0,9 % NaCl) y el volumen de inyección fue de 2 ml/Kg.
- **Azul de Evans:** (E2129, Sigma-Aldrich). Administrado por vía intravenosa en la vena lateral de la cola de la rata a una dosis de 80mg/Kg y un volumen de inyección de 4ml/Kg. Se disolvió en solución salina (0,9% NaCl).
- **SB-3CT:** (S7430 Selleck Chemical). Administrado en forma de suspensión estable por vía intraperitoneal a una dosis de 25 mg/Kg y un volumen de inyección de 1 ml/Kg. Se disolvió en DMSO 5 %, Tween80 20 % en solución salina (NaCl 0,9%).

3. Diseño experimental

Los estudios llevados a cabo se centraron en el hipocampo de la rata, debido a que es una región con gran cantidad de aferencias serotoninérgicas y muy sensible a los efectos a corto [69] y a largo plazo (neurotóxicos) inducidos por MDMA [4, 11].

En todos los experimentos realizados, la administración de MDMA fue una única inyección intraperitoneal a una dosis neurotóxica de 10 o 12,5 mg/Kg. Se eligieron estas dosis debido a que causan neurotoxicidad serotoninérgica [3, 11, 104] con una mortalidad mínima.

Todos los experimentos se realizaron utilizando la dosis de 12,5 mg/Kg a excepción de aquellos correspondientes a los estudios de antagonismo de receptores P2X₇ debido a que, en el transcurso de la experimentación se modificó la procedencia de la droga teniendo que ajustarse la dosis para lograr efectos neurotóxicos equivalentes entre ambos lotes de MDMA. Además, ambos compuestos de distinta procedencia se utilizaron de forma independiente para estudiar el efecto temporal de la MDMA sobre la actividad y expresión de metaloproteinasas y la expresión de proteínas de la lámina basal y la respuesta neuroinflamatoria obteniéndose resultados temporales equivalentes. Únicamente se describen las curvas temporales del efecto de la MDMA correspondientes a la dosis de 12,5 mg/Kg por el hecho de ser la utilizada en la mayoría de los estudios realizados en esta Tesis Doctoral.

3.1 Estudio del efecto de la administración de MDMA sobre la permeabilidad de la BHE mediante Azul de Evans

El colorante Azul de Evans es una molécula de bajo peso molecular (96 Da) que se une fuertemente a la albúmina sérica, lo que lo convierte en un trazador de alto peso molecular. Cinco minutos después de su administración intravenosa todas las moléculas de Azul de Evans ya se encuentran unidas a la albúmina [226]. En condiciones fisiológicas este complejo no atraviesa la BHE, pero ante un incremento en la permeabilidad puede detectarse dentro del SNC.

Para determinar el efecto del tratamiento con MDMA sobre la permeabilidad de la BHE se administró el trazador Azul de Evans 1 hora antes de la inyección de la droga o solución salina, en el caso de los animales del grupo control (figura 18). Los animales fueron sacrificados mediante la administración de una dosis eutanásica (120 mg/Kg) de pentobarbital (Dolethal® Ventoquinol, España) 2 horas después de la administración de MDMA para obtener los hipocampos sobre los cuales se realizó la valoración colorimétrica.

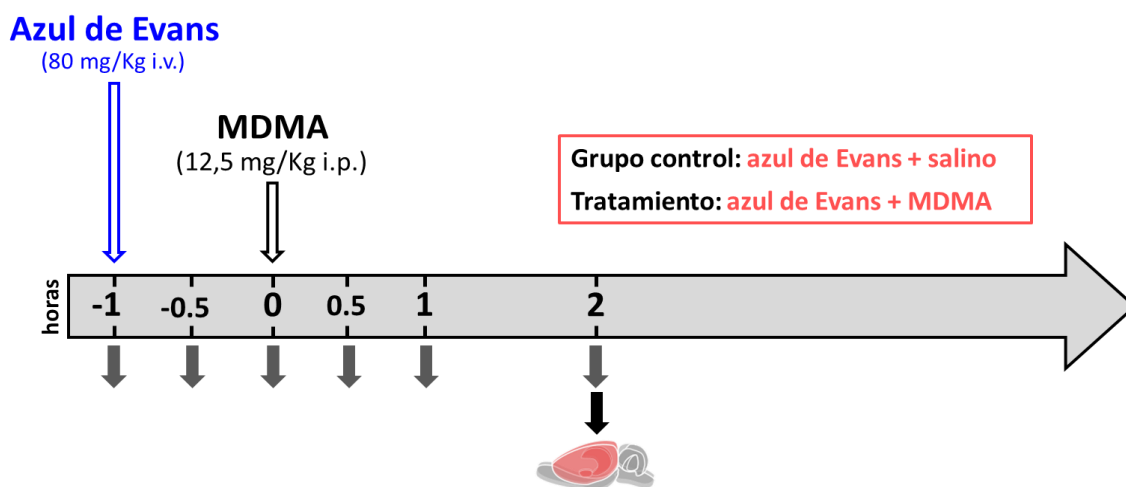


Figura 18. Representación del protocolo de administración del trazador Azul de Evans y MDMA para la obtención de muestras utilizadas en la valoración de la permeabilidad de la BHE. Las flechas grises indican los momentos de determinación de la temperatura rectal. La flecha negra indica el momento del sacrificio y la obtención de muestras.

La administración intravenosa del trazador Azul de Evans se llevó a cabo en la vena lateral de la cola de la rata, previamente anestesiada. Para facilitar la intervención se calentó la cola del animal aplicando una bolsa de agua caliente sobre ella. Los animales fueron sedados por vía inhalatoria con isoflurano (3,5 % para la inducción y 2,5 % para el mantenimiento; isoba®vet, Global Vet, Cataluña, España) combinado con protóxido de nitrógeno (Alphagaz™) a un flujo de

1 L/min mezclado con oxígeno a un flujo de 0,5 L/min. Durante el tiempo que los animales permanecieron anestesiados, se les mantuvo sobre una manta térmica para evitar la disminución de la temperatura corporal que produce la sedación. La temperatura rectal de los animales fue registrada a los tiempos indicados en la figura 18 para estudiar el efecto del protocolo de administración del trazador sobre la hipertermia producida por la MDMA.

3.2 Estudio del efecto de la MDMA sobre la actividad enzimática y la expresión de proteínas implicadas en la integridad de la BHE

Para determinar el efecto a corto plazo de la administración de MDMA sobre la actividad proteasa y la expresión de varias proteínas implicadas en la integridad de la BHE se siguió el modelo experimental representado en la figura 19. Tras la administración de MDMA o solución salina, los animales fueron sacrificados pasadas 1, 3, 6 y 24 horas para obtener una curva temporal del efecto de la droga.

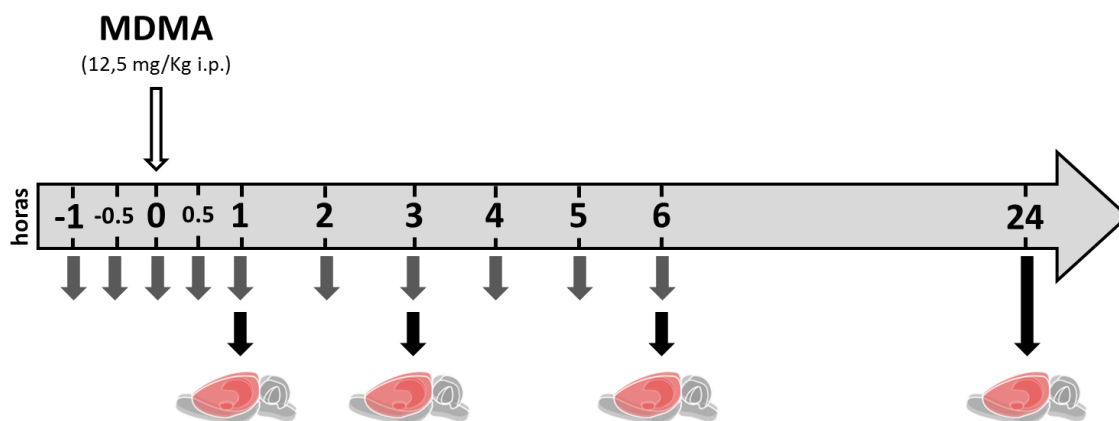


Figura 19. Representación del protocolo de administración de MDMA para la determinación del efecto temporal de la droga sobre la actividad enzimática y la expresión proteica. Las flechas grises indican los momentos de determinación de la temperatura rectal. Las flechas negras indican el momento del sacrificio y la obtención de muestras.

Tanto para el sacrificio como para la extracción de las muestras a los tiempos indicados se siguieron protocolos diferentes en función de la finalidad con la que se obtuviera la muestra. Los detalles de dichos protocolos se explican más adelante en los apartados correspondientes. De este modo, todos los experimentos encaminados a la evaluación temporal del efecto de la droga sobre parámetros de actividad enzimática, expresión proteica mediante western blot e inmunohistoquímica y determinación de la extravasación de IgG endógena, siguieron este protocolo de experimentación animal.

3.3 Estudio del efecto de la MDMA sobre la formación de edema mediante resonancia magnética: parámetros T_2 y ADC

Para el análisis de la formación de edema se realizaron estudios de imagen por resonancia magnética. La adquisición de las series de imágenes de eco de espín para la determinación de los parámetros T_2 y ADC se realizó antes de la administración de la MDMA para obtener una medida de las condiciones basales, así como 2,5, 3, 4, 5, 6 y 24 horas después de haber sido administrada la droga para determinar el curso temporal del efecto de la MDMA sobre dichos parámetros (figura 20).

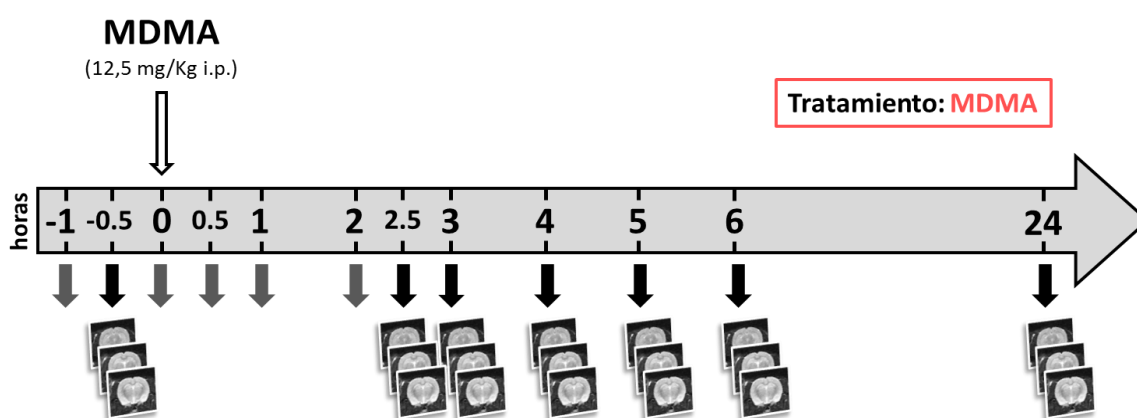


Figura 20. Representación del protocolo experimental de administración de MDMA para la adquisición de una serie de imágenes de eco de espín para la determinación de los parámetros T_2 y ADC y el análisis temporal de la formación de edema. Las flechas grises indican los tiempos a los que se determinó la temperatura rectal y las negras los tiempos en los que se obtuvieron las imágenes de resonancia magnética.

Durante la adquisición de imágenes se mantuvo a los animales anestesiados con una mezcla de isoflurano (3,5 % para la inducción y 2 - 2,5 % para el mantenimiento isoba[®]vet, Global Vet, Cataluña, España) en oxígeno a un flujo de 2 l/min. Las ratas se mantuvieron a la misma temperatura registrada momentos antes de la inducción para cada animal gracias a la aplicación de aire caliente durante el tiempo que permanecieron dentro del aparato de resonancia. Además, se monitorizó su respiración manteniendo una frecuencia de aproximadamente 60 respiraciones por minuto, adaptando la cantidad de anestesia a cada animal en cada momento.

Tras la adquisición basal de las imágenes, la administración de MDMA se llevó a cabo en el momento en que las ratas, tras despertar de la anestesia, recuperaron la temperatura

corporal basal registrada con anterioridad a la inducción anestésica. Durante la recuperación de la anestesia los animales se mantuvieron sobre una manta térmica.

3.4 Estudio del efecto de la inhibición de la actividad MMP-9 mediante la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA

La implicación de la actividad gelatinasa sobre los cambios inducidos por MDMA en la BHE se analizó mediante el tratamiento con SB-3CT, un inhibidor específico de estas enzimas.

La administración de SB-3CT o vehículo, se realizó 1 hora antes de la inyección de MDMA o solución salina (figura 21). Las muestras se obtuvieron 1 y 6 horas después de la administración de MDMA para estudios de actividad enzimática y de expresión de varias proteínas implicadas en la integridad de la BHE. Se registró la temperatura rectal de los animales con el fin de analizar el efecto del tratamiento con SB-3CT sobre la hipertermia inducida por MDMA.

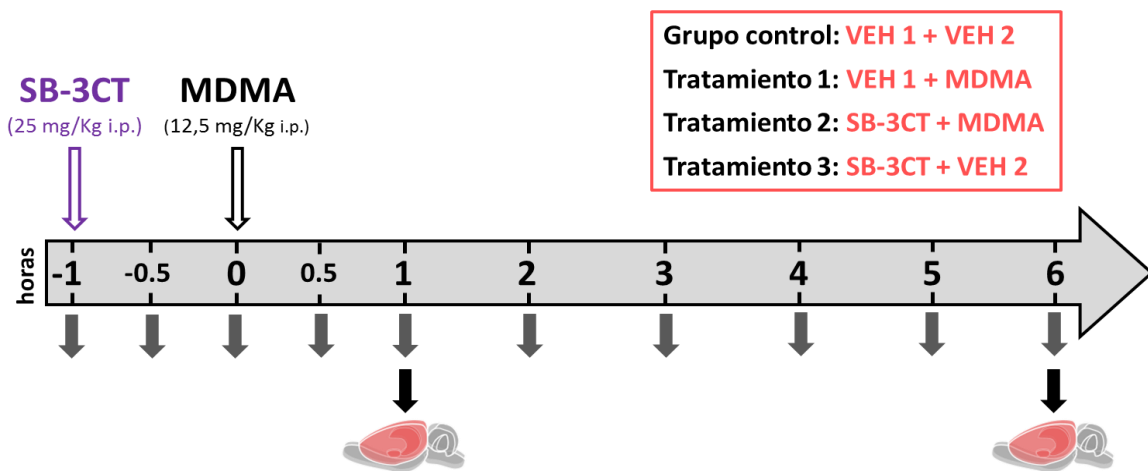


Figura 21. Representación del protocolo de administración del inhibidor de gelatinasas, SB-3CT, para la determinación de su efecto sobre los cambios inducidos por MDMA en la actividad enzimática y la expresión de proteínas implicadas en la integridad y permeabilidad de la BHE. Las flechas grises indican los tiempos a los que se determinó la temperatura rectal y las negras los tiempos a los que se realizó el sacrificio y la obtención de muestras de hipocampo.

Para el estudio de la inhibición de la actividad MMP-9 sobre la formación de edema se siguió el protocolo experimental detallado en la figura 22. La administración de SB-3CT o vehículo se realizó 1 hora antes de la inyección de MDMA. La adquisición de una serie de imágenes de eco de espín para la determinación del parámetro T_2 se realizó previamente a la administración del inhibidor o de su vehículo para la obtención de una medida basal, y 2,5 y 6

horas después de la inyección de MDMA. Las condiciones en las que se llevó a cabo el procedimiento son las mismas que las detalladas anteriormente en el apartado 3.3.

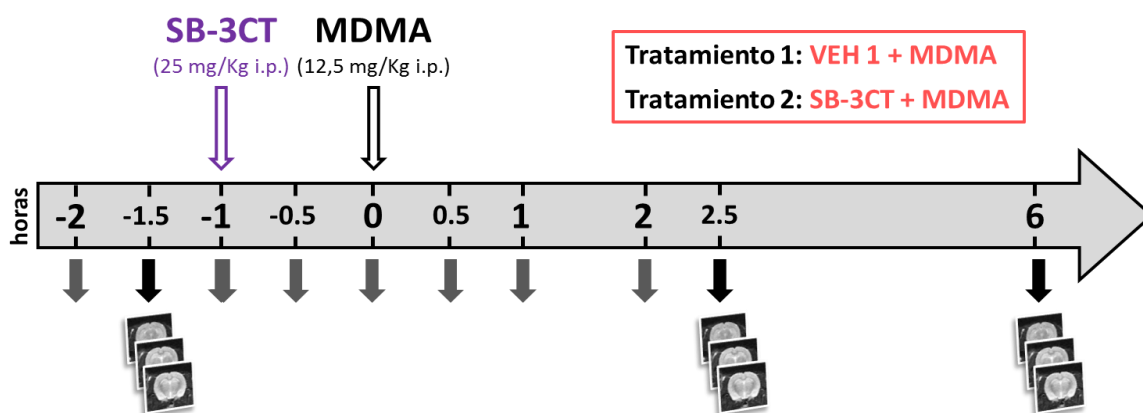


Figura 22. Representación del protocolo de administración del inhibidor de gelatinasas, SB-3CT, para la determinación de su efecto sobre los cambios inducidos por MDMA en la formación de edema. Las flechas grises indican los tiempos a los que se determinó la temperatura rectal y las negras los tiempos a los que se obtuvieron las imágenes de resonancia magnética.

3.5 Estudio del antagonismo de receptores P2X₇ sobre los efectos inducidos por la administración de MDMA

La administración de BBG se realizó 10 minutos antes de la inyección de MDMA o solución salina (figura 23, A). Las muestras se obtuvieron 1, 3 y 6 horas después de la administración de MDMA para estudios de actividad enzimática y expresión proteica, y 7 días después para determinar el efecto del antagonista BBG sobre la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por MDMA a largo plazo.

Para confirmar el efecto del antagonismo de receptores P2X₇ sobre la expresión de proteínas de la lámina basal, se utilizó además el antagonista A-438079. La administración de A-438079 tuvo lugar 1 y 0,5 horas antes de la administración de MDMA (Figura 23, B), obteniéndose las muestras para estudios de expresión proteica mediante inmunohistoquímica, 6 horas después de la inyección de la droga. Durante los experimentos, se registró la temperatura rectal de los animales con el fin de analizar el efecto de los antagonistas sobre la hipertermia inducida por MDMA.

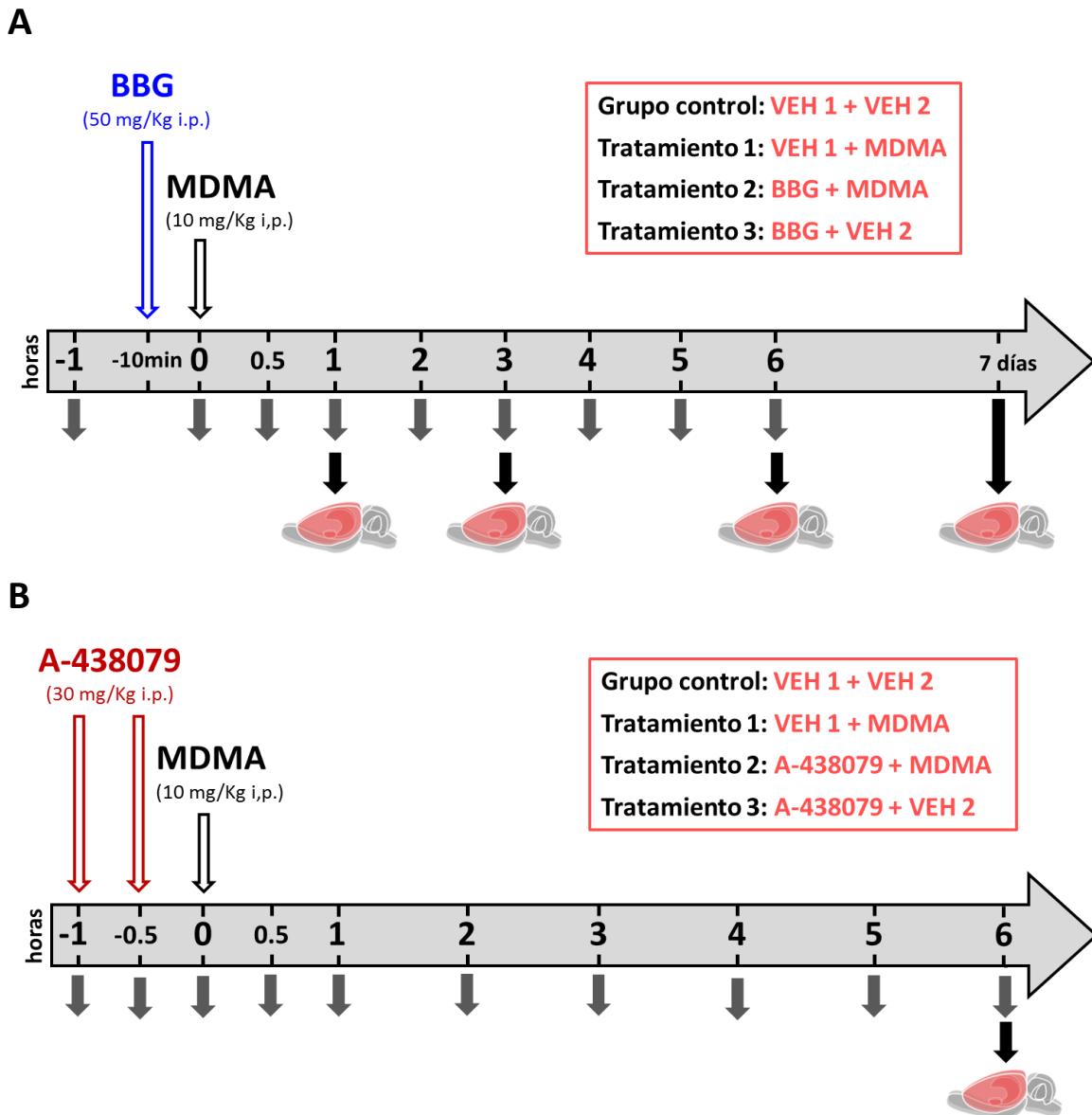


Figura 23. Representación de los protocolos de experimentación para el estudio del efecto del antagonismo de receptores P2X₇ sobre los cambios en la BHE inducidos por MDMA mediante los antagonistas BBG (A) y A-438079 (B). Las flechas grises indican los momentos de determinación de la temperatura rectal y las negras el momento del sacrificio y de la obtención de muestras de hipocampo.

4. Medida de la temperatura rectal

La temperatura rectal se registró durante 1 hora, media hora y justo antes de la administración de MDMA para establecer un valor de temperatura basal. Posteriormente, se registró la temperatura a la media hora, y cada hora hasta el momento del sacrificio o las 6 horas después de la inyección de la droga. Las medidas se realizaron con una sonda de temperatura para rata (RET-2 Rodent Sensor) acoplada a un lector digital (BAT12 thermometer, Physitemp Instruments, NJ, EE.UU) con una resolución de $\pm 0,1$ °C y una precisión de $\pm 0,2$ °C. La sonda se

introdujo 2,5 cm en el recto de la rata, obteniéndose la lectura durante los 10-20 segundos posteriores a su inserción.

5. Extravasación de Azul de Evans

Los animales fueron anestesiados con una dosis eutanásica (120 mg/Kg) de pentobarbital (Dolethal® Ventoquinol, España) y sometidos a perfusión transcardiaca a través del ventrículo izquierdo, con 300 ml (40 ml/min) de una solución tamponada de sodio y fosfato (PB) 0,1 M (pH=7,4). Se extrajeron los cerebros y se diseccionaron sobre hielo picado para obtener los hipocampos que se congelaron inmediatamente en hielo seco. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta el día del ensayo. Cada hipocampo fue homogeneizado 1:3 p/v en ácido tricloroacético (TCA) al 50 % utilizando un homogeneizador de ultrasonidos (Labsonic 2000 U, B. Braun Melsungen AG, Alemania). La sonicación se realizó durante 10 segundos a una amplitud del 10 %. Los homogenados se centrifugaron a 30.000 x g (Sorvall®RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giralte, EE.UU.) durante 20 minutos a 4 °C. Se recogieron los sobrenadantes y se determinó la absorbancia a 620nm para cada una de las muestras ensayadas por duplicado. La concentración de Azul de Evans de cada muestra, se obtuvo mediante interpolación de cada medida de absorbancia sobre una curva estándar (0 - 30 ng/μl) del colorante en TCA realizada en el mismo ensayo.

6. Extravasación de IgG endógena

La permeabilidad de la BHE se valoró analizando la extravasación de IgG endógena desde el torrente sanguíneo al parénquima cerebral.

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros completos se extrajeron para ser inmediatamente congelados en una solución fría de 2-metilbutirato. Posteriormente, se almacenaron a -80 °C. Los cerebros se embebieron en Tissue-tek® y se cortaron secciones de 20 μm de grosor en criostato, obteniéndose cortes frontales de hipocampo desde bregma: -2,30 mm hasta bregma: -4,80 mm (figura 24) [227]. Los cortes se recogieron de forma seriada sobre portaobjetos y se conservaron a -80 °C hasta su uso, momento en el cual fueron post-fijados con paraformaldehído al 4 % en PB 0,1 M (pH 7,4) durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron con PB y se bloquearon las uniones inespecíficas incubando con una solución de bloqueo (PB conteniendo 0,1 % de Tritón® X-100, 0,5 % de albúmina de suero bovino

(BSA) y 10 % de suero de caballo 10 %), durante 1h. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo específico para IgG de rata (anti IgG-Alexa Fluor[®]594, Invitrogen, España) en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Tras lavar los cortes, se cubrieron con una solución de montaje especial para inmunofluorescencia con marcaje nuclear (ProLong[®] Gold con DAPI, Invitrogen, España).

Las imágenes de fluorescencia se obtuvieron mediante la cámara Axiocam HRc acoplada al microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axio Imager.A1) obteniéndose al azar 15 imágenes (20x) de hipocampo, de 4 cortes seriados para cada animal. El procedimiento inmunohistoquímico completo, desde el procesamiento de los cortes hasta la obtención de imágenes mediante microscopía y cuantificación se realizó por triplicado.

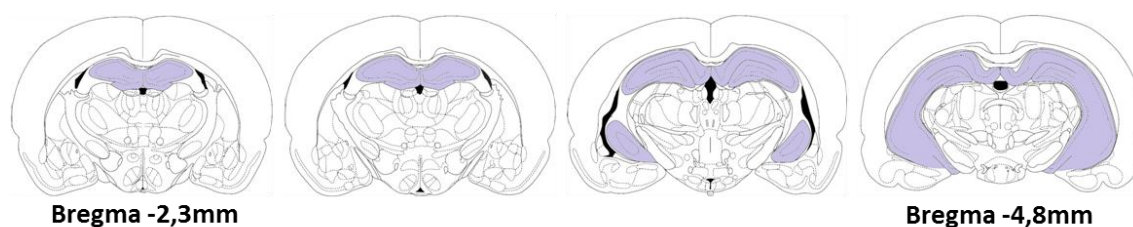


Figura 24. Representación esquemática de los cortes utilizados para la determinación de la extravasación de IgG en el hipocampo.

7. Estudios de expresión mediante inmunohistoquímica

Los animales fueron anestesiados con una dosis eutanásica de pentobarbital (120 mg/Kg) para posteriormente realizarles una perfusión transcardiaca a través del ventrículo izquierdo (40 ml/min) con 200 ml de una solución tamponada de sodio y fosfato (PB) 0,1 M, seguida de 200 ml de una solución fijadora de paraformaldehído al 4 % en PB 0,1 M (pH 7,4).

Tras la fijación, se extrajeron los cerebros completos que se mantuvieron en la misma solución de paraformaldehído al 4 % durante 24 horas a 4 °C. Transcurrido este tiempo, los cerebros se transfirieron a una solución crioprotectora de sacarosa al 30 % para su deshidratación parcial, en la que permanecieron hasta el momento en que fueron cortados. Para ello, se embebieron y congelaron en Tissue-tek[®] y se obtuvieron cortes frontales seriados de hipocampo de 30 μ m de grosor en criostato (Leica CM1950, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania). Los cortes se conservaron en una solución crioprotectora (sacarosa 30 %, etilenglicol 30 %, en PB) a -20 °C hasta su uso.

Para la tinción inmunohistoquímica de claudina-5, el tejido se sometió a un protocolo de desmascaramiento antigénico utilizando una solución de citrato comercial a pH 6 (Dako, Denmark) durante 5 minutos a 95 °C. Los cortes se lavaron en PB y se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de PB conteniendo Tritón X-100 al 0,1%, BSA al 0,5 % y suero de caballo al 10 % durante 1 h. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 4) durante toda la noche a 4 °C. Se lavaron en PB y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar el excedente de anticuerpo secundario, los cortes se montaron cubrieron con la solución de montaje especial para inmunofluorescencia con marcaje nuclear.

ANTICUERPOS PRIMARIOS

Anticuerpo frente a	Huésped	Dilución	Casa comercial	Referencia
Claudina-5	ratón	1/500	Invitrogen	35-2500
Laminina	conejo	1/1.000	Sigma	L-9393
Colágeno-IV	conejo	1/1.000	Abcam	AB2218
AQP4	conejo	1/3.000	Millipore	AB2218
OX-42	ratón	1/500	Serotec	MCA275G
GFAP	cabra	1/1.000	Sigma	SAB2500462
P2X7-R	conejo	1/1.000	Alomone	APR-004

ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Anticuerpo frente a	Huésped	Dilución	Casa comercial	Referencia
IgG de rata AlexaFluor™ 594	Burro	1/1.000	Invitrogen	A-21209
IgG de ratón AlexaFluor™ 594	Burro	1/1.000	Invitrogen	A-21203
IgG de ratón AlexaFluor™ 488	Burro	1/1.000	Invitrogen	A-21202
IgG de conejo AlexaFluor™ 594	Burro	1/1.000	Invitrogen	A-21207
IgG de conejo AlexaFluor™ 488	Burro	1/1.000	Invitrogen	A-21206
IgG de cabra AlexaFluor™ 594	Burro	1/1.000	Invitrogen	A-21207

Tabla 4. Tablas de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la determinación de la expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica.

Las imágenes de fluorescencia (40x) se obtuvieron mediante la cámara Axiocam HRc acoplada al microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axio Imager.A1). Se seleccionaron 8 - 12 imágenes de giro dentado, 5 - 7 imágenes de CA3 y 8 - 12 imágenes de CA1 de ambos hemisferios, correspondientes a un único corte de hipocampo dorsal (desde bregma:-2,80 mm

hasta bregma: -3,80 mm [227]). El procedimiento completo, desde el procesamiento de los cortes hasta la obtención y cuantificación de imágenes se repitió al menos tres veces. Las imágenes fueron analizadas con el programa Image J Software versión 1.42q (NIH, Maryland, USA).

8. Estudios de actividad enzimática

8.1 Extracción y preparación de muestras

Los animales fueron sacrificados mediante decapitación. Se extrajeron los cerebros y se diseccionaron sobre hielo picado para obtener los hipocampos. Cada hipocampo fue homogeneizado manualmente en 20 volúmenes de tampón de lisis (Tris base 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, NP-40 1 %, pH 7,4) conteniendo inhibidores de proteasas al 5 % (p8340, Sigma, Madrid, España) y fosfatasa al 1 % (p5726, Sigma, Madrid, España). El homogenado se hizo pasar a través de la aguja de una jeringa hipodérmica (26G) para romper las fracciones tisulares que permanecieron enteras. Las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

Previamente a la utilización de las muestras se diluyeron y se determinó la concentración de proteína total mediante una modificación del método de Lowry, el método DCTM Assay Protein (Bio-Rad) (ver apartado 12.2).

8.2 Zimografía en gel para la determinación de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9

La separación de las formas activa y proactiva de MMP-2 y de MMP-9 se llevó a cabo mediante geles de poliacrilamida/bis-acrilamida al 7 %, conteniendo gelatina al 5 % como sustrato enzimático específico de dichas metaloproteinasas.

Las muestras fueron diluidas 3:1 en tampón de carga no reductor (Tris base 25 mM, pH 6,8, glicerol 10 %, azul de bromofenol) y se calentaron durante 15 min a 37 °C, cargándose 35 µg de proteína total de cada muestra. La electroforesis se desarrolló en condiciones de voltaje constante, a 120 V durante 110 min.

Tras la electroforesis, los geles se incubaron dos veces en tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 6 mM, ZnCl₂ 1,5 μM, Tween-20 2,5%, pH 7,4) durante un total de 30 minutos para eliminar la unión reversible de SDS a las proteínas de las muestras, permitir la renaturalización de las proteínas y recuperar la actividad enzimática. Posteriormente se incubaron los geles en tampón de activación (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 6 mM, ZnCl₂ 1,5 μM, pH 7,4) durante 48 horas a 37°C. Tras la incubación, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Bio-Rad, España) seguido de destinción con solución de ácido acético al 10% y metanol al 40% que permitió visualizar bandas decoloradas debido a la ausencia de gelatina, correspondientes a la actividad enzimática de las gelatinasas ensayadas.

Los geles revelados de este modo fueron escaneados como negativos. La intensidad de las bandas correspondientes a la degradación de sustrato se cuantificó mediante el programa Image J Software versión 1.42q (NIH, Maryland, USA).

8.3 Zimografía en gel para la determinación de la actividad caseinolítica de MMP-3

La determinación de la actividad de MMP-3 se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo detallado en el apartado anterior con la excepción de que en este caso se utilizaron geles comerciales de caseína al 12 % (EC64052BOX, Invitrogen, Life Technologies).

8.4 Zimografía en gel para la determinación de la actividad del activador tisular del plasminógeno

El estudio de la actividad proteolítica del activador tisular del plasminógeno se llevó a cabo mediante zimografía en geles de poliacrilamida/bis-acrilamida al 9 %, conteniendo caseína al 0,1 % y plasminógeno al 0,1 % como sustrato enzimático específico.

Las muestras fueron diluidas 3:1 en tampón de carga no reductor (Tris base 25 mM, pH 6,8, glicerol 10 %, azul de bromofenol) y se calentaron durante 15 min a 37 °C, cargándose 20 μg de proteína total de cada muestra. La electroforesis se desarrolló en condiciones de voltaje constante, a 120 V durante 110 min.

Los geles se lavaron dos veces durante 30 minutos en tampón de lavado (Tris-HCl 0,1 M, glicina 0,1 M y EDTA 0,01 M, Tween-20 2,5 %, pH 8) y se incubaron en tampón de activación

(Tris-HCl 0,1 M, glicina 0,1 M y EDTA 0,01 M, pH 8) durante 48 horas a 37°C. Tras la incubación, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie seguido de destinción con solución de ácido acético 10 % y metanol 20 % que permitió visualizar bandas decoloradas debido a la ausencia de caseína y plasminógeno correspondientes a la actividad enzimática del activador tisular del plasminógeno.

Los geles revelados de este modo fueron escaneados como negativos. La intensidad de las bandas correspondientes a la degradación de sustrato se cuantificó mediante el programa Image J Software versión 1.42q.

9. Estudios de expresión proteica mediante Western Blot

La determinación de la expresión de proteínas mediante Western Blot se llevó a cabo sobre las mismas muestras utilizadas para el estudio de la actividad enzimática mediante zimografía en gel, por lo que el protocolo de obtención y homogenización, así como la determinación de la concentración de proteína total se encuentran detallados en el apartado anterior.

Las muestras se diluyeron 3:1 en buffer de carga reductor (Tris-HCl 25 mM pH 6,8, SDS 20 %, glicerol 10 %, azul de bromofenol y β -mercaptoetanol 4 %), se hirvieron durante 5 min a 95 °C y se cargaron 15 μ g de proteína total en geles de SDS-poliacrilamida de porcentaje variable (7 o 10 %), en función del peso molecular de la proteína a analizar.

Tras la electroforesis, las proteínas del gel fueron transferidas a membranas de PVDF mediante un sistema de transferencia rápida Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad, España). Para minimizar las uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon en TBS (Tris 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,5) con un 5 % de leche desnatada o albúmina de suero bovina, durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (tabla 5) durante toda la noche a 4 °C, en agitación suave. Tras lavado en TBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 5) conjugado con peroxidasa (GE Healthcare, España). Como control de carga se analizó la expresión de β -actina.

La inmunoreactividad de las bandas se detectó mediante un sistema de quimioluminiscencia para Western Blot (ECL Western Blotting Detection Kit, o bien, ECL Plus™ Western blotting detection kit, GE Healthcare, España), seguido de la exposición de las

membranas al equipo de imagen Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, EEUU) o tras el revelado de películas fotográficas (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, España). La cuantificación de la densidad de las bandas se realizó utilizando el programa Image J Software versión 1.42q (NIH, Maryland, USA). El valor de cada muestra se normalizó en referencia a la inmunoreactividad de la β -actina revelada en la misma membrana.

ANTICUERPOS PRIMARIOS

Anticuerpo frente a	Huésped	Dilución	Casa comercial	Referencia
Laminina	conejo	1/1.000	Sigma	L-9393
AQP-4	conejo	1/3.000	Millipore	AB2218
β -actina	ratón	1/10.000	Sigma	A5441
MMP-2	conejo	1/1.000	Millipore	AB19015
MMP-9	conejo	1/1.000	Millipore	AB19016
MMP-3	cabra	1/1.000	Abcam	AB18898
tPA	conejo	1/1.000	Santa Cruz	sc-15346
Plasminógeno	conejo	1/500	Santa Cruz	sc-25546
LRP-1	conejo	1/1.000	Abcam	ab92544
ERK1/2	conejo	1/1.000	Cell Signalling	4695
p-ERK1/2	conejo	1/1.000	Cell Signalling	4370
JNK	conejo	1/1.000	Cell Signalling	9258
p-JNK	conejo	1/1.000	Cell Signalling	9251
p38	conejo	1/1.000	Cell Signalling	9291
p-p38	conejo	1/500	Santa Cruz	sc17852R
HMGB-1	conejo	1/1.000	Abcam	ab18256
Claudina-5	Conejo	1/1000	Santa Cruz	Sc-28670

ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Anticuerpo frente a	Huésped	Dilución	Casa comercial	Referencia
IgG de cabra conjugado con HRP	Conejo	1/2.000	Sigma - Aldrich	A5420
IgG de conejo conjugado con HRP	Burro	1/2.000	Santa Cruz	sc-2305
IgG de ratón conjugado con HRP	Oveja	1/10.000	GE Healthcare Lifescience	NA931

Tabla 5. Tabla de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la determinación de la expresión de proteínas mediante Western Blot.

10. Estudios de resonancia magnética

Todos los experimentos de imagen por resonancia magnética (IRM) se realizaron en el equipo Biospec BMT 47/40 (Bruker, Ettlingen, Alemania) del CAI de RMN y RSE de la UCM que opera a un campo de 4.7 Teslas, equipado con un sistema de gradientes de 6 cm de diámetro interno capaz de alcanzar un gradiente máximo de 450 mT/m.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano (3,5 % para la inducción y 2 - 2,5 % durante el mantenimiento; isoba[®]vet, Global Vet, Cataluña, España) en oxígeno a un flujo de 2 L/min y se mantuvieron dormidos durante todo el experimento a la misma temperatura que se registró para cada animal momentos antes de la inducción. Para minimizar los artefactos debidos al movimiento se inmovilizó la cabeza de las ratas tras colocarla dentro de una sonda de radiofrecuencia de volumen de 3,5 cm de diámetro interno y se monitorizó la respiración manteniéndose alrededor de 60 respiraciones por minuto con el fin de sincronizar la respiración con la adquisición de las imágenes.

Se realizaron experimentos de IRM para el cálculo del tiempo de relajación transversal T_2 y el coeficiente de difusión aparente (ADC, *Apparent Diffusion Coefficient*). Para el cálculo de T_2 se adquirió una serie de imágenes de eco de espín con diferentes tiempos de eco (TE) variando desde 20 hasta 320 ms con un intervalo de 20 ms entre cada una de las imágenes. El tiempo de repetición (TR) se mantuvo fijo en 2,5 s aunque éste parámetro varió en relación a la respiración de cada animal debido a la sincronización de los experimentos con la respiración. El resto de parámetros para estas imágenes fue: campo de visión = $3 \times 3 \text{ cm}^2$; anchura del corte = 1.0 mm; tamaño de la matriz = 256 x 256. Para el cálculo del ADC se adquirió una serie de imágenes de eco de espín con diferentes potenciaciones de difusión, fijándose la duración de los gradientes de difusión, δ , a 10 s, el tiempo entre los gradientes de difusión, Δ , a 25 ms y variándose la intensidad de los gradientes de difusión, que para cada imagen de la serie fueron, 5, 50 y 150 mT/m. El TR de las imágenes se fijó en 2 s, aunque, como en el caso anterior, este valor dependió de la respiración de cada animal. El TE fue de 60 ms.

Para el cálculo de los valores de T_2 y el ADC a partir de cada una de las series de imágenes correspondiente se empleó la utilidad Image Sequence Analyze (ISA) del programa ParaVision 3.1 (Bruker, Ettlingen, Alemania). En total se obtuvieron datos de los 3 cortes del hipocampo con orientación coronal adquiridos correspondientes a Bregma -5, -3,5 y -2 mm. En cada uno de los cortes se definieron 3 regiones de interés (ROIs) (figura 25) y se calculó la media de la intensidad de la señal en cada uno de los ROI de las imágenes de la serie.

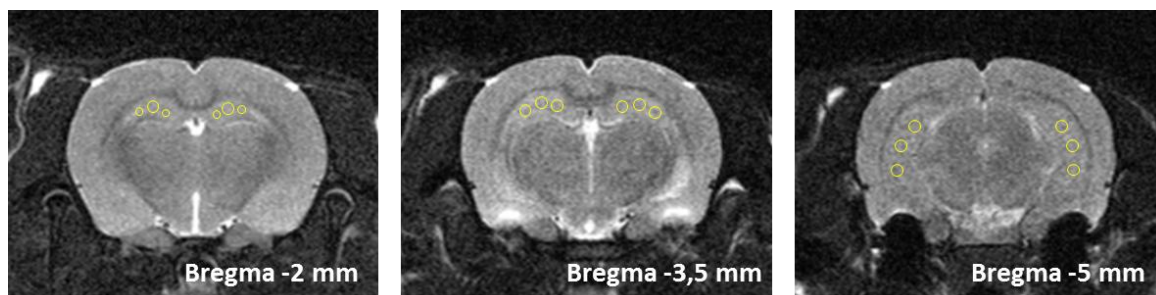


Figura 25. Imágenes de resonancia magnética representativas de los 3 cortes coronales de hipocampo y los ROIs (amarillo) seleccionados para la determinación de la intensidad de la señal.

11. Determinación de parámetros de neurotoxicidad

11.1 Determinación de los niveles hipocampales de 5-HT y 5-HIAA

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Tras la extracción del cerebro, los hipocampos fueron diseccionados sobre hielo picado y rápidamente congelados en hielo seco para posteriormente almacenarse a -80°C .

Los hipocampos se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP 61S, Sartorius AG, Alemania). A partir de este momento, las muestras permanecieron siempre en hielo. Los hipocampos se homogeneizaron en $750\ \mu\text{l}$ de ácido perclórico $0,2\ \text{M}$, conteniendo cisteína $0,1\ \%$, sulfito sódico $0,1\ \%$ y EDTA $0,01\ \%$, utilizando un homogeneizador de ultrasonidos (Labsonic 2000U, B. Braun Melsungen AG, Alemania). La sonicación se realizó durante 15 segundos a una amplitud del $20\ \%$. Posteriormente se centrifugaron a $12.000\ \times\ g$ (Sorvall®RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giralte, EE.UU.) durante 20 minutos a 4°C . El sobrenadante fue decantado y congelado a -40°C para su posterior análisis.

La cuantificación de la concentración de 5-HT y su metabolito, el 5-HIAA, se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (h.p.l.c) con detección coulombimétrica. El sistema de h.p.l.c. utilizado constaba de una bomba (Waters 510) conectada a un inyector automático con refrigeración (Waters 712 WISP), una columna de fase reversa (Spherisorb ODS2; $5\ \mu\text{m}$; $150 \times 4,6\ \text{mm}$; Waters) con precolumna (Nova-Pak C18m Waters) y un detector coulombimétrico (Coulchem II, ESA, Chelmsford, E.E.U.U.). La fase móvil utilizada por el sistema, a un flujo de $1,0\ \text{ml/min}$, estaba compuesta por KH_2PO_4 $0,05\ \text{M}$, ácido 1-octanosulfónico $1,3\ \text{mM}$, EDTA $0,1\ \text{mM}$ y metanol al $16\ \%$ en agua MilliQ ajustada pH $3,4$ ($654\ \text{pH Meter}$,

Metrohm, Suiza) con ácido fosfórico. Antes de utilizar la fase móvil, fue filtrada con filtros de nylon de 47mm de diámetro y tamaño de poro 0,45 μm (Sartorius) y desgasificada con helio.

Se utilizaron estándares de concentración conocida para 5-HT y 5-HIAA preparados en el tampón de homogenización de las muestras. Las áreas bajo la curva de los diferentes picos se cuantificaron utilizando el programa informático Clarity™, Data Apex.

11.2 Determinación de los lugares de recaptación de 5-HT marcados con [³H]-paroxetina

Los lugares de recaptación de serotonina, SERT hacen referencia a las proteínas transportadoras de serotonina que se localizan en los terminales serotoninérgicos a nivel presináptico y se ocupan de la internalización de parte de la serotonina liberada a la hendidura durante la transmisión sináptica a través de la proteína transportadora. Su disminución es indicativa de la pérdida de terminales y/o axones serotoninérgicos [228]. La paroxetina es un inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT y el proceso de fijación de [³H]-paroxetina es un método utilizado para detectar daño neurotóxico producido por MDMA [229].

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Tras la extracción del cerebro, los hipocampos fueron diseccionados en hielo picado y fueron rápidamente congelados en hielo seco para posteriormente almacenarse a -80 °C.

Los hipocampos se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP 61S, Sartorius AG, Alemania) y fueron homogeneizados en 2,5 ml de una solución Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM y KCl 5 mM pH 7,4 mediante un homogeneizador de varilla (Ultra-Turrax, Janke & Kunkel). Posteriormente se centrifugaron a 30.000 x g durante 10 minutos a 4 °C (Sorvall®RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Giral, EE.UU.). El sobrenadante fue desechado y este proceso de lavado se repitió 2 veces más. El sedimento final fue resuspendido en la misma solución Tris-HCl de lavado para obtener una concentración protéica de 10 mg/ml. La determinación de la concentración de proteína de las muestras se llevó a cabo mediante el método de Lowry (ver apartado 12.1).

Las muestras (800 μl de tejido) se hicieron reaccionar por triplicado, durante 90 minutos a temperatura ambiente, con [³H]-paroxetina 1 nM en ausencia y en presencia de 5-HT 10 μM para la determinación de la unión total e inespecífica, respectivamente. Posteriormente, se filtraron (Semiautomatic Cell Harvester, Skatron, Noruega) a través de filtros (Whatman GF/B,

Skatron) previamente humedecidos durante al menos 2 horas en una solución de polietilenimina 0,05 % para reducir la unión inespecífica del marcador. Los filtros secos fueron transferidos a viales con 2 ml de líquido de centelleo (Emulsifier-Safe, Packard Instrument BV, Holanda), manteniéndose toda la noche en oscuridad. La radioactividad fue medida por espectrofotometría de centelleo (WinSpectral 1414 Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer Life Sciences) utilizándose como estándares viales con 100 μl de [^3H]-paroxetina en 2 ml de líquido de centelleo. La unión específica se expresó como fmoles de [^3H]-paroxetina unida por mg de proteína total.

12. Determinación de la concentración proteica de las muestras

12.1 Método de Lowry

La determinación de la concentración de proteína se realizó siguiendo el método descrito por Lowry y cols. (1951) [230]. Para ello se diluyeron 20 μL de cada muestra en 170 μL de agua deionizada, incorporándose posteriormente 2 ml de una solución de sulfato de cobre al 0,04 %, tartato sódico al 0,7 %, SDS al 0,69 %, carbonato sódico al 1,96 % e hidróxido sódico 0,1 M. Pasados 10 minutos se añadieron 200 μL de reactivo de Folin diluido previamente al 50 % en agua desionizada. Este proceso se repitió por triplicado para cada muestra. Tras 55 minutos de reacción a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (DU 530, Beckman, EE.UU.). Los valores de absorbancia se interpolaron en una recta de calibrado realizada a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (0 - 200 $\mu\text{g/ml}$), ensayadas en el mismo momento y en las mismas condiciones que las muestras.

12.2 Modificación del método de Lowry

La determinación de la concentración de proteína de las muestras en tampón de homogenización conteniendo un 1 % de Nonidet P40 se realizó siguiendo el método DCTM Assay Protein (Bio-Rad). Para ello, se hicieron reaccionar 5 μL de una dilución 1:2 de la muestra homogeneizada con 25 μL de una mezcla en proporción 50:1 de solución alcalina de tartato de cobre (reactivo A) y solución surfactante (reactivo S), añadiéndose posteriormente 200 μL de reactivo de Folin diluido (reactivo B). Este proceso se realizó para cada muestra por triplicado. Tras 5 minutos, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm (ELX808 IU, Ultra

Microplate Reader; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.) de cada muestra y se interpoló este valor en una recta estándar realizada a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino, ensayadas en el mismo momento y en las mismas condiciones que las muestras.

13. Análisis estadístico de los datos

La evaluación estadística de los resultados se llevó a cabo utilizando un análisis de varianza de una vía seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls cuando se obtuvo un valor p significativo (GraphPad Prism®). En los casos en los que realizó la comparación entre dos grupos se llevó a cabo el análisis mediante t de Student.

Los estudios de temperatura rectal en los que existen más de un factor, el análisis de los resultados se llevó a cabo mediante ANOVA de dos vías, utilizando el test de Bonferroni en los casos en que la interacción resultó significativa.

RESULTADOS

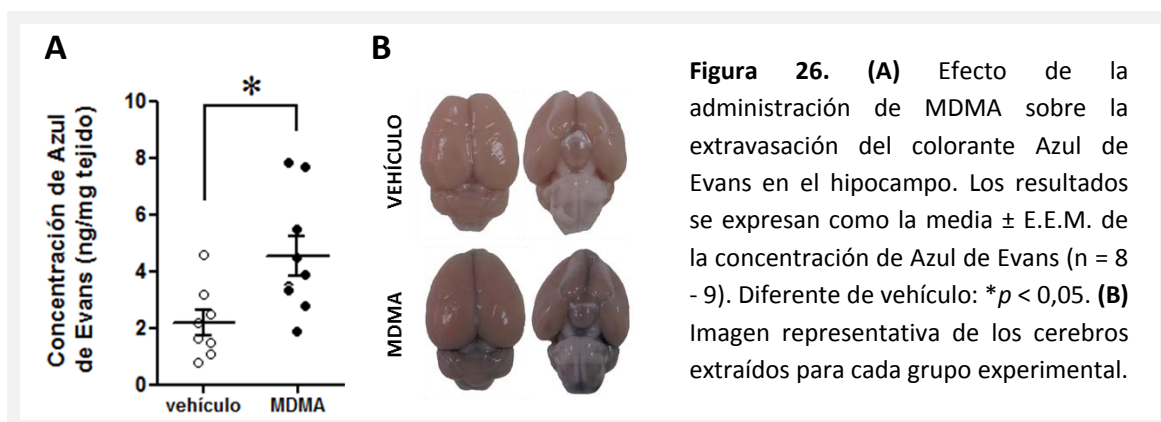
BLOQUE I: Efectos de la MDMA sobre la BHE

1. Efecto de la MDMA sobre la permeabilidad de la BHE

Las alteraciones en la permeabilidad de la BHE se pueden detectar mediante la utilización de trazadores que en condiciones fisiológicas no atraviesan la barrera. En el presente estudio se determinó la presencia en el hipocampo de dos trazadores: el colorante Azul de Evans como trazador exógeno y la inmunoglobulina-G endógena.

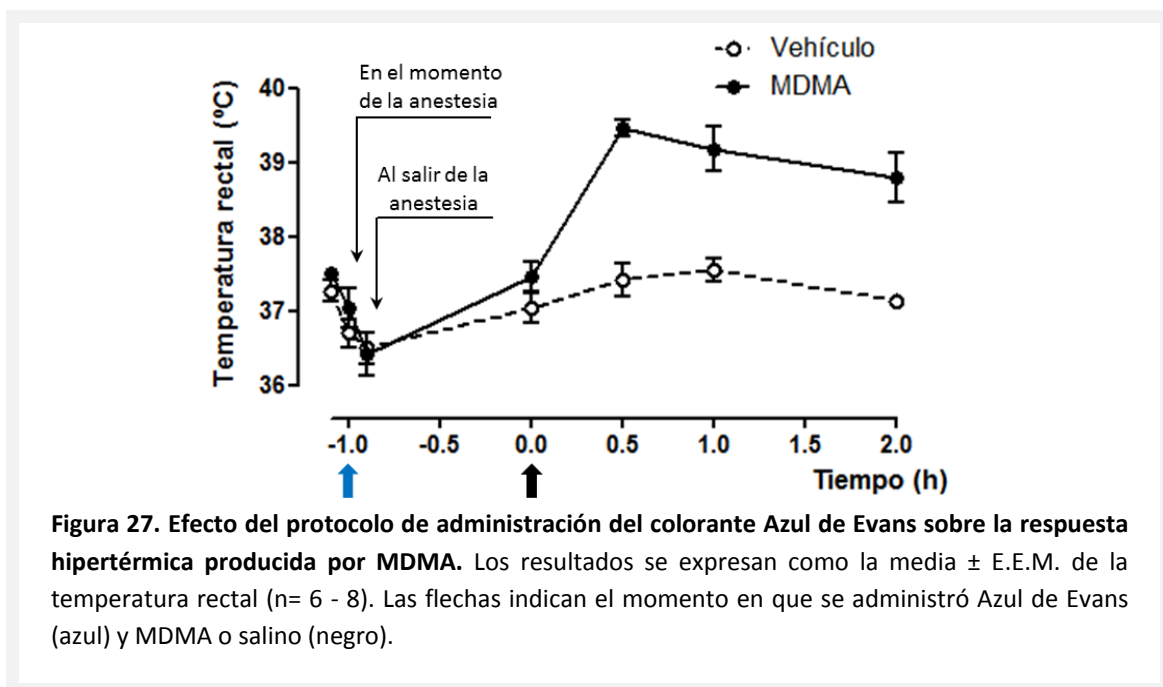
1.1 Extravasación del colorante Azul de Evans

El efecto de la MDMA sobre la permeabilidad de la BHE a corto plazo se determinó mediante la administración periférica del colorante Azul de Evans. Aunque este colorante tiene bajo peso molecular, una vez es administrado en la circulación sanguínea se une prácticamente en su totalidad a la albúmina sérica convirtiéndose en un trazador de 69 kDa. Por lo tanto, la presencia de este colorante en el SNC es indicativo de un incremento en la permeabilidad de la BHE que permite el acceso al parénquima de la albúmina a la cual se encuentra unido. La concentración del colorante detectada en el hipocampo 2 horas después de la administración de MDMA se comparó con la detectada para el grupo tratado con vehículo, obteniéndose un efecto estadísticamente significativo del tratamiento (figura 26, $t_{1,15} = 2,78$; $p = 0,01$). De forma que, los animales tratados con MDMA presentan mayores niveles de Azul de Evans en el hipocampo respecto a los tratados con vehículo ($4,54 \pm 0,70$ ng/mg tejido vs $2,17 \pm 0,44$ ng/mg tejido, respectivamente).



Puesto que la administración del Azul de Evans implicó la sedación de los animales mediante la administración de isoflurano por vía inhalatoria, y teniendo en cuenta que la

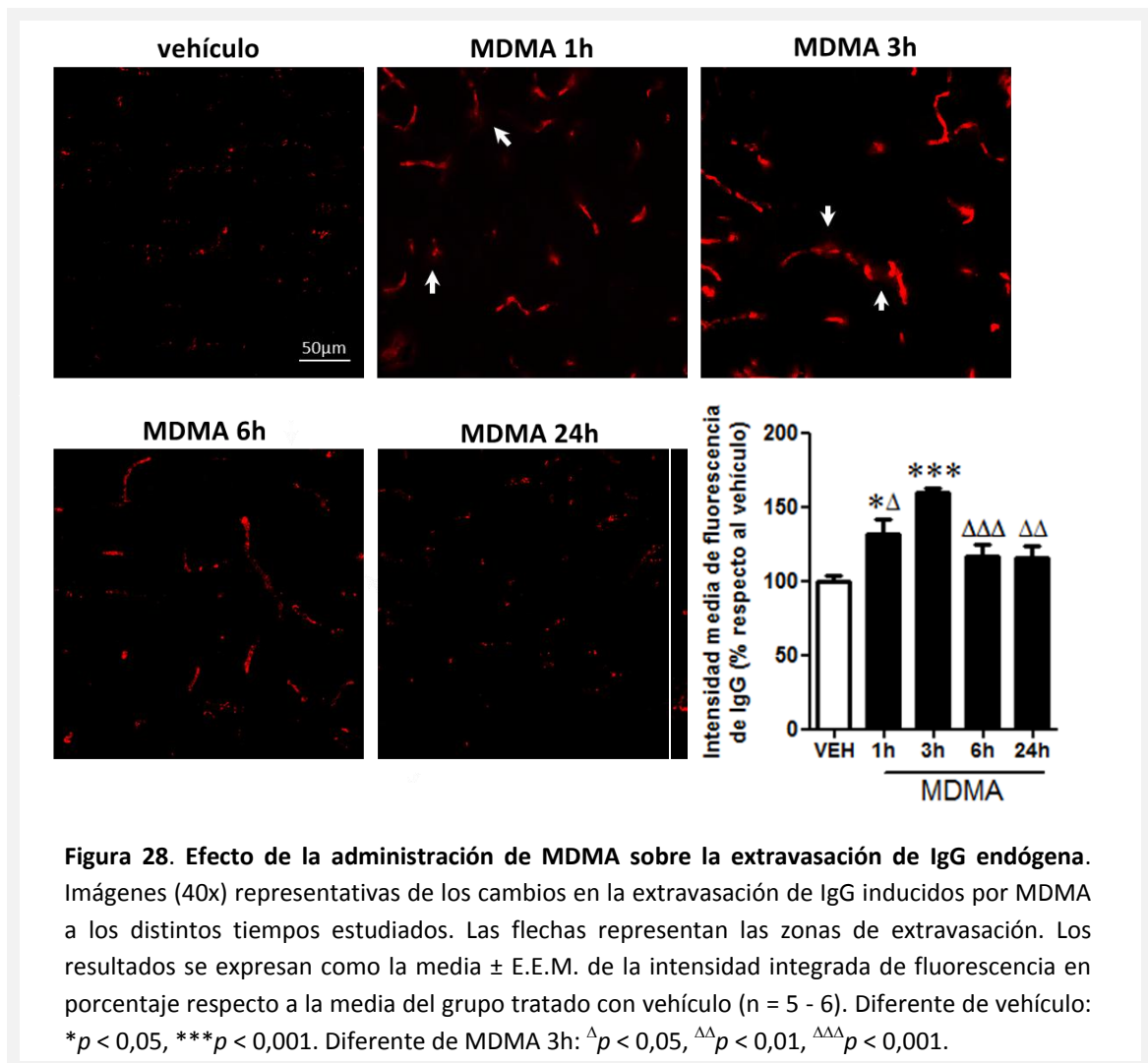
temperatura es uno de los factores que modulan la permeabilidad de la BHE, se analizó la respuesta hipertérmica inducida por MDMA tras la leve hipotermia transitoria que mostraron las ratas durante la administración del colorante (figura 27). La administración de MDMA produce una respuesta hipertérmica a corto plazo ampliamente descrita en la bibliografía. Los datos de temperatura rectal se analizaron mediante ANOVA de dos vías considerando los factores: tratamiento (vehículo o MDMA) y tiempo. La estadística revela que tanto el factor tratamiento ($F_{1,81} = 57,75; p < 0,0001$) como el factor tiempo ($F_{6,81} = 23,74; p < 0,0001$) tienen efecto por sí mismos, además de existir interacción entre ambos ($F_{6,81} = 7,59; p < 0,0001$). Según el *post-test* de Bonferroni la administración de MDMA induce un incremento de aproximadamente 2 grados en la temperatura rectal 0,5, 1 y 2 horas después de su administración en comparación con el grupo tratado con vehículo, con un valor de $p > 0,001$.



1.2 Efecto sobre la extravasación de IgG endógena

Otra valoración del efecto de MDMA sobre la permeabilidad de la BHE que se llevó a cabo fue la inmunodetección hipocampal de IgG endógena. En condiciones fisiológicas, esta inmunoglobulina está ausente en el tejido nervioso; sin embargo, ante una alteración de la BHE que incremente su permeabilidad puede ocurrir la extravasación de la IgG desde el torrente sanguíneo. Los datos de intensidad de inmunofluorescencia obtenidos para la expresión de IgG endógena en el hipocampo de la rata se analizaron mediante ANOVA de una vía, obteniéndose

un efecto estadísticamente significativo como consecuencia del tratamiento con MDMA (figura 28; $F_{4,23} = 9,62$, $p = 0,0001$). El test de comparación múltiple Newman-Keuls revela un incremento en la expresión hipocámpal de IgG 1 y 3 horas después de la administración de MDMA. El máximo de expresión se aprecia a las 3 horas, siendo el aumento del 60% respecto al grupo tratado con vehículo ($159,6 \pm 3,1$ % vs $100,0 \pm 3,6$ %) y significativamente mayor que el observado tras 1 hora (32 %, $131,9 \pm 10,2$ % vs $100,0 \pm 3,6$ %). Este efecto ya no se aprecia pasadas 6 desde el momento de la administración.

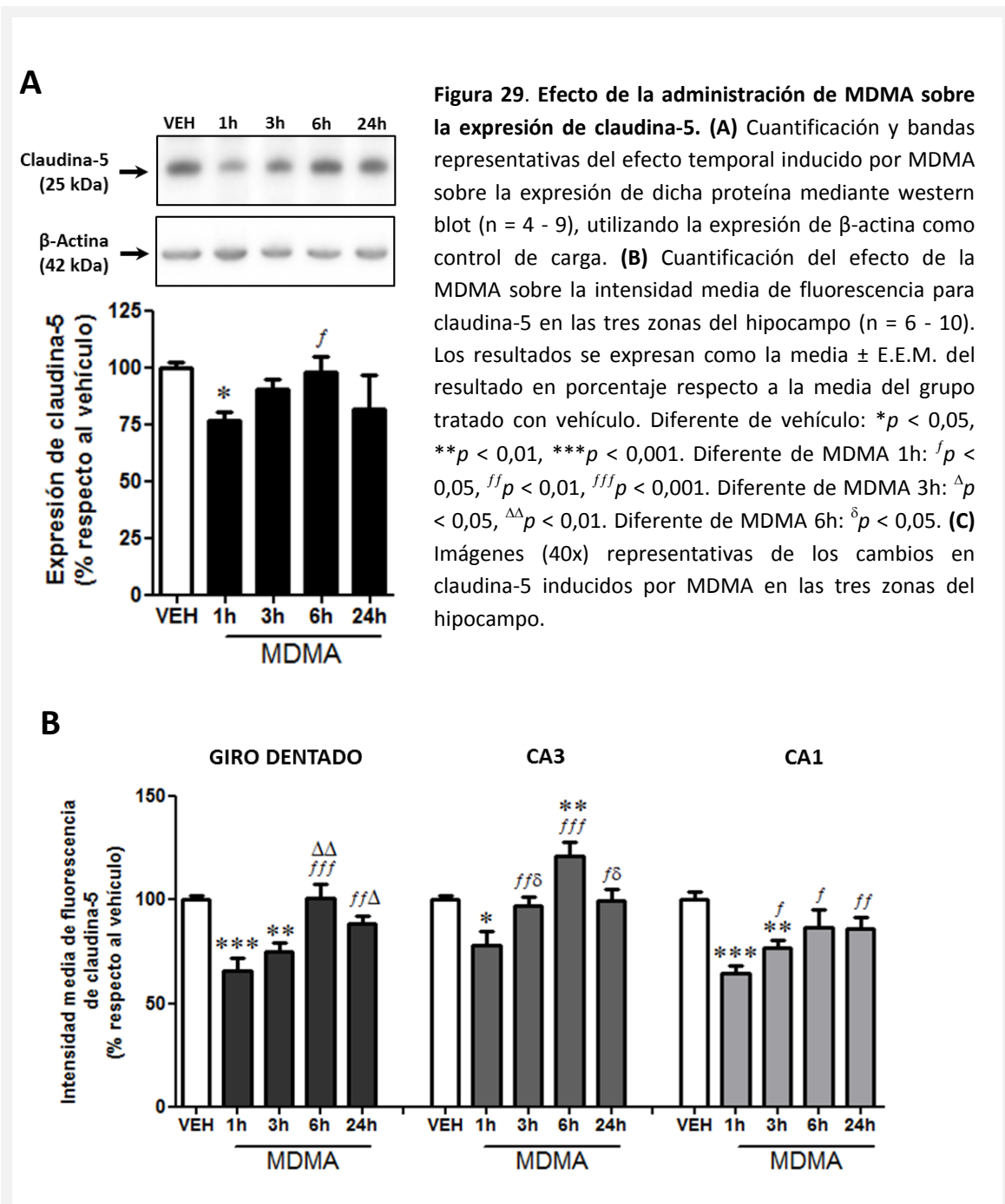


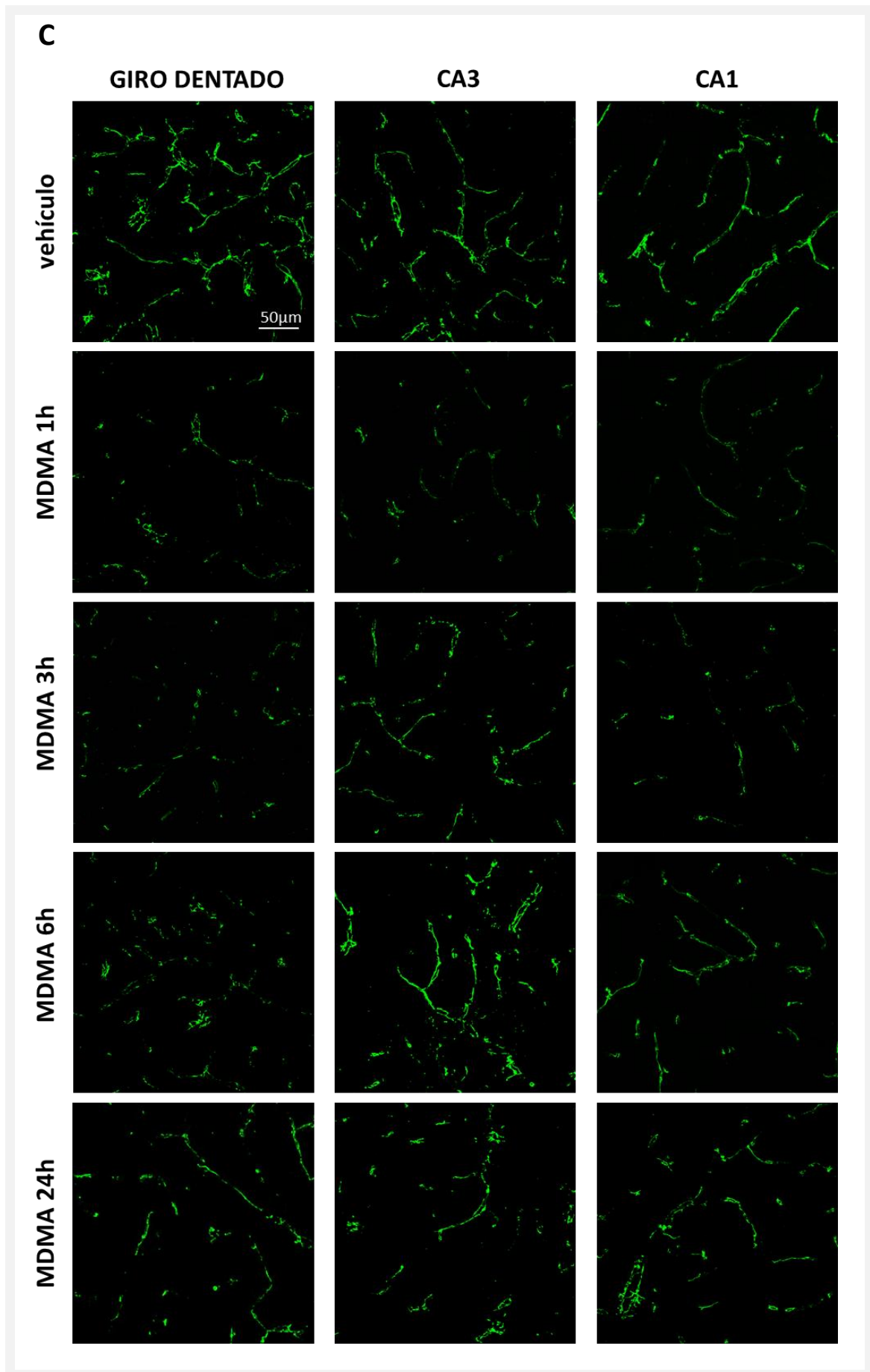
2. Efecto de la MDMA sobre la integridad de la BHE

La integridad de la BHE se estudió mediante la determinación de la expresión de algunas proteínas esenciales en el mantenimiento de la unión neurovascular: claudina-5 de las uniones estrechas y las proteínas laminina y colágeno-IV, de la lámina basal.

2.1 Expresión de claudina-5

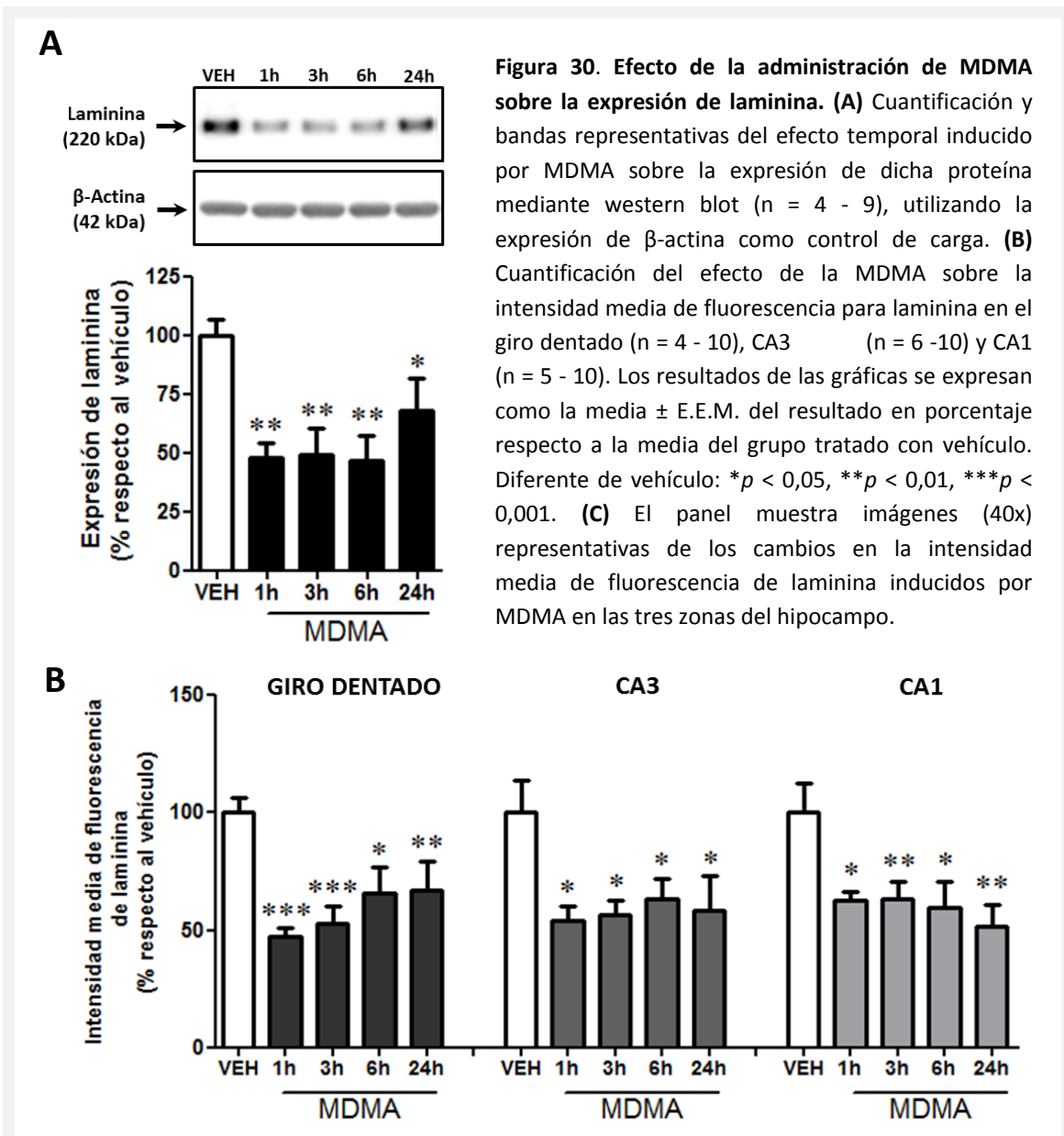
La claudina-5 es una proteína esencial en la formación de las uniones estrechas y en la restricción del transporte paracelular de sustancias y de agua desde la sangre al tejido nervioso. La disminución en su expresión se relaciona con la disociación de las uniones estrechas en relación al incremento de la permeabilidad. Para determinar el efecto de la MDMA sobre la integridad de las uniones estrechas endoteliales se analizó la expresión de claudina-5 tanto por western blot como por inmunofluorescencia.

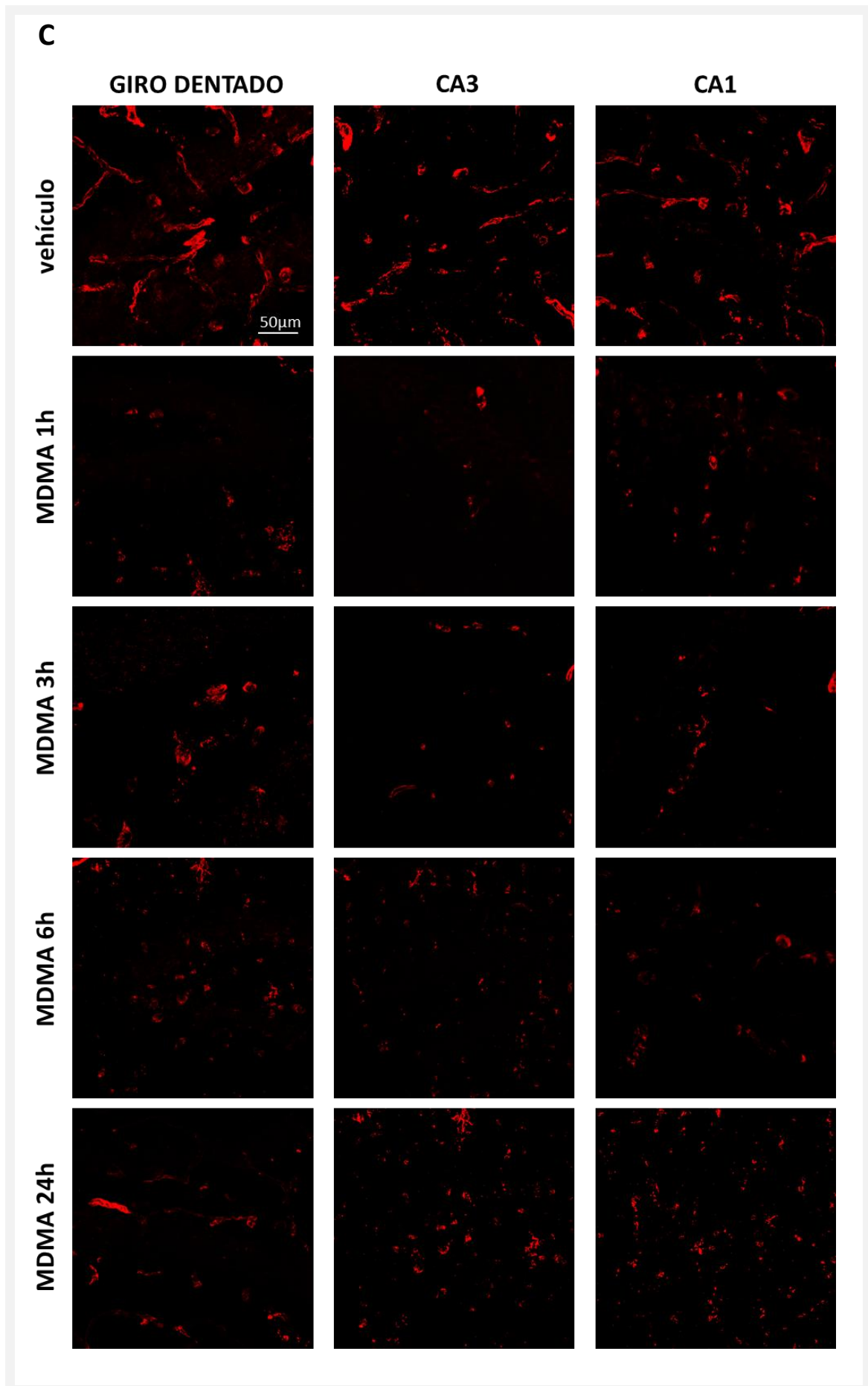




El ANOVA de una vía para los datos de expresión proteica mediante western blot determina la existencia de un efecto del tratamiento (figura 29, A $F_{4,30} = 3,21$, $p = 0,03$). El análisis *post-hoc* reveló que la MDMA induce una disminución del 23,6 % en la expresión de claudina-5, 1 hora después de su administración. Los niveles están recuperados a las 6 horas.

Las imágenes de inmunohistoquímica para claudina-5 (figura 29, C) muestran una expresión homogénea en las tres zonas del hipocampo analizadas. El ANOVA de una vía aplicado a los datos de intensidad media de fluorescencia analizados para cada zona indica que la administración de MDMA afecta de forma estadísticamente significativa a la expresión de claudina-5 tanto en el giro dentado ($F_{4,36} = 10,44$; $p < 0,0001$), como en CA3 ($F_{4,37} = 7,80$; $p < 0,0001$) y en CA1 ($F_{4,37} = 9,35$; $p < 0,0001$).

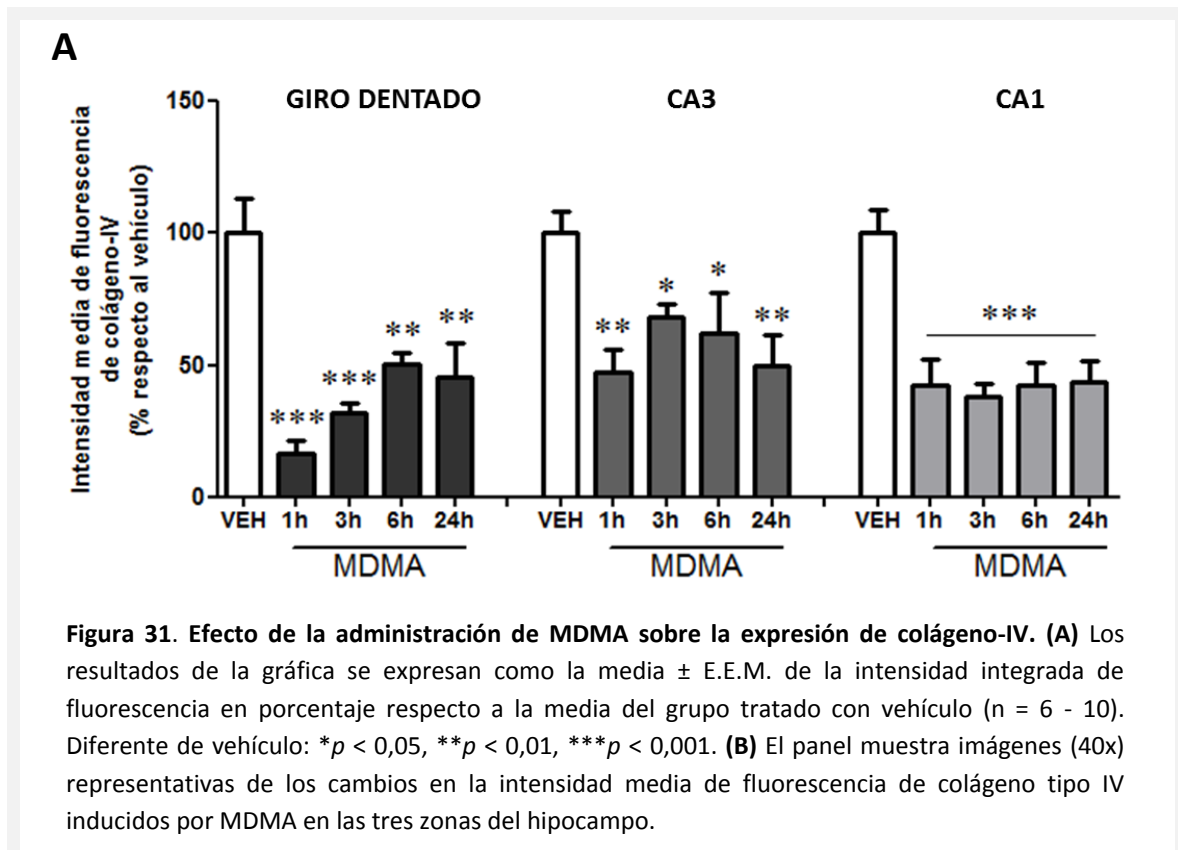


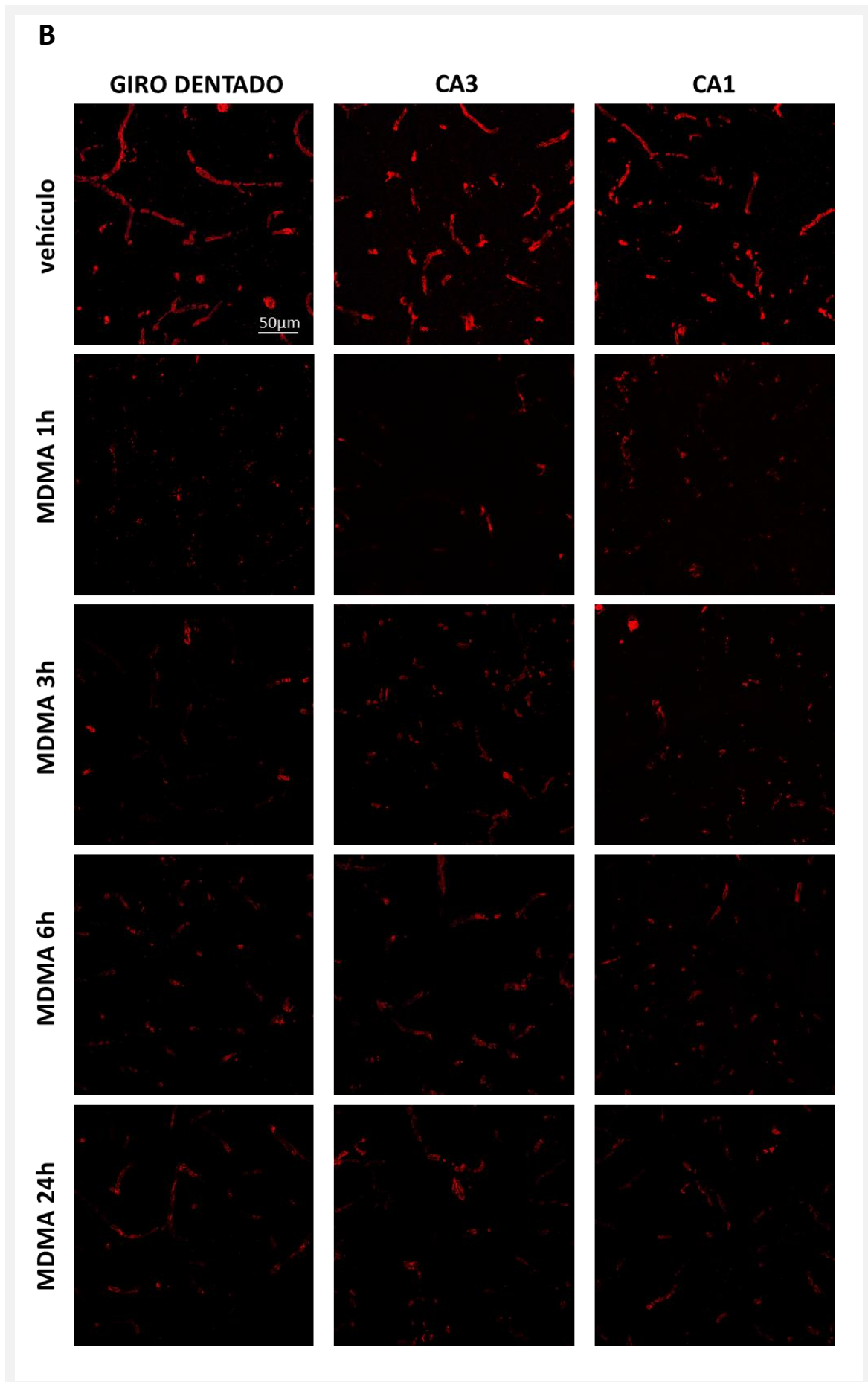


El análisis de comparación múltiple Newman-Keuls revela la disminución de la expresión de la claudina-5 una hora después de la administración de MDMA en giro dentado (34 %) y CA1 (35,5 %), que se mantiene hasta 3 horas. Mientras que en CA3 la disminución que se aprecia a la hora es menor que en las otras áreas (22 %), estando además la expresión incrementada en un 21 % 6 horas después de la administración de MDMA.

2.2 Expresión de proteínas de la lámina basal

La disminución de los componentes de la lámina basal está asociada a alteraciones en la integridad de la BHE en algunos modelos. Para determinar el efecto de la MDMA sobre la lámina basal se analizó la expresión de laminina y de colágeno-IV, las dos proteínas principales que la constituyen, a distintos tiempos desde la administración de la droga. La administración de MDMA afecta a los niveles de expresión proteica de laminina, según el análisis estadístico de los datos con ANOVA de una vía (figura 30 A, $F_{4,21} = 6,15$; $p = 0,002$). Este efecto consiste, según el post-test Newman-Keuls, en una disminución de un 50% en la expresión 1, 3 y 6 horas después de la administración de MDMA, al comparar los datos con los obtenidos para el grupo tratado con vehículo. Los niveles de expresión se mantienen disminuidos en un 32 % respecto al control a las 24 horas.





Para localizar la disminución de la expresión de laminina inducida por MDMA en de las distintas zonas del hipocampo, se estudió su expresión mediante inmunohistoquímica (figura 30 B y C). El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía determinó un efecto estadísticamente significativo del tratamiento con MDMA sobre la intensidad media de fluorescencia detectada para laminina en el giro dentado ($F_{4,38} = 7,61$; $p = 0,0001$), en CA3 ($F_{4,37} = 3,23$; $p = 0,023$) y en CA1 ($F_{4,34} = 4,06$; $p = 0,009$). El análisis de comparación múltiple Newman-Keuls aplicado para cada una de las zonas hipocampales determinó que la MDMA induce una disminución en la intensidad media de fluorescencia para laminina a todos los tiempos estudiados, en las tres zonas analizadas. En el giro dentado, la señal de laminina está disminuía al 50 % tras 1 y 3 horas, siendo este efecto algo menor (33 %) tras 6 y 24 horas. En CA3 la disminución en la intensidad media de fluorescencia 1, 3 y 24 horas después de la administración de MDMA es del 46 - 43 %, mientras que 6 horas después es del 37 %. En CA1 la disminución para todos los tiempos analizados es del 37 - 45 %.

El efecto de la administración de MDMA sobre la expresión perivascular de colágeno-IV se analizó mediante inmunohistoquímica en las distintas zonas del hipocampo (figura 31). El análisis estadístico de la intensidad media de fluorescencia con ANOVA de una vía determinó un efecto estadísticamente significativo del tratamiento con MDMA sobre la intensidad media de fluorescencia para colágeno-IV en el giro dentado ($F_{4,20} = 10,78$; $p < 0,0001$), en CA3 ($F_{4,19} = 4,79$; $p = 0,007$) y en CA1 ($F_{4,18} = 9,53$; $p = 0,0003$). El análisis de comparación múltiple Newman-Keuls determinó que la MDMA induce una disminución en la expresión de la proteína a todos los tiempos estudiados, en las tres zonas analizadas. El mayor porcentaje de disminución se produce 1 hora (83 %) después de la administración de MDMA en el giro dentado, aunque a 3 (68 %), 6 (49 %) y 24 (65 %) horas la intensidad media de fluorescencia respecto al vehículo se mantiene notablemente reducida. En CA3 la disminución es menor que en el giro dentado, siendo del 52 - 50 % 1 y 24 horas después y del 32 - 38 % 3 y 6 horas después. En CA1 la intensidad media de fluorescencia para el colágeno tipo IV está reducida en un 58% a lo largo de todos los tiempos analizados.

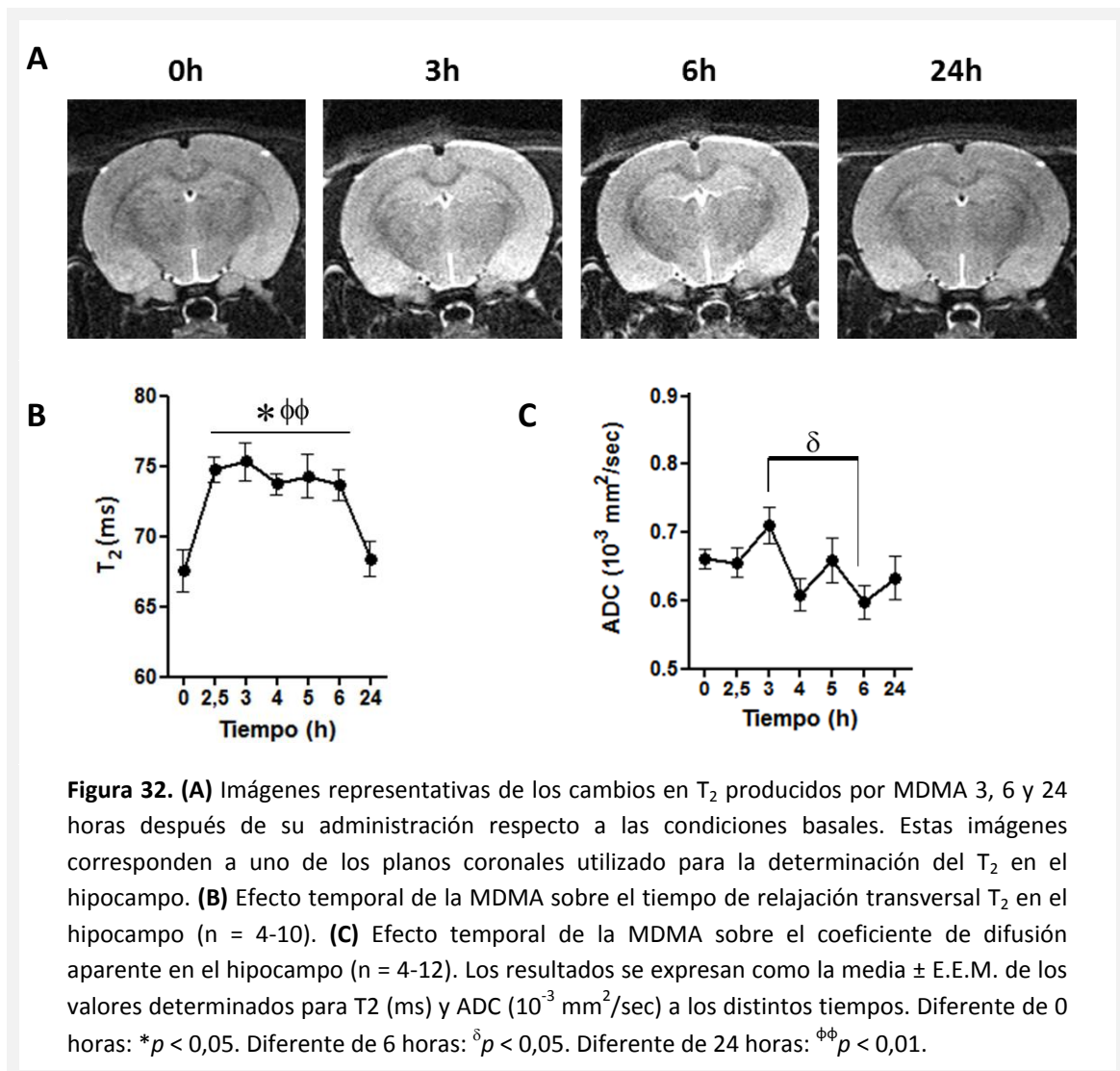
3. Efecto de la MDMA sobre la generación de edema

3.1 Estudios de resonancia magnética

La alteración de la BHE puede desencadenar el desarrollo de edema vasogénico. Tras observar que, tanto la permeabilidad como la integridad de la BHE están alteradas a tiempos

cortos por la administración de una única dosis de MDMA, se estudió el efecto de dicha droga sobre la formación de edema en el hipocampo de la rata. Para determinar la generación de edema difuso tras la administración de MDMA se analizaron los valores del tiempo de relajación transversal T_2 en 3 planos del hipocampo. El ANOVA de una vía para la media de los datos analizados indica que la MDMA induce un efecto significativo sobre los valores de T_2 (figura 32 B, $F_{6,27} = 6,07$; $p = 0,0004$). El análisis *post-hoc* Newman-Keuls determina un incremento del parámetro T_2 de un 10% a todos los tiempos estudiados, excepto a las 24 horas que los niveles basales ya están restablecidos.

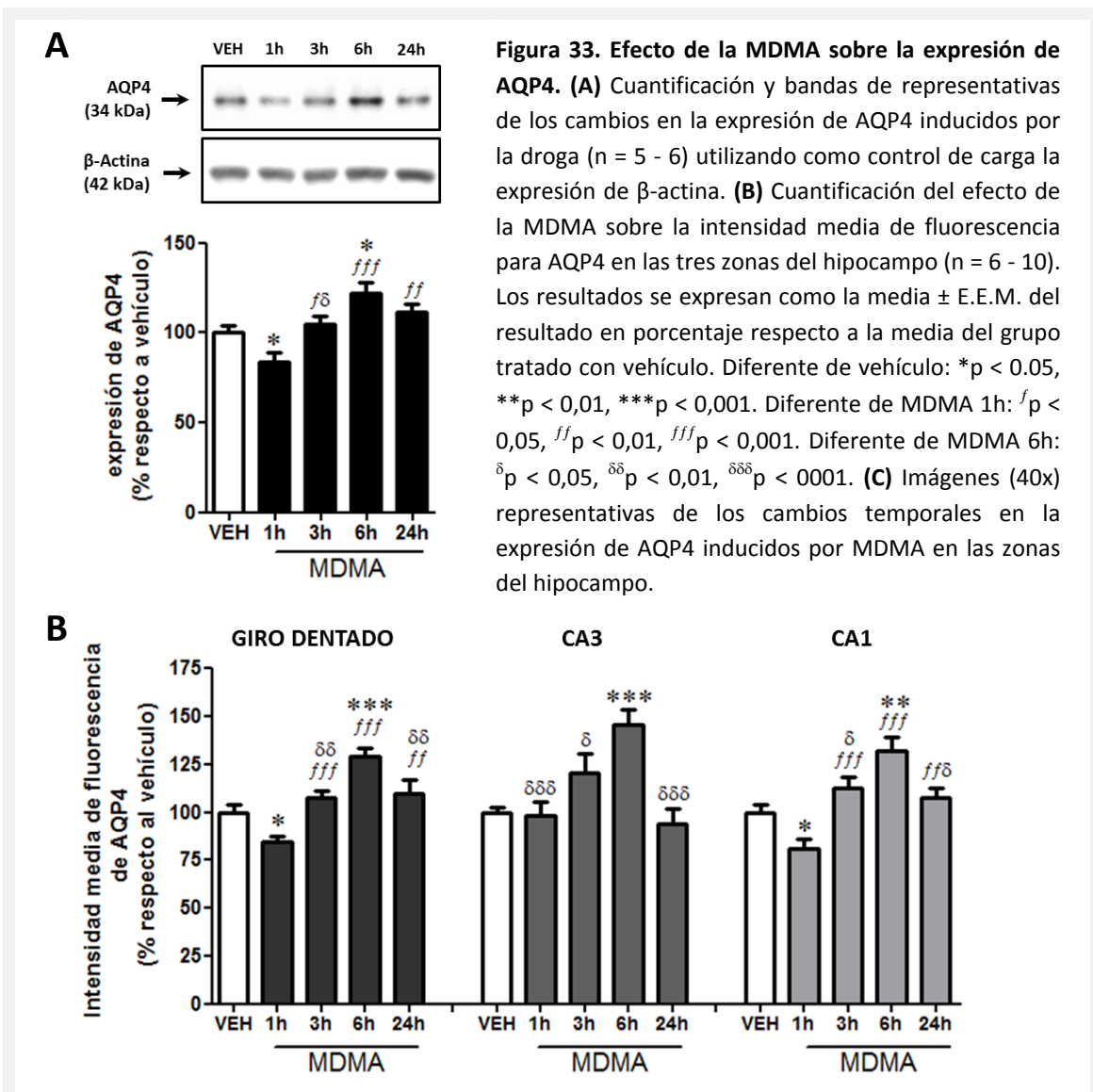
Mediante imágenes de difusión se calculó el coeficiente de difusión aparente tras la administración de MDMA respecto a las condiciones basales. El ANOVA de una vía para los valores de ADC obtenidos a los distintos tiempos desde la administración de la droga

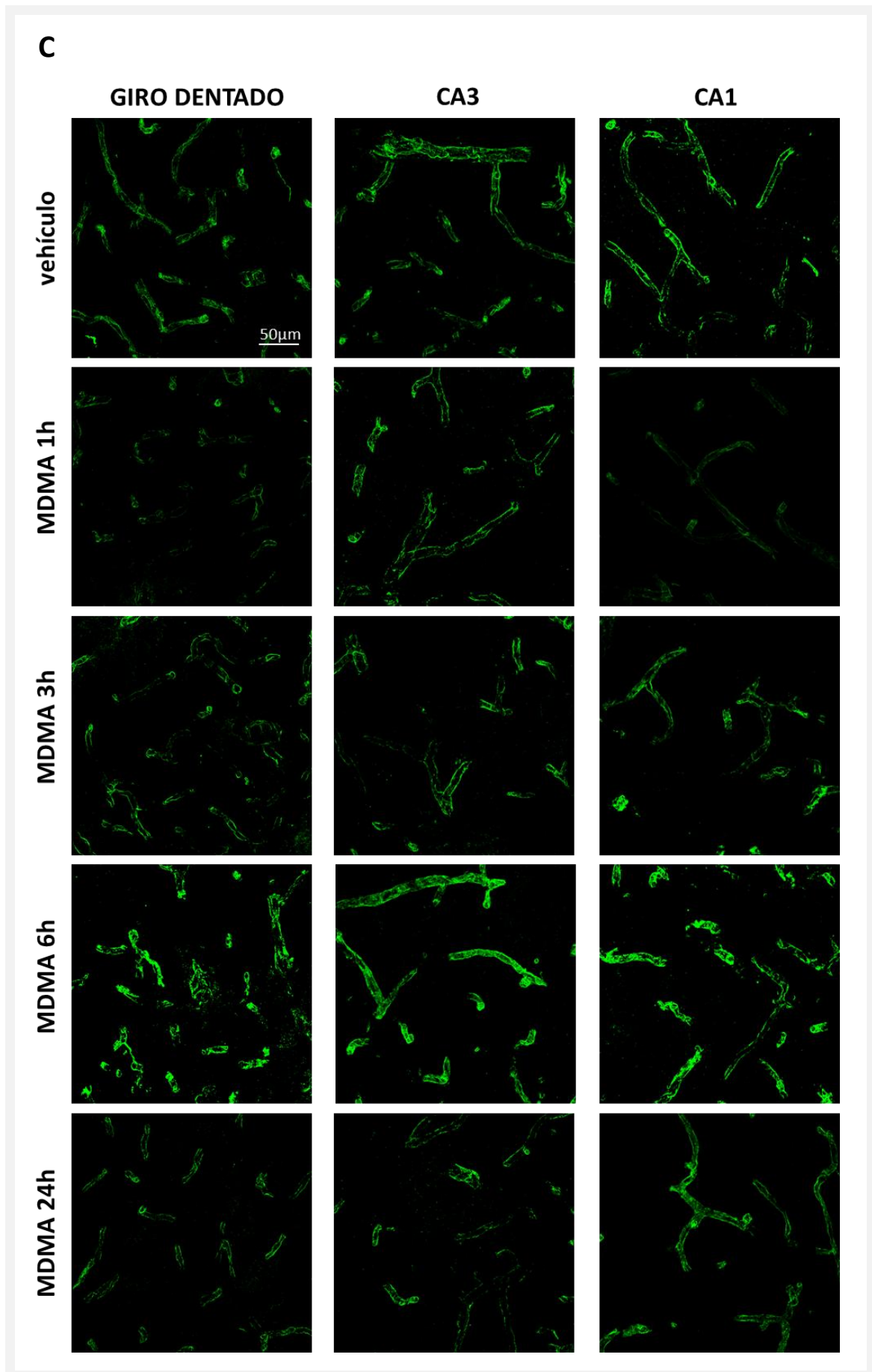


determina un efecto significativo del tratamiento (figura 32, C; $F_{6,45} = 2,38$; $p = 0,04$). El análisis de comparación múltiple de Newman-Keuls únicamente revela diferencias entre 3 y 6 horas ($0,71 \pm 0,03 \cdot 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$ vs. $0,60 \pm 0,02 \cdot 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$), momentos en los que se alcanzan los valores máximo y mínimo de ADC, respecto a las condiciones basales (0h). La comparación entre los valores de ADC a las 0 horas y a las 6 horas ($0,67 \pm 0,01 \cdot 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$ vs. $0,60 \pm 0,02 \cdot 10^{-3} \text{mm}^2/\text{sec}$) mediante el test no paramétrico t -student ($t_{1,18} = 2,42$; $p = 0,0266$) revela la disminución estadísticamente significativa del ADC tras la administración de MDMA.

3.2 Efecto de la MDMA sobre la expresión de AQP4

La expresión del canal de agua, AQP4 está relacionada tanto con la generación, como con la resolución del edema cerebral.





El efecto de la administración de MDMA sobre los niveles de expresión proteica de AQP4 se determinó mediante western blot (figura 33, A) a distintos tiempos tras la administración de la droga. El análisis con ANOVA de una vía indica la existencia de un efecto estadísticamente significativo de la MDMA sobre la expresión de AQP4 ($F_{4,22} = 8,96$; $p = 0,0002$). El test de comparación múltiple Newman-Keuls indica que los niveles de expresión proteica para AQP4 respecto al grupo control se encuentran disminuidos (16 %) una hora después de la administración de la droga e incrementados (22 %) 6 horas después, estando reestablecidos a las 24 horas.

Mediante inmunohistoquímica se determinó la expresión perivascular de AQP4 (figura 33, B). En algunos modelos en los que ocurre la pérdida de la integridad de la BHE, la AQP4 puede encontrarse reorganizada hacia el citoplasma del astrocito. Tras la administración de MDMA, la localización del canal no varía manteniéndose restringida a los pies astrocitarios. El ANOVA de una vía aplicado sobre los datos de cada zona del hipocampo, indica la existencia de un efecto significativo de la MDMA sobre la expresión de AQP4 en giro dentado ($F_{4,37} = 12,27$; $p < 0,0001$), CA3 ($F_{4,38} = 6,88$; $p = 0,0003$) y CA1 ($F_{4,36} = 10,78$, $p < 0,0001$). La administración de MDMA induce 1 hora después de su administración una disminución de AQP4 en el giro dentado y CA1, pero no en CA3. Además, produce un incremento de la expresión del canal tras 6 horas en las tres áreas del hipocampo. Después de 24 horas desde la administración de la droga, los niveles de AQP4 están reestablecidos en todas las zonas.

4. Efecto de la MDMA sobre las proteasas que regulan la integridad de la BHE

4.1 Actividad y expresión de metaloproteinasas de matriz

Las principales proteasas asociadas con la degradación de proteínas de la lámina basal y las uniones estrechas y con el incremento en la permeabilidad de la BHE son las MMPs. La zimografía en gel de tejido hipocampal revela bandas de degradación de sustrato específico a 82 kDa, 62 kDa y 45 kDa correspondientes a las formas activas de MMP-9, MMP-2 y MMP-3 respectivamente. Los resultados de la cuantificación obtenida mediante densitometría se analizaron con ANOVA de una vía. El análisis estadístico para la cuantificación de las bandas activas de MMP-9 determinó el efecto significativo de la MDMA sobre la actividad gelatinasa (figura 34 A, $F_{4,50} = 5,19$; $p = 0,001$). El análisis *post-hoc* indicó que la MDMA produce un

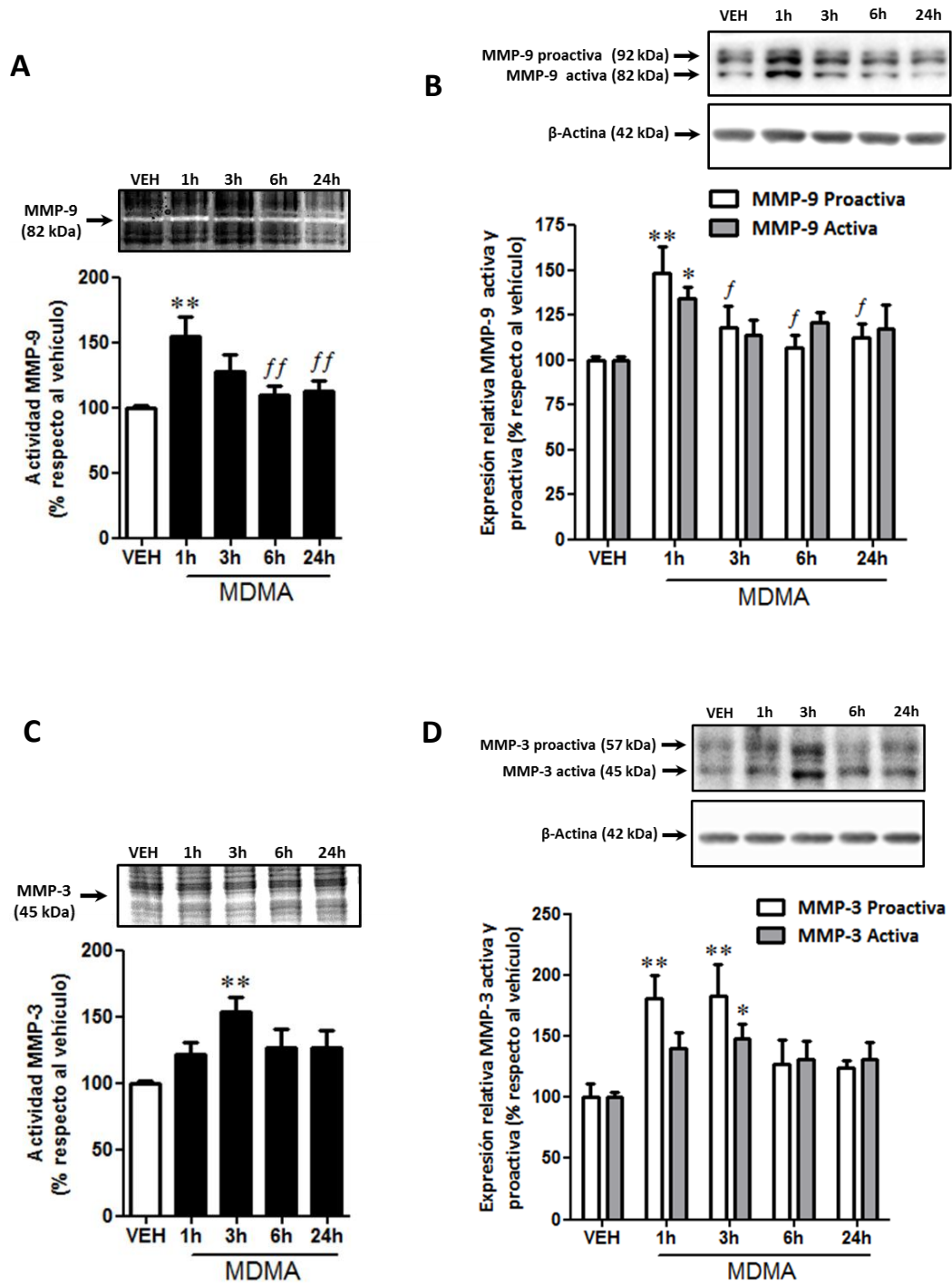
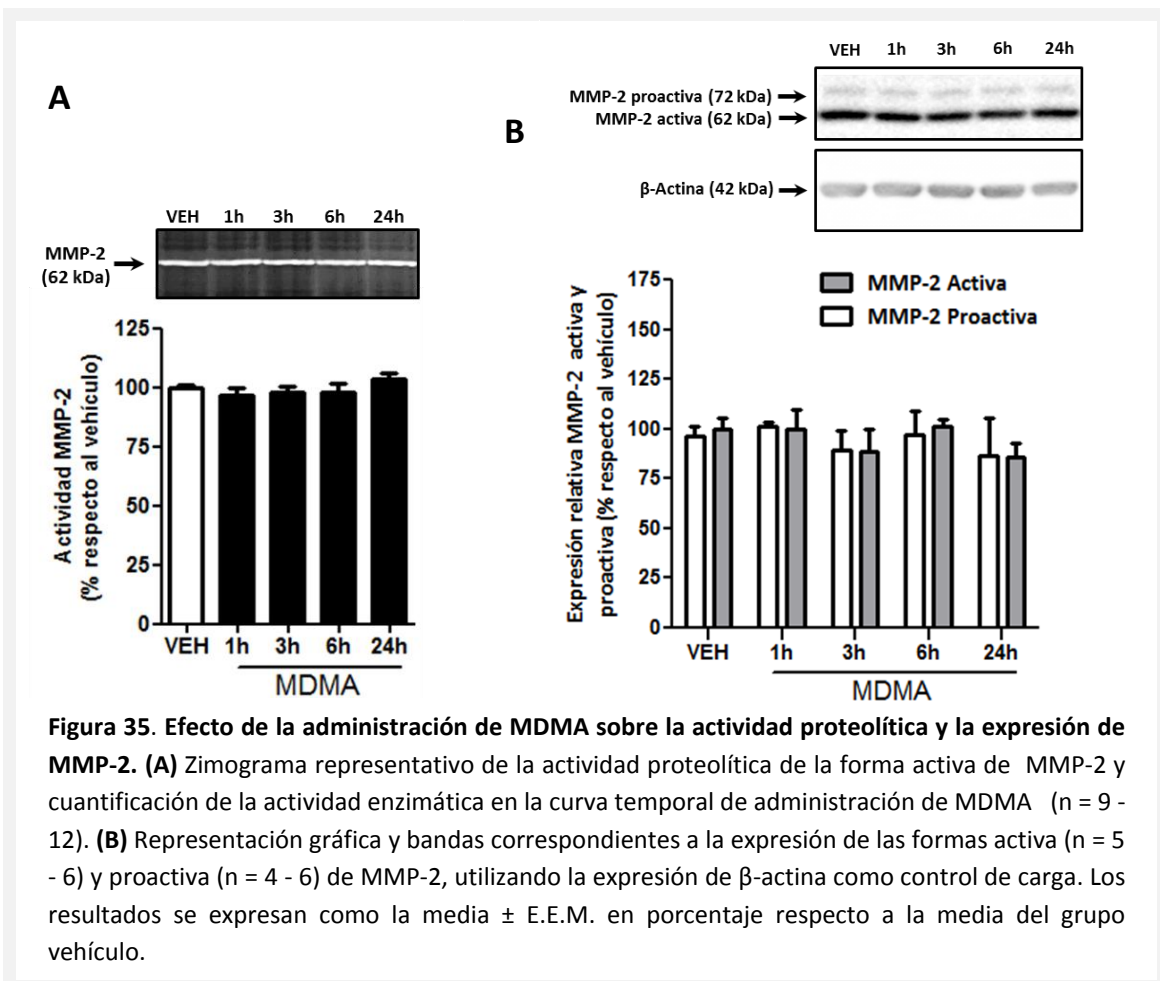


Figura 34. Efecto de la administración de MDMA sobre la actividad proteolítica y la expresión proteica de MMP-9 y MMP-3. Cuantificación y zimograma representativo del efecto temporal de la MDMA sobre la actividad proteolítica de la forma activa de MMP-9 (n = 10 - 12) (A) y de MMP-3 (n = 5 - 6) (C). Cuantificación y bandas representativas correspondientes al efecto de MDMA sobre la expresión de las formas activa (n = 6 - 10) y proactiva (n = 11 - 12) de MMP-9 (B) y de las formas activa (n = 5 - 9) y proactiva (n = 5 - 10) de MMP-3 (D). Los resultados se expresan como la media ± E.E.M. en porcentaje respecto a la media del grupo vehículo. Diferente de vehículo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Diferente de MDMA 1h: $f p < 0,05$, $ff p < 0,01$

incremento en la actividad MMP-9 1 hora después de su administración (55 %). Este incremento está completamente reestablecido tras 6 horas. Respecto a MMP-3, el análisis de la varianza mostró un efecto estadísticamente significativo de la administración de MDMA sobre la actividad proteolítica de la forma activa de MMP-3 (figura 34, C; $F_{4,21} = 3,50$; $p = 0,02$). El análisis de comparación múltiple Newman-Keuls mostró un incremento de la actividad degradativa de la forma activa de MMP-3 (53,4 %) 3h después de la administración de MDMA. Sin embargo, no se detectaron diferencias para la actividad gelatinasa MMP-2 a ninguno de los tiempos estudiados (figura 35, A; $F_{4,50} = 0,87$; $p = 0,49$).

Para analizar la posibilidad de que el incremento observado en la actividad de las MMPs fuese debido a un aumento de los niveles de proteína, se llevó a cabo el estudio de la expresión mediante western blot. Se detectaron dos bandas de expresión a 92 y 82 kDa para las formas proactiva y activa de MMP-9, respectivamente. El análisis cuantitativo de cada una de ellas mediante ANOVA de una vía revela un efecto significativo del tratamiento sobre la expresión de las formas proactiva (figura 34, B; $F_{4,54} = 3,60$; $p = 0,01$) y activa (figura 36 B, $F_{4,37} = 2,73$; $p = 0,04$) de MMP-9.



El análisis de Newman-Keuls indica un incremento tanto en la expresión de la proforma (48 %) como de la forma activa de MMP-9 (31 %) 1 hora después de la administración de MDMA, encontrándose los niveles de expresión reestablecidos 3 horas después. De igual modo, la administración de MDMA afecta de forma significativa a la expresión tanto de la forma activa ($F_{4,25} = 3,64$; $p = 0,02$) como proactiva ($F_{4,28} = 5,11$; $p = 0,003$) de MMP-3 (figura 34, D). En este caso, se detecta el incremento de la expresión de proMMP-3 1 y 3 horas después de la administración de MDMA y de la forma activa únicamente a las 3 horas.

Sin embargo, la administración de MDMA no produce cambios en la expresión proteica de las formas activa ($F_{4,23} = 0,87$; $p = 0,50$) y proactiva ($F_{4,18} = 0,18$; $p = 0,95$) de MMP-2 (figura 35, B).

4.2 Actividad y expresión de tPA. Expresión de plasminógeno y de LRP-1

Las proteínas de la lámina basal y las uniones estrechas también pueden ser degradadas por otras proteasas como la plasmina, generada por la acción de tPA, o el propio tPA. La zimografía en gel revela bandas de degradación de sustrato específico a 67 kDa correspondientes a tPA. El análisis de los datos mediante ANOVA de una vía indica un efecto estadísticamente significativo del tratamiento sobre la actividad proteolítica de tPA (figura 36, A; $F_{4,20} = 5,09$; $p < 0,005$). El análisis de Newman-Keuls determina un incremento de la actividad de tPA (40 %) 3 horas después de haber sido administrada la MDMA, que se reestablece por completo a las 24 horas. La expresión de tPA también está afectada por el tratamiento con MDMA (figura 36, B; $F_{4,22} = 5,22$; $p = 0,004$), encontrándose incrementada 1 (32,7 %), 3 (52,7 %) y 6 (37 %) horas después, en comparación al grupo tratado únicamente con vehículo. Puesto que la MDMA incrementa la actividad y expresión de tPA, se analizó la expresión de su principal sustrato, el plasminógeno, obteniéndose según el ANOVA de una vía un efecto significativo del tratamiento (figura 36, C; $F_{4,25} = 6,57$; $p < 0,0009$). El análisis Newman-Keuls determina una disminución del 18,2 % 3 horas después de la administración de MDMA, reestableciéndose los niveles a las 6 horas. En algunos modelos de alteración de la BHE tPA induce la sobreexpresión de MMP-9 mediante su señalización a través del receptor LRP-1. Para estudiar un posible efecto de la MDMA sobre esta vía de señalización se analizaron los niveles de expresión del receptor LRP-1 determinándose un efecto del tratamiento según el ANOVA de una vía (figura 36, D; $F_{4,24} = 4,09$; $p = 0,01$). El post-test Newman-Keuls revela el incremento en la expresión del receptor 1 hora (12,4 %) después de la administración de MDMA, reestableciéndose los niveles a las 3 horas de la inyección de la droga.

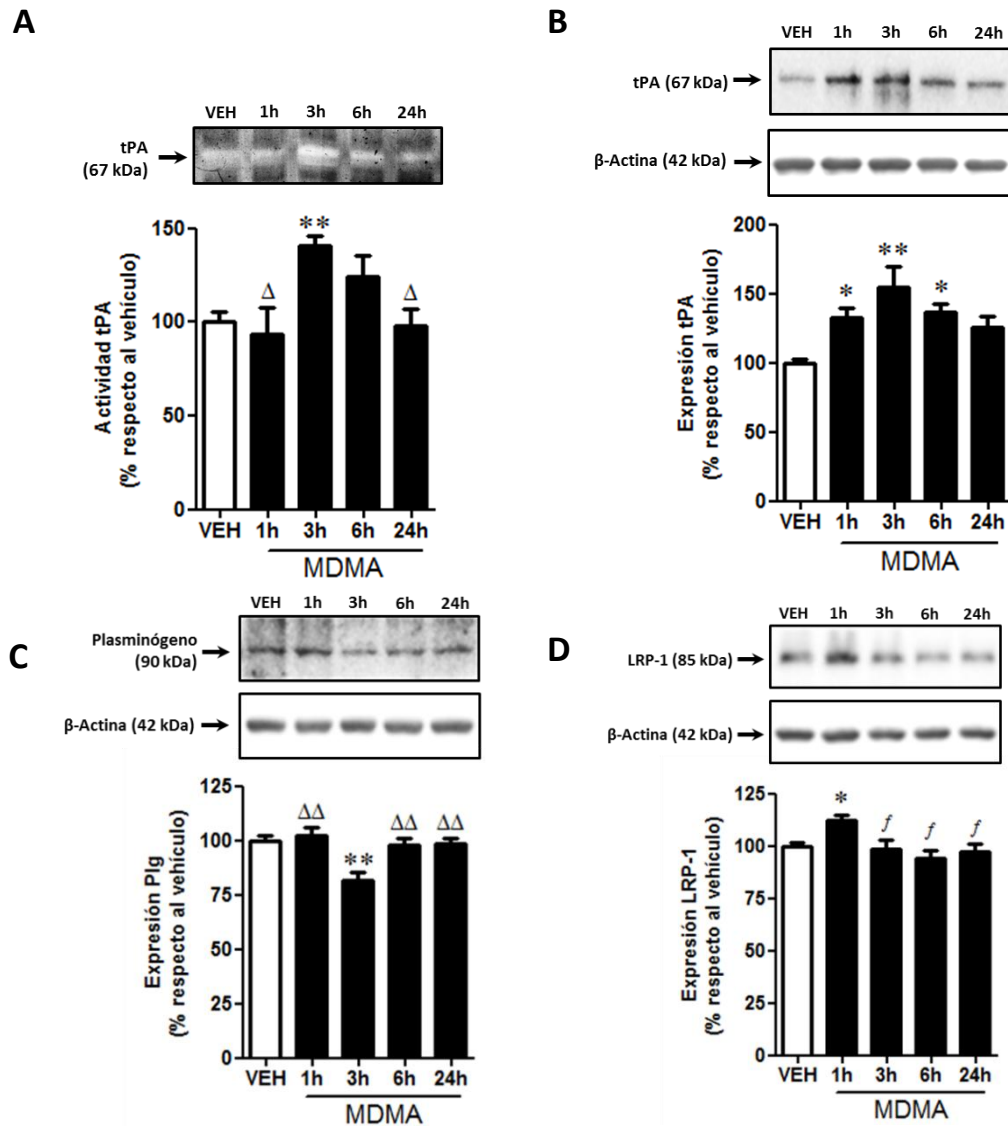
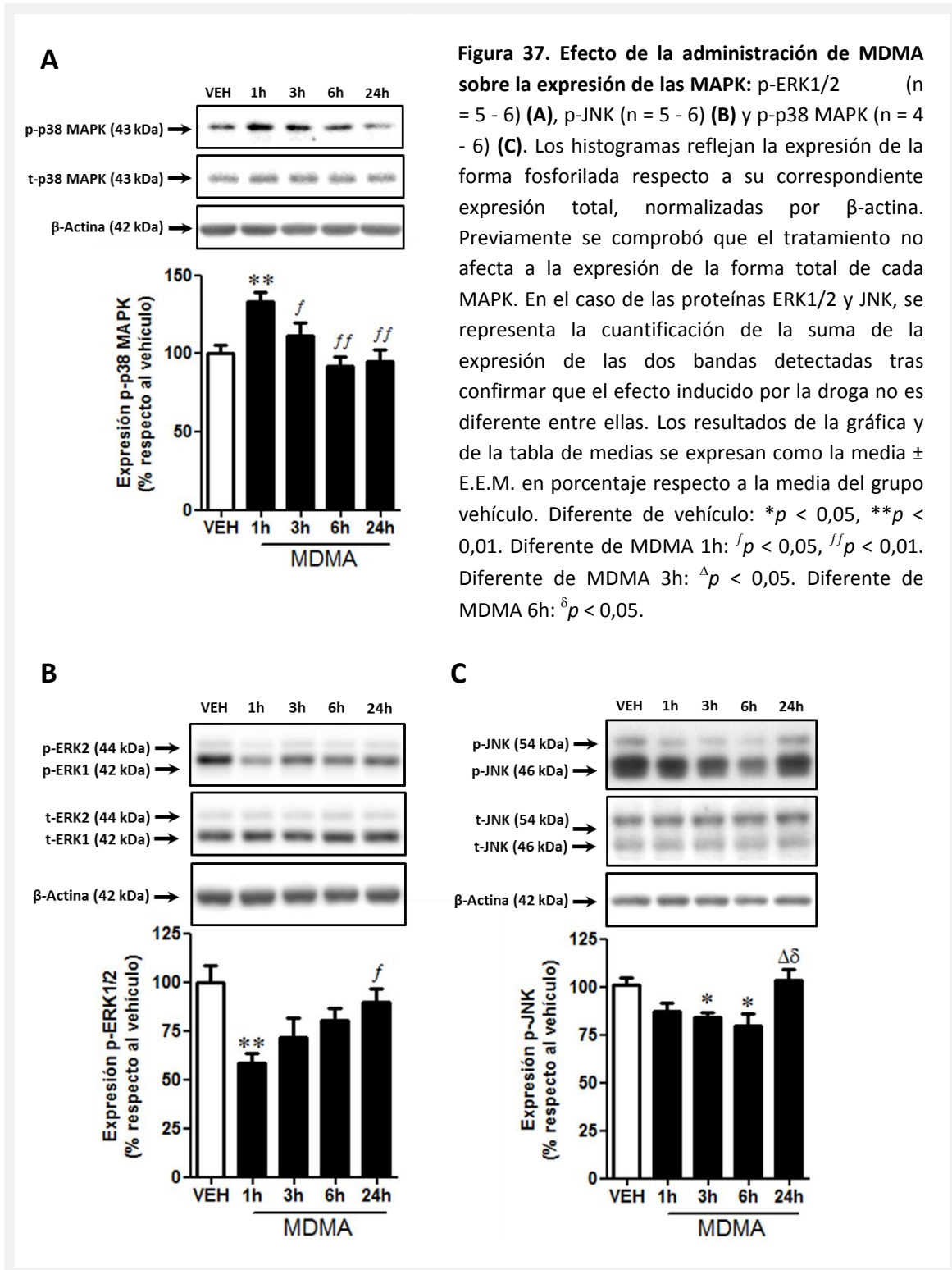


Figura 36. Representación del efecto producido por la MDMA sobre: (A) la actividad proteolítica de tPA (n = 4 - 6) y la expresión proteica de (B) tPA (n = 5 - 6), (C) plasminógeno (n = 6) y (D) del receptor LRP-1 (n = 5 - 6). Los resultados de las gráficas y la tabla se expresan como la media ± E.E.M. en porcentaje respecto al grupo vehículo. Se utilizó como control de carga la expresión de β-actina. Diferente de vehículo: **p* < 0,05, ***p* < 0,01. Diferente de MDMA 1h: ^f*p* < 0,05. Diferente de MDMA 3h: ^Δ*p* < 0,05, ^{ΔΔ}*p* < 0,01.

4.3 MAPKs: p38 MAPK, ERK1/2 y JNK

Las MAPK se han visto relacionadas con el incremento de la expresión de MMPs en el contexto de la alteración de la BHE en algunos modelos. Para determinar el efecto de la administración de MDMA sobre las distintas MAPK, se analizó la expresión de las formas fosforiladas de p38 MAPK, ERK1/2 y JNK en el hipocampo de rata. El ANOVA de una vía para los datos de expresión de p-p38 MAPK referidos a la expresión total indica la existencia de un efecto

estadísticamente significativo debido al tratamiento con MDMA (figura 37, A; $F_{4,22} = 6,59$; $p = 0,0012$). El análisis de comparación múltiple Newman-Keuls revela que la administración de MDMA incrementa la fosforilación de p38 MAPK en un 33 % tras una hora de haber sido administrada, recuperándose los niveles de fosforilación basales en los tiempos posteriores.



Por otro lado, el ANOVA de una vía determina que la administración de MDMA afecta de forma significativa a la fosforilación de ERK1/2 (figura 37, B; $F_{4,22} = 5,06$; $p = 0,005$). El análisis post-hoc de Newman-Keuls revela una disminución del 41% respecto al control, en la expresión de p-ERK1/2 referida a los niveles de expresión total, una hora después de la administración de MDMA. Esta disminución en la fosforilación de ERK1/2 desaparece a las 24 horas.

Por último, el ANOVA de una vía para la fosforilación de JNK revela un efecto significativo de la administración de MDMA (figura 37, C; $F_{4,23} = 4,81$; $p = 0,006$). Más detalladamente, el análisis de comparación múltiple indica una disminución en la expresión de la forma fosforilada de JNK respecto a la expresión total que se hace evidente tras 3 (16 %) y 6 (20 %) horas de la administración de la droga. Los niveles basales se reestablecen por completo a las 24 horas.

5. Efecto de la administración del inhibidor de gelatinasas, SB-3CT sobre la alteración de la BHE inducida por MDMA

Las MMPs suponen uno de los principales mecanismos mediante el cual se regula la permeabilidad e integridad de la BHE. Concretamente, las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 están involucradas en la alteración de la BHE en muchos modelos y patologías. Puesto que la MDMA induce un incremento en la actividad y expresión de MMP-9, se analizó el efecto de su inhibición mediante SB-3CT sobre los cambios que produce la administración de la droga.

5.1 Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la actividad y en la expresión de MMP-9

En primer lugar, para determinar la eficacia del protocolo de administración utilizado para SB-3CT, se analizó su efecto sobre el incremento en la actividad y en la expresión proteica de MMP-9 que tiene lugar una hora después de la administración de MDMA.

El ANOVA de una vía aplicado a los datos de actividad MMP-9 de los distintos grupos experimentales revela diferencias significativas debidas a los tratamientos (figura 38, A; $F_{3,19} = 6,32$, $p = 0,004$). El post-test Newman-Keuls determina que la administración del inhibidor SB-3CT previene completamente el incremento de la actividad proteolítica MMP-9 inducido por MDMA. Respecto a la expresión proteica de MMP-9, los análisis de la varianza aplicados a las formas activa ($F_{3,16} = 3,94$, $p = 0,028$) y proactiva ($F_{3,20} = 7,37$, $p = 0,002$) de la proteína revelan

diferencias significativas entre grupos (figura 38, B). Según el test de comparación múltiple, el tratamiento con el inhibidor SB-3CT previene el incremento en la expresión de la forma proactiva de MMP-9, pero no de la activa.

Sabiendo que SB-3CT es un inhibidor selectivo de gelatinasas, también se analizó su efecto sobre la actividad MMP-2 a pesar de no existir efecto de la MDMA sobre dicha metaloproteínasa. El análisis de la varianza para la actividad degradativa MMP-2 no muestra ningún efecto de los tratamientos (figura 38, C; $F_{3,20} = 0.72$, $p = 0.55$). Esto permite afirmar que los efectos que tengan lugar como consecuencia de la administración del inhibidor podrían atribuirse a la inhibición de la actividad de MMP-9.

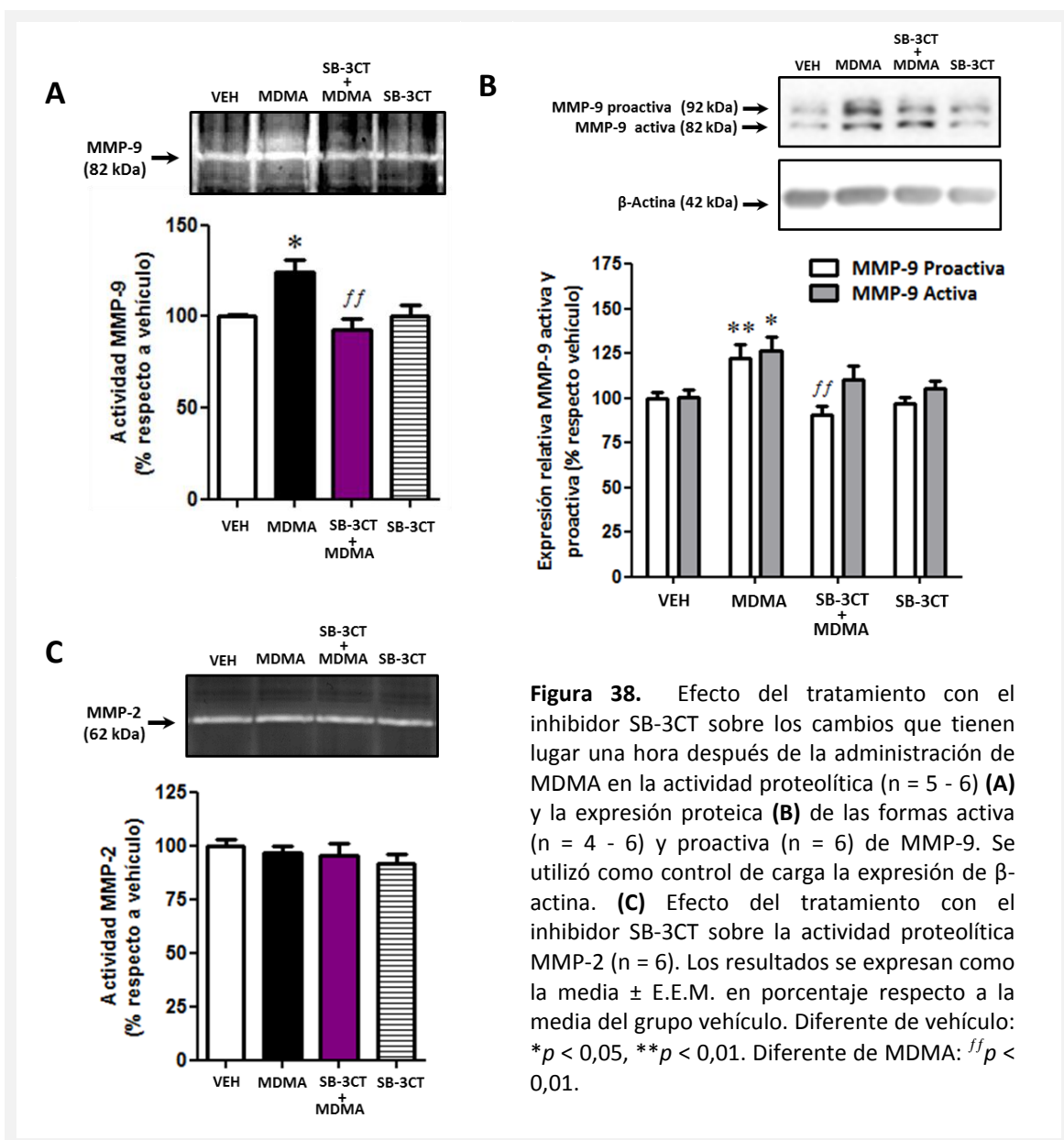
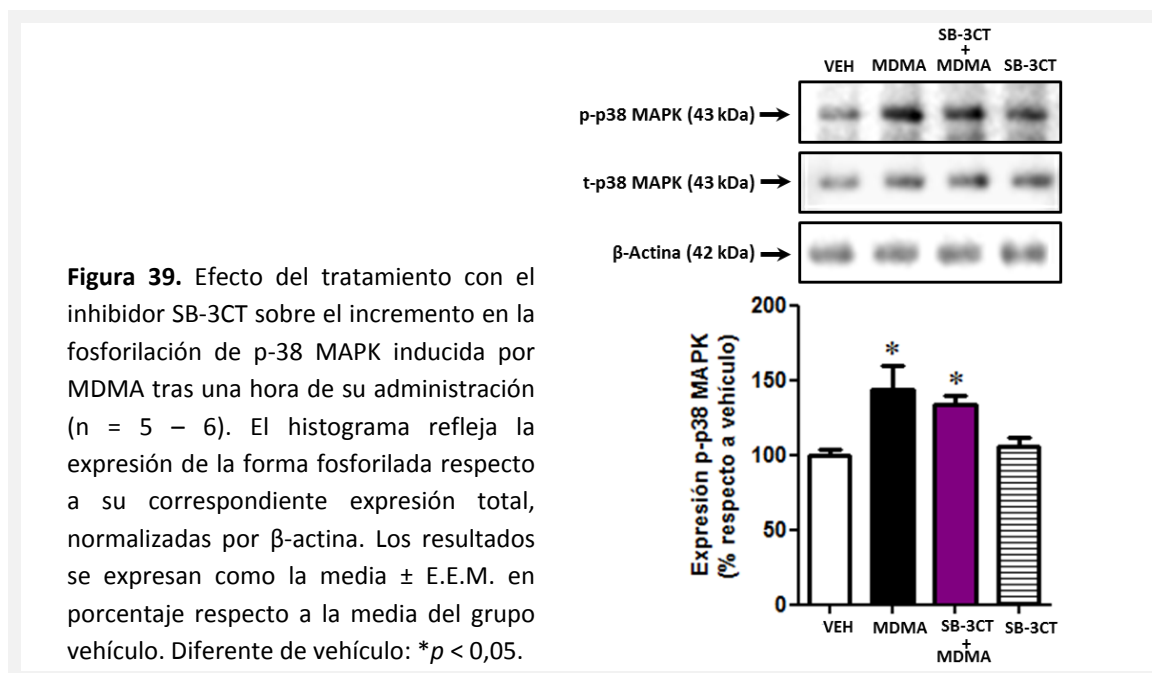


Figura 38. Efecto del tratamiento con el inhibidor SB-3CT sobre los cambios que tienen lugar una hora después de la administración de MDMA en la actividad proteolítica (n = 5 - 6) (A) y la expresión proteica (B) de las formas activa (n = 4 - 6) y proactiva (n = 6) de MMP-9. Se utilizó como control de carga la expresión de β -actina. (C) Efecto del tratamiento con el inhibidor SB-3CT sobre la actividad proteolítica MMP-2 (n = 6). Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. en porcentaje respecto a la media del grupo vehículo. Diferente de vehículo: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Diferente de MDMA: ^{ff} $p < 0,01$.

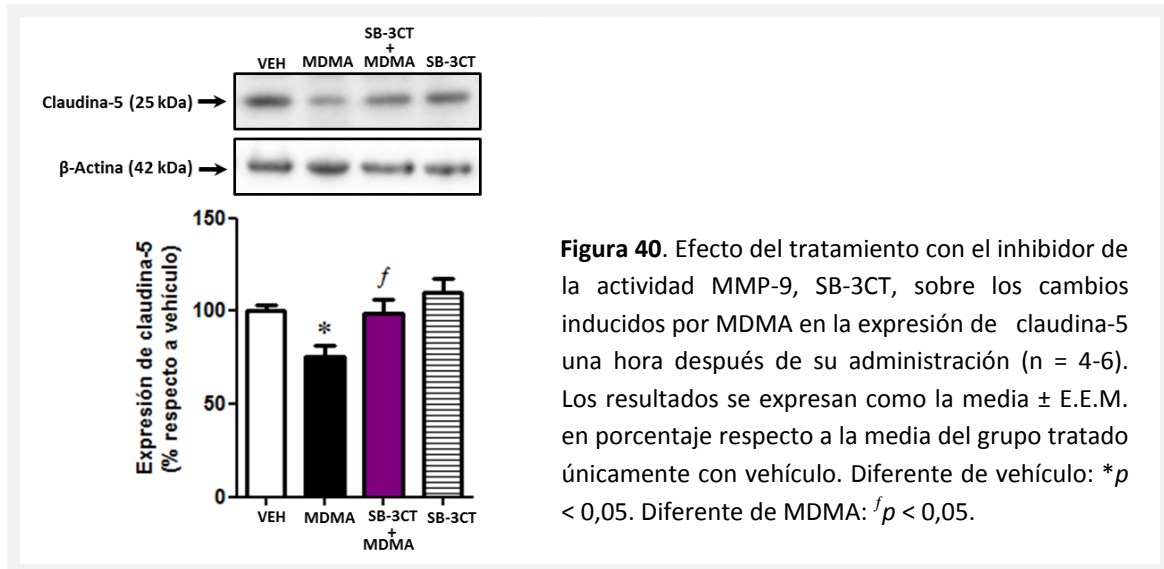
5.2 Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la fosforilación de p38 MAPK

Puesto que el tratamiento con SB-3CT previene los cambios inducidos por la MDMA sobre los niveles de expresión de la forma proactiva de MMP-9, y teniendo en cuenta que la droga induce un incremento en la fosforilación de p38 MAPK siguiendo un perfil similar al de la sobreexpresión de dicha MMP, se analizó el efecto de la administración de SB-3CT sobre la fosforilación de p38 MAPK. El ANOVA de una vía muestra un efecto estadísticamente significativo del tratamiento (figura 39, $F_{3,18} = 5.79$, $p = 0.006$ y el análisis post-hoc indica que la inhibición mediada por SB-3CT no afecta al incremento en la fosforilación de p38 MAPK que tiene lugar tras la administración de MDMA.



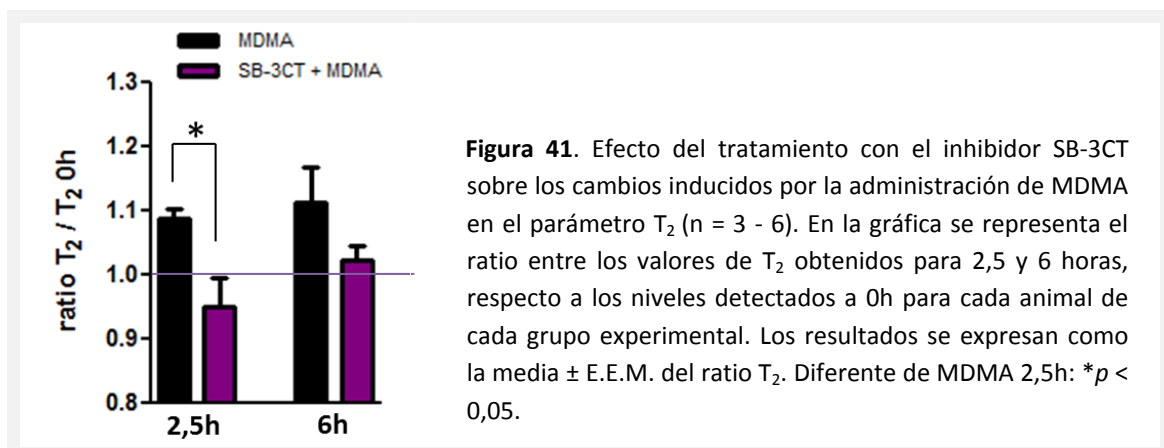
5.3 Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de claudina-5

Para determinar la implicación de la activación de MMP-9 en la disminución de la expresión de claudina-5 que induce la MDMA, se analizó su expresión tras la administración del inhibidor de MMP-9, SB-3CT. El ANOVA de una vía determina un efecto significativo del tratamiento (figura 40, $F_{3,17} = 4,59$, $p = 0,02$). El post-test Newman-Keuls confirma que la administración de MDMA induce una disminución en la expresión de claudina-5, la cual se previene mediante el pretratamiento con SB-3CT.



5.4 Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la generación de edema

Para determinar la implicación de MMP-9 sobre la generación de edema inducido por MDMA se analizó el efecto del pretratamiento con el inhibidor SB-3CT sobre los cambios detectados para el parámetro T_2 tras 2,5 y 6 horas de la administración de la MDMA (figura 41). El análisis estadístico se realizó sobre el ratio de los valores de T_2 (T_2 2,5h/ T_2 0h y T_2 6h/ T_2 0h) para cada animal de cada grupo experimental.



Los valores del ratio T_2 obtenidos para el grupo tratado con MDMA son superiores a 1 (ratio T_2 2,5h / T_2 0h = $1,09 \pm 0,01$; ratio T_2 6h / T_2 0h = $1,11 \pm 0,05$) confirmando el incremento en el parámetro T_2 previamente descrito tras la administración de MDMA tanto a 2,5h como a 6h. El análisis mediante ANOVA de dos vías para los datos del ratio T_2 , considerando los factores

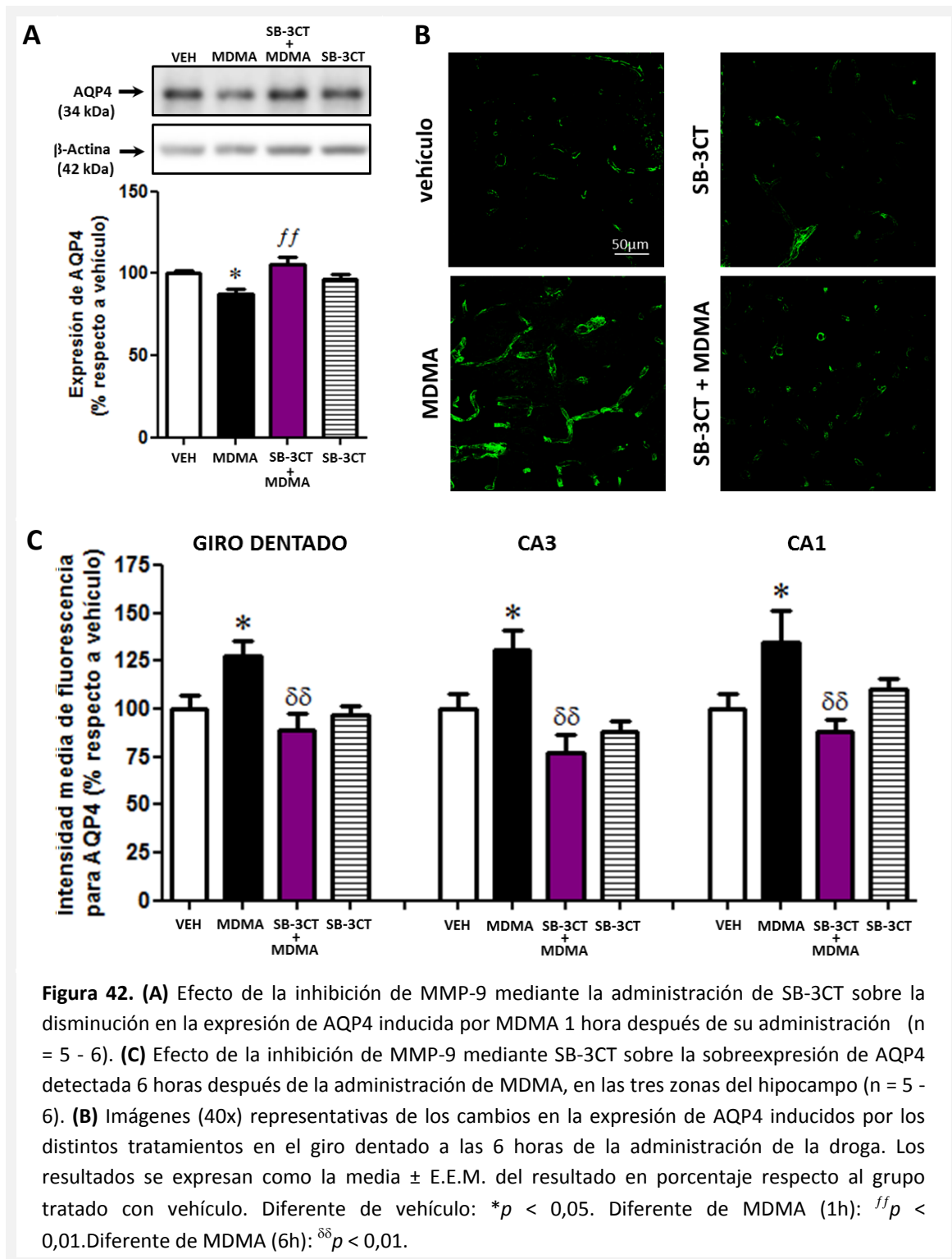
tratamiento y tiempo, determina que las diferencias obtenidas entre grupos son únicamente consecuencia del factor tratamiento ($F_{1,14} = 10,59$, $p = 0,006$), ya que el análisis para el factor tiempo ($F_{1,14} = 1,90$, $p = 0,19$) y la interacción ($F_{1,14} = 0,45$, $p = 0,52$) no resultan significativos. El test de Bonferroni revela diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con MDMA y el grupo MDMA+SB-3CT únicamente tras 2,5 horas ($1,09 \pm 0,01$ vs. $0,95 \pm 0,05$). Además, se comprobó que el tratamiento con el inhibidor de MMP-9, SB-3CT, por sí solo no tiene efecto en la formación de edema en ausencia de MDMA, obteniéndose un ratio $T_{2,2,5h} / T_{2,0h}$ de $0,98 \pm 0,04$ para dicho tratamiento.

5.5 Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de AQP4

Según los resultados descritos anteriormente en el apartado 3.2, la administración de MDMA induce a la hora una disminución en la expresión del canal de agua AQP4, mientras que a las 6 horas se aprecia una sobreexpresión de dicho canal. Para determinar la implicación de la sobreactivación de MMP-9 sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de AQP4 se administró el inhibidor SB-3CT.

Los datos de expresión de AQP4 obtenidos mediante western blot 1 hora después de la administración de MDMA se analizaron mediante ANOVA de una vía, obteniéndose un efecto estadísticamente significativo del tratamiento (figura 42, A; $F_{3,18} = 4,86$, $p = 0,01$). El análisis de Newman-Keuls confirma la disminución en la expresión de AQP4 tras la administración de MDMA, la cual se previene con el pretratamiento con SB-3CT.

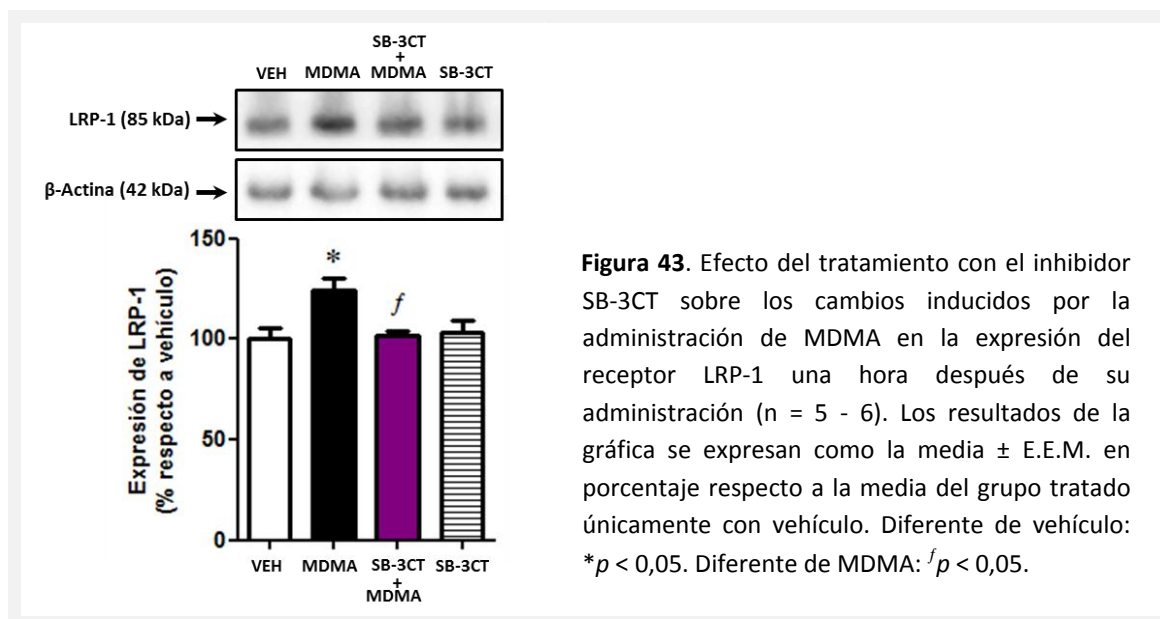
Para determinar el efecto de la inhibición de MMP-9 sobre el incremento en la expresión de AQP4 que tiene lugar 6 horas después de la administración de MDMA se administró SB-3CT y se analizó el efecto del tratamiento sobre la intensidad media de fluorescencia para dicho canal (figura 42). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía obteniéndose un efecto estadísticamente significativo de los tratamientos tanto en el giro dentado ($F_{3,19} = 5,64$, $p = 0,006$), como en CA3 ($F_{3,20} = 7,54$, $p = 0,002$) y CA1 ($F_{3,18} = 5,05$, $p = 0,01$). El test de comparación múltiple de Newman-Keuls indica que el incremento en la intensidad media de fluorescencia correspondiente a la señal de AQP4 que tiene lugar tras la administración de MDMA, se previene por completo por la administración del inhibidor SB-3CT en las tres zonas del hipocampo analizadas.



5.6 Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de LRP-1

Puesto que LRP-1 es un receptor a través del cual señala el tPA para incrementar la expresión de MMP-9 y que además puede intervenir en el aclaramiento de MMP-9, se analizó el

efecto de la administración de SB-3CT sobre el incremento inducido por la droga a la hora en la expresión del receptor. El ANOVA de una vía aplicado sobre los resultados de la cuantificación de las bandas de expresión determina un efecto significativo del tratamiento (figura 43, $F_{3,18} = 4,36$, $p = 0,017$). El análisis de comparación múltiple de Newman-Keuls confirma el incremento en la expresión de LRP-1 una hora después de la administración de MDMA, el cual se previene mediante el pretratamiento con SB-3CT.



5.7 Efecto de la administración de SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la temperatura rectal

Debido a la importancia de la hipertermia en la integridad de la BHE, se analizó el efecto de la administración del inhibidor de MMP-9 SB-3CT sobre la respuesta hipertérmica inducida por MDMA (figura 44). Los datos de temperatura rectal se analizaron mediante ANOVA de dos vías considerando los factores: tratamiento (vehículo, MDMA, MDMA + SB-3CT y SB-3CT) y tiempo. El análisis de la varianza revela un efecto estadísticamente significativo tanto del tratamiento ($F_{3,219} = 27,71$; $p < 0,0001$), como del tiempo ($F_{11,219} = 28,35$; $p < 0,0001$), existiendo interacción entre ambos factores ($F_{33,219} = 27,27$; $p < 0,0001$). Para determinar las diferencias entre grupos se utilizó el post-test de Bonferroni, según el cual la administración de MDMA, tanto en presencia como en ausencia de SB-3CT, induce un incremento en la temperatura rectal desde 0,5 hasta 6 horas después de su administración en comparación con el grupo tratado con vehículo. Por lo tanto, la administración de SB-3CT no modifica en ningún caso la hipertermia inducida por MDMA.

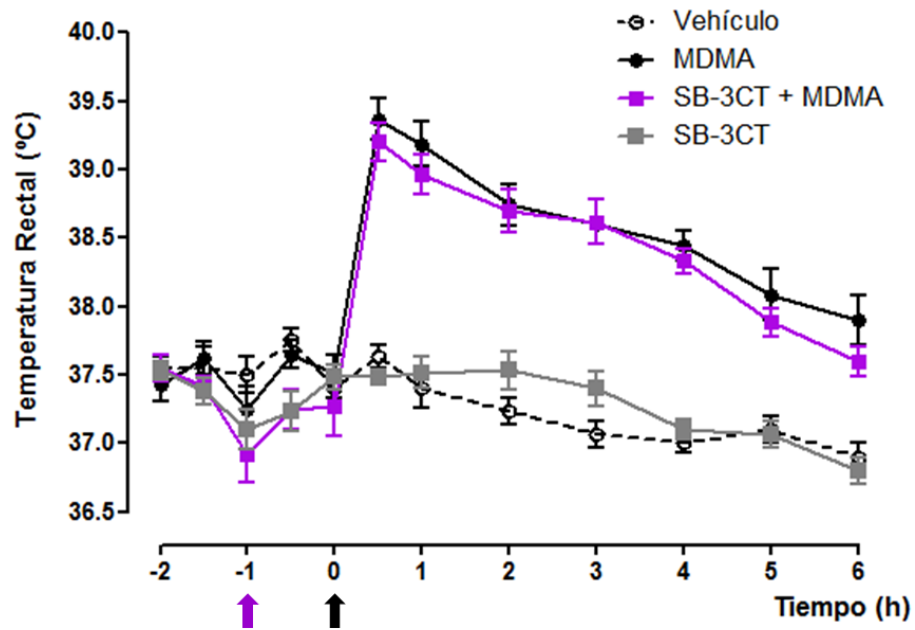


Figura 44. Efecto de la administración de SB-3CT sobre la hipertermia inducida por MDMA. Los resultados de la gráfica y la tabla se expresan como la media \pm E.E.M. de la temperatura rectal (n = 6 - 8). Las flechas indican los momentos en los que se llevó a cabo la administración de los compuestos: MDMA o salino (negro) y SB-3CT o vehículo (morado).

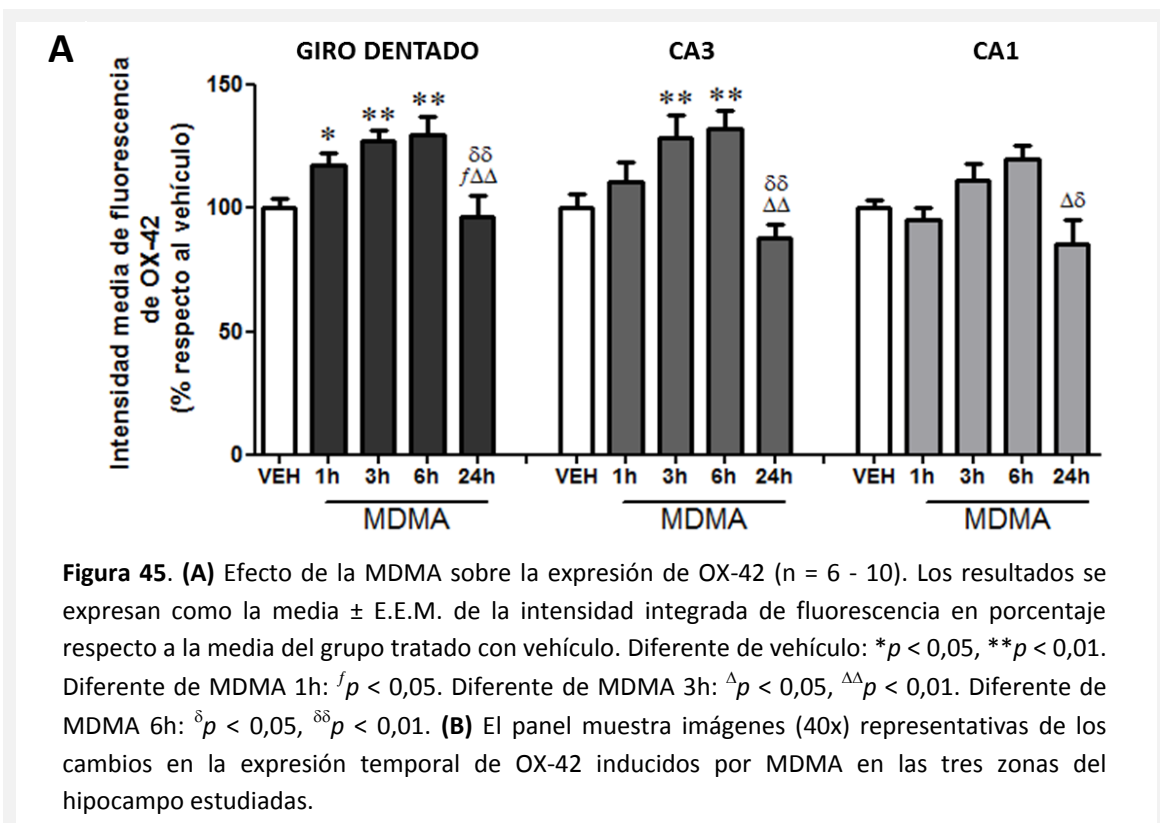
BLOQUE II: BHE, neuroinflamación y neurotoxicidad

Muchos de los principales mediadores liberados en la respuesta neuroinflamatoria participan en la regulación de la permeabilidad e integridad de la BHE. De igual modo, algunas MMPs modulan la activación microglial. Para estudiar la posible relación entre los cambios detectados en la barrera hematoencefálica y la respuesta neuroinflamatoria y neurotóxica inducidas por MDMA se utilizaron antagonistas de receptores P2X₇ y el inhibidor SB-3CT.

6. Efecto de la MDMA sobre la respuesta neuroinflamatoria

6.1 Activación microglial

Mediante inmunohistoquímica se determinó la expresión del marcador microglial OX-42 en el hipocampo tras la administración de MDMA, apreciándose el engrosamiento de las células gliales positivas para OX-42 como consecuencia del tratamiento (figura 45). Los datos de intensidad de fluorescencia para el marcador OX-42 se analizaron con ANOVA de una vía revelándose un efecto estadísticamente significativo de la administración de MDMA en giro dentado ($F_{4,28} = 6,71, p = 0,0006$), CA3 ($F_{4,32} = 5,13, p = 0,003$) y CA1 ($F_{4,32} = 3,90, p = 0,01$).



B**GIRO DENTADO****CA3****CA1**

vehículo

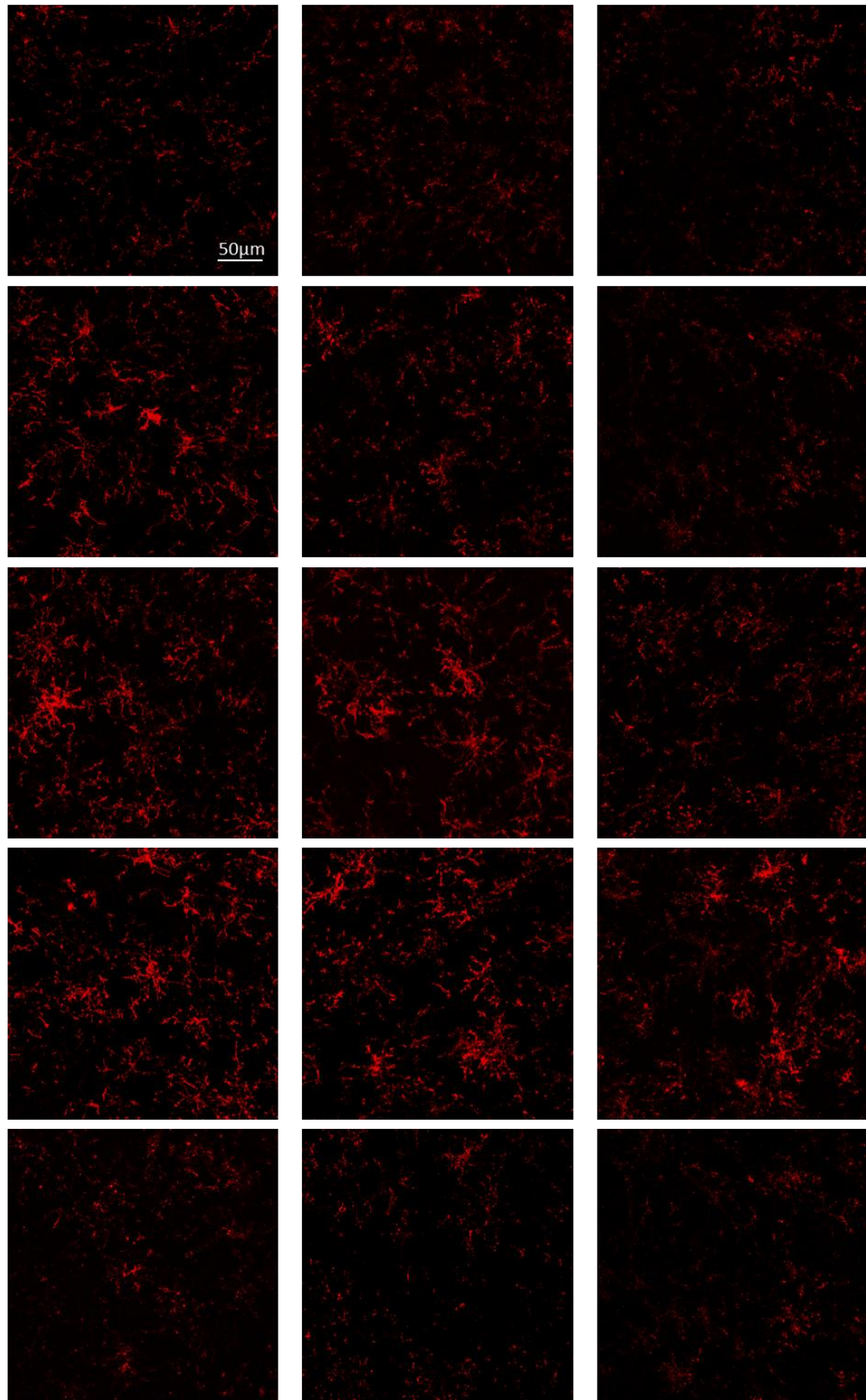
MDMA 1h

MDMA 3h

MDMA 6h

MDMA 24h

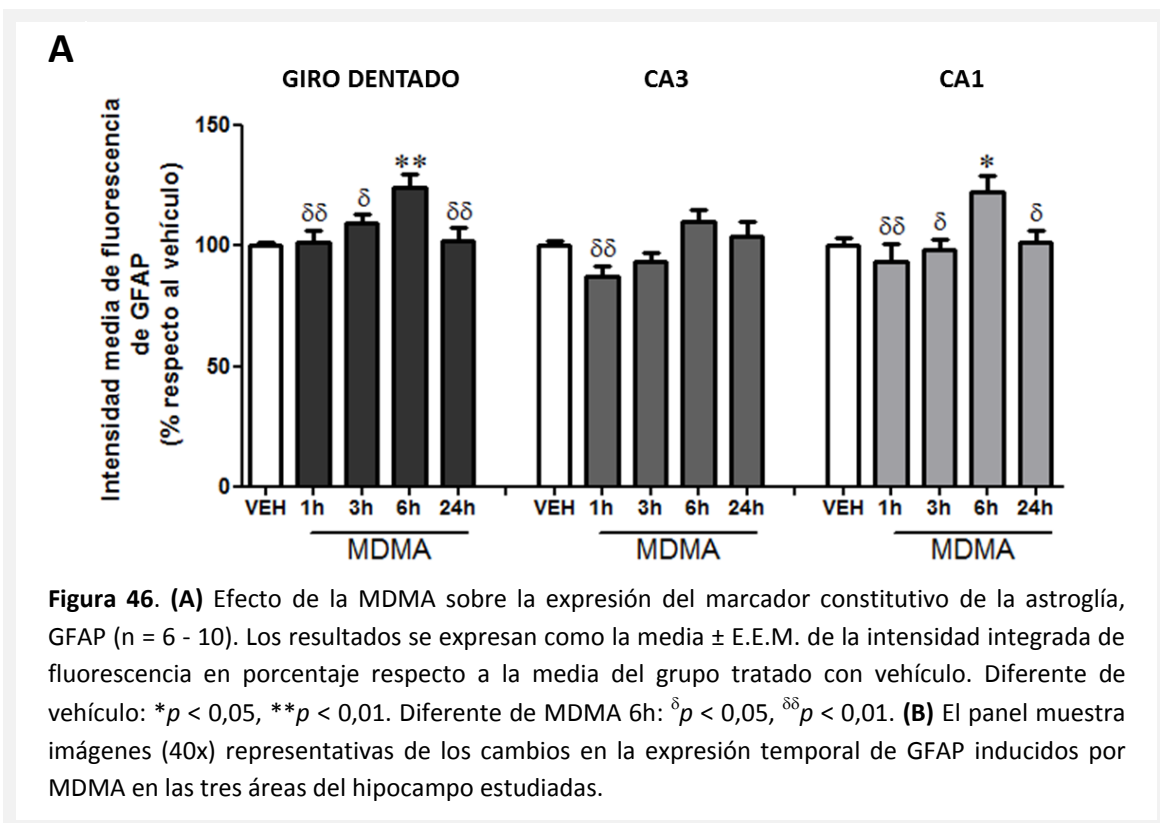
50µm

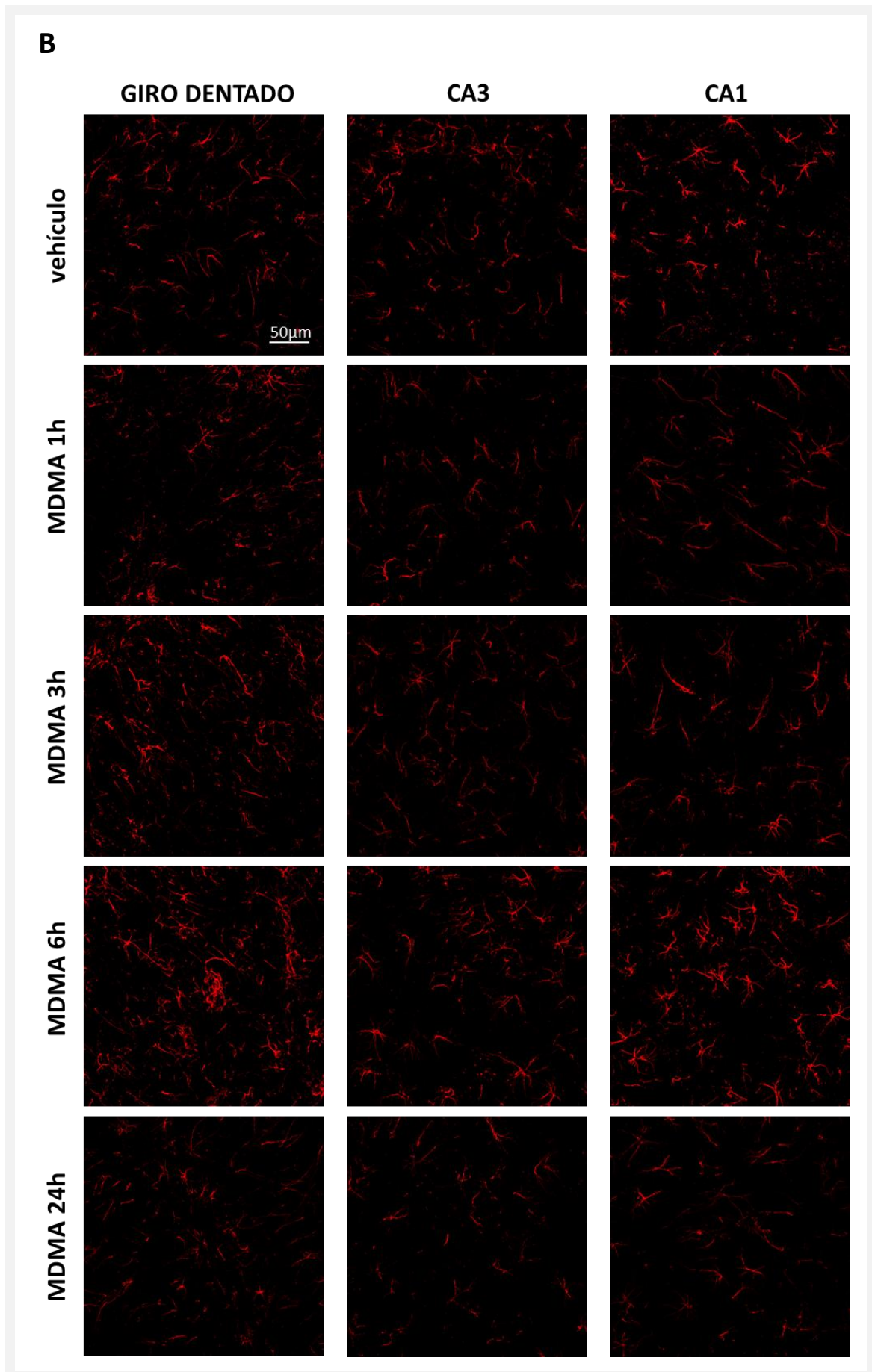


Según el análisis de comparación múltiple Newman-Keuls, la administración de MDMA induce un incremento del 28 % y del 32 % tras 3 y 6 horas respectivamente, tanto en el giro dentado como en CA3. Además, en el giro dentado el incremento ya existe tras una hora de la administración de MDMA (17,6 %). Este efecto está completamente reestablecido a las 24 horas para ambas zonas. Sin embargo, en CA1, el incremento en la expresión de OX-42, no resulta estadísticamente significativo respecto al grupo tratado con vehículo a pesar de apreciarse una tendencia a la alza, aunque sí es diferente de los niveles de expresión obtenidos para el marcador microglial a las 24 horas.

6.2 Activación astrocitaria

Mediante ANOVA de una vía se determinó la existencia del efecto de la administración de MDMA sobre la intensidad media de fluorescencia para GFAP (figura 46) en el giro dentado ($F_{4,38} = 4,38$, $p = 0,005$), CA3 ($F_{4,38} = 4,12$, $p < 0,007$) y CA1 ($F_{4,36} = 3,53$, $p = 0,016$). El test de Newman-Keuls determina que la MDMA incrementa la expresión de GFAP únicamente 6 horas después de su administración en el giro dentado (24 %) y CA1 (22 %), estando los niveles reestablecidos a las 24 horas. En el caso de CA3, el análisis *post-hoc* establece que el incremento no es suficiente para resultar significativo respecto al vehículo.



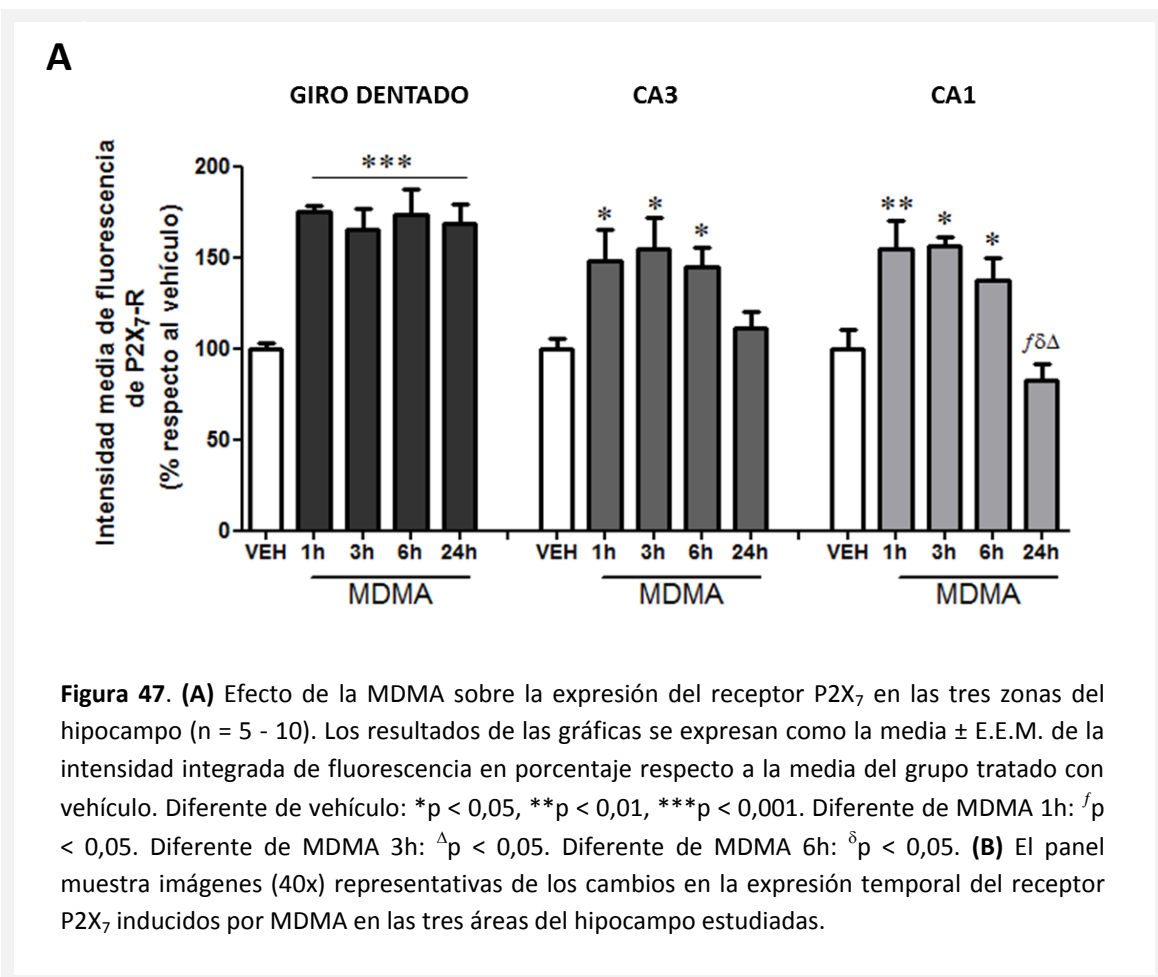


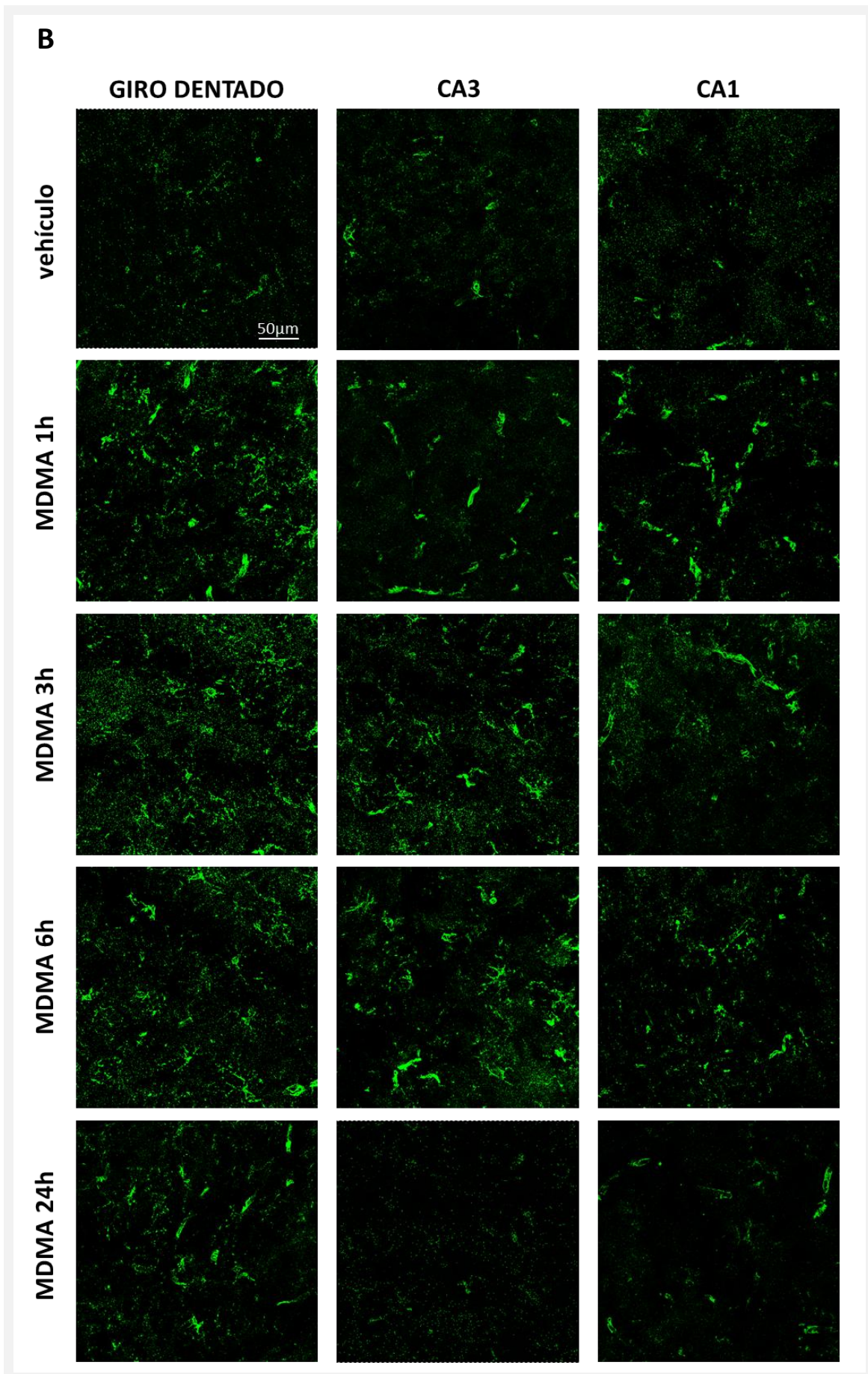
6.3 Expresión del receptor P2X₇

El receptor P2X₇ se expresa tanto en las células de la microglía como en astrocitos y es uno de los principales receptores cuya activación desencadena mecanismos de acción que inician el proceso neuroinflamatorio.

Mediante inmunohistoquímica se analizó la expresión de este receptor (figura 47). El análisis mediante ANOVA de una vía revela un efecto significativo de la administración de MDMA sobre la intensidad media de fluorescencia para el receptor P2X₇ ($F_{4,24} = 15,00$, $p < 0,0001$), CA3 ($F_{4,30} = 4,29$, $p < 0,007$) y CA1 ($F_{4,30} = 6,61$, $p = 0,0006$).

El análisis *post-hoc* determina un incremento en la expresión del receptor del 66 – 75 % en el giro dentado, a todos los tiempos analizados tras la administración de MDMA. En CA1 y CA3 este incremento es de alrededor del 50 % y tras 1, 3 y 6 horas de la administración de la droga, estando los niveles recuperados a las 24 horas.

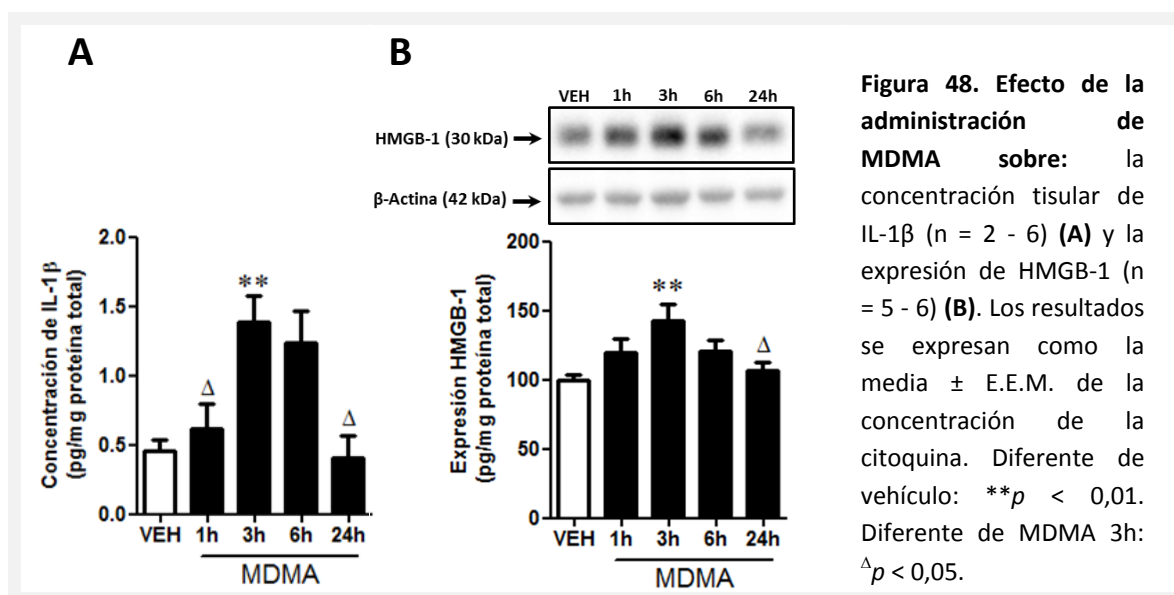




6.4 IL-1 β y HMGB-1

La determinación del contenido hipocampal de la citoquina proinflamatoria IL-1 β , se determinó mediante ELISA. El ANOVA de una vía determina que la administración de MDMA induce un efecto significativo (figura 48, A; $F_{4,15} = 6,05$, $p = 0,004$) sobre la expresión de la citoquina. El test de comparación múltiple Newman-Keuls revela un incremento en la concentración de IL-1 β 3 horas después de la administración de MDMA, siendo dicho aumento de 3 veces la concentración de la citoquina detectada para el grupo tratado con vehículo. Los niveles basales se recuperan a las 24 horas.

La expresión de HMGB-1 en el hipocampo de la rata se determinó mediante western blot (figura 48, B). El ANOVA de una vía indica que existe un efecto significativo de la MDMA sobre la expresión de HMGB-1 ($F_{4,24} = 3,81$, $p = 0,016$). El test Newman-Keuls revela un incremento en la expresión proteica de HMGB-1 a las 3 horas de la administración de MDMA, que se encuentra reestablecido a las 24 horas.

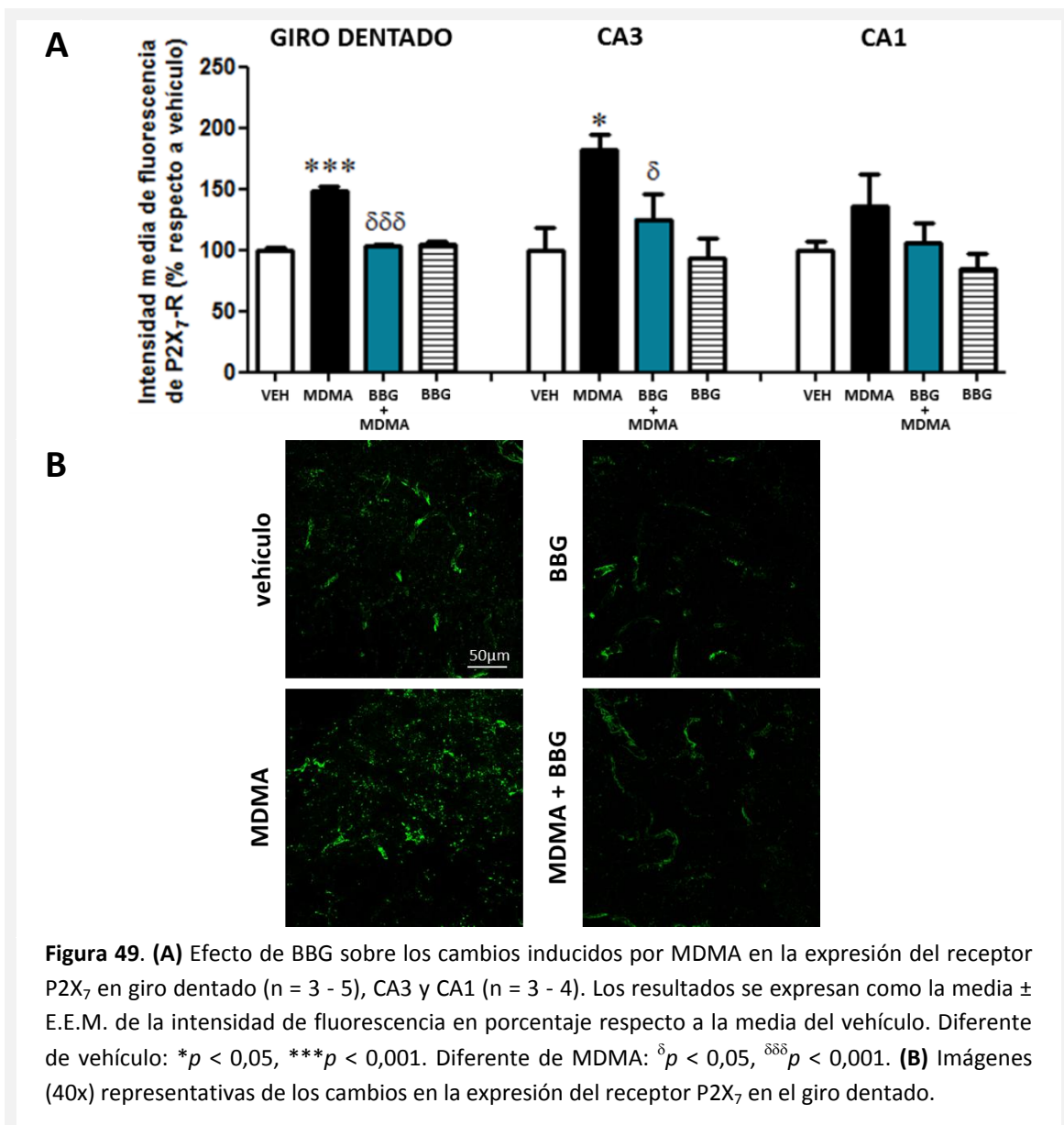


7. Efecto del antagonismo de receptores P2X₇ sobre los cambios inducidos por MDMA en la respuesta neuroinflamatoria

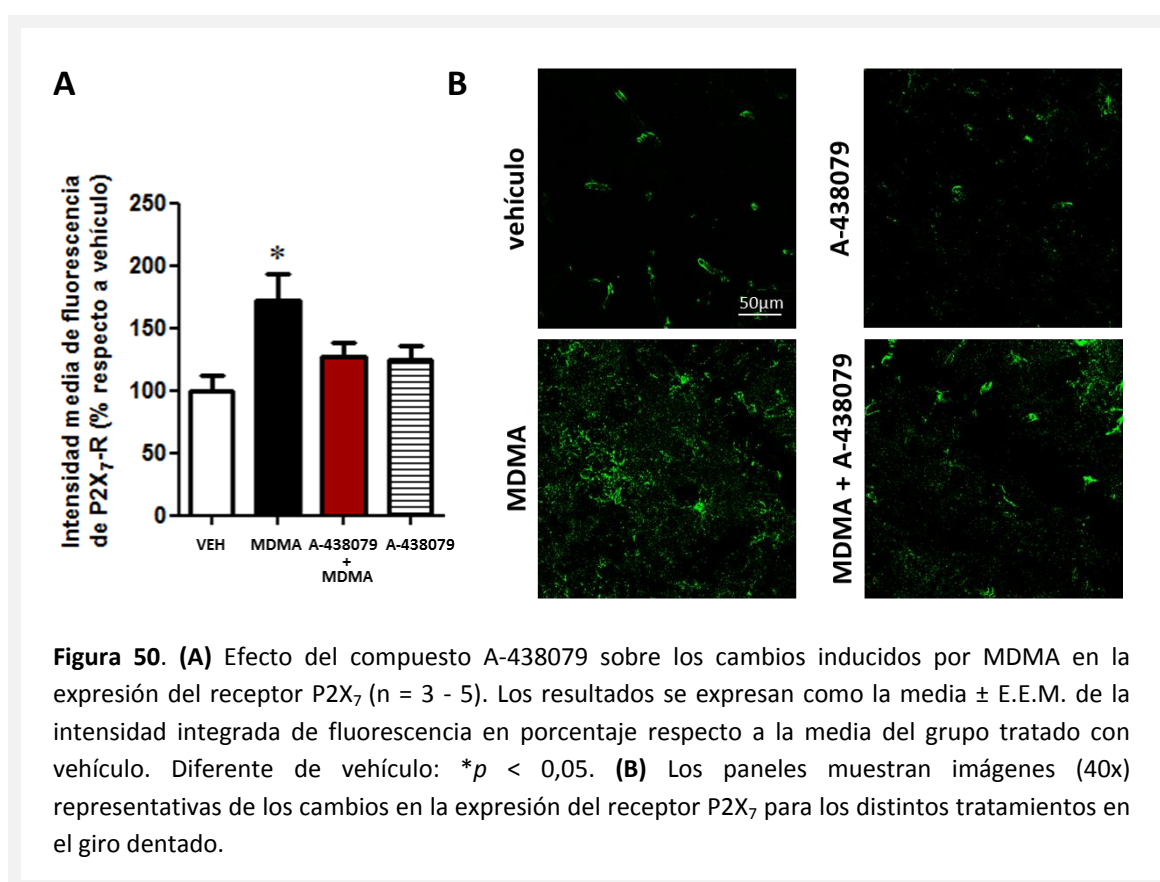
7.1 Efecto de BBG y A-438079 sobre la expresión del receptor P2X₇

Para determinar si el protocolo de administración para los antagonistas BBG y A-438079 resulta efectivo en el modelo, se analizaron sus efectos sobre el incremento en la expresión del

receptor P2X₇ 6 horas después de la administración de MDMA. En el caso del experimento de antagonismo mediante BBG (figura 49), el ANOVA de una vía indica la existencia de cambios en la expresión de dicho receptor debidos al tratamiento en el giro dentado ($F_{3,12} = 58,64$, $p < 0,0001$) y CA3 ($F_{3,11} = 6,2$, $p < 0,01$). El test de comparación múltiple determina que el tratamiento con el inhibidor BBG previene completamente el incremento en la expresión del receptor P2X₇ que ocurre tras la administración de MDMA en dichas áreas. La estadística para CA1 no resulta significativa ($F_{3,10} = 1,86$, $p < 0,20$), a pesar de existir una tendencia a estar incrementada la expresión del receptor tras la administración de MDMA ($135,8 \pm 26,0$ % vs $100,0 \pm 6,8$ %). En el grupo que recibió MDMA y BBG no se apreció esta tendencia y, aparentemente, el efecto de MDMA parece estar prevenido tras la administración de BBG ($105,7 \pm 16,6$ % vs $100,0 \pm 6,8$ %) al comparar con el vehículo.



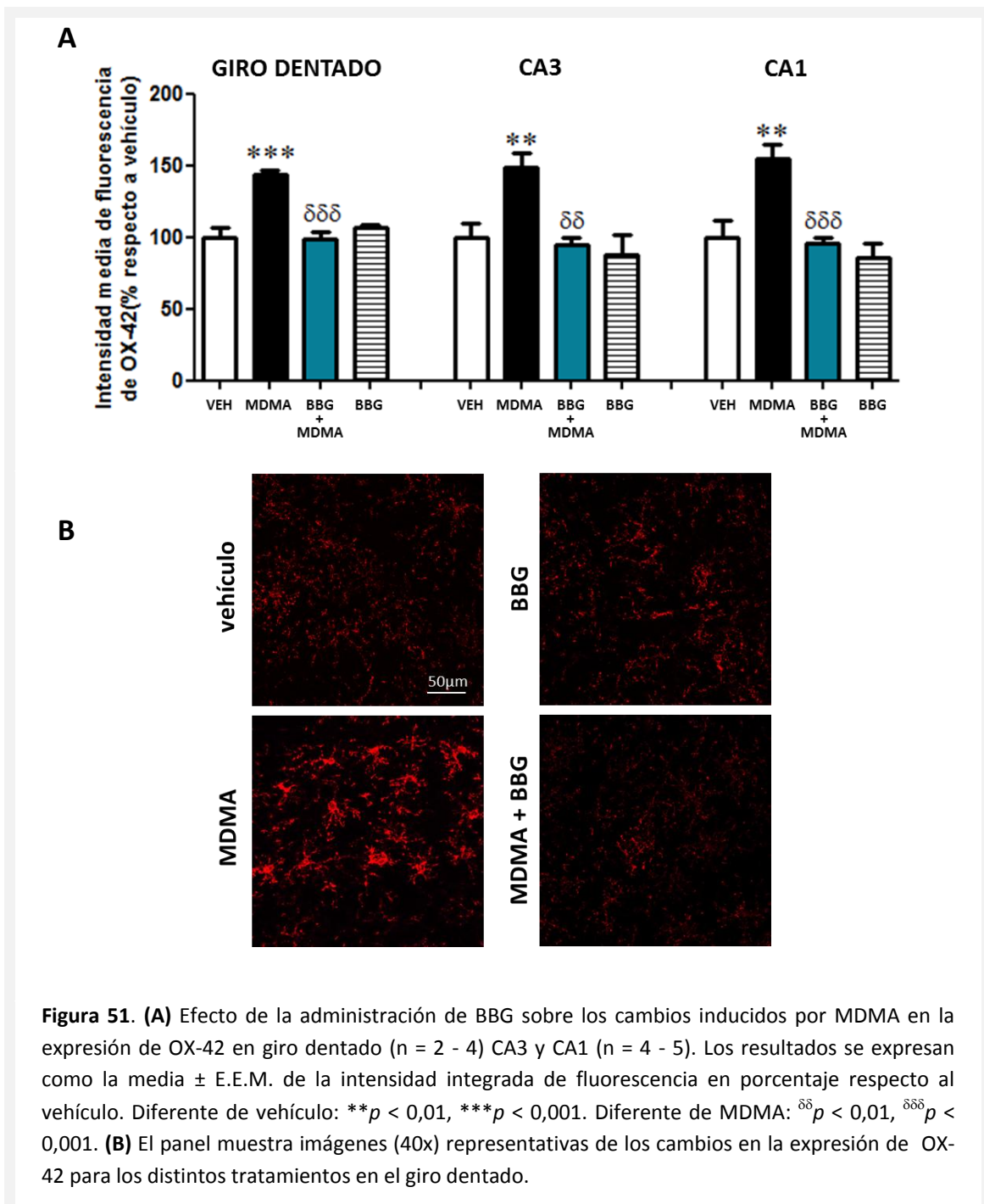
Respecto al antagonista A-438079, se analizó su efecto sobre el incremento en la expresión del receptor P2X₇ producido en el giro dentado 6 horas después de la administración de MDMA (figura 50), obteniéndose diferencias significativas según el ANOVA de una vía ($F_{3,11} = 4,45$, $p < 0,0280$). El análisis de Newman-Keuls revela únicamente diferencias entre el grupo tratado con MDMA y el vehículo ($172,3 \pm 20,8$ % vs. $100,0 \pm 12,0$ %). Aunque la prevención mediante A-438079 no resulta estadísticamente significativa, el pretratamiento con el antagonista supone un porcentaje de prevención del efecto de aproximadamente el 73 % al comparar con el grupo tratado con MDMA. Además, el grupo tratado con MDMA y A-438079 no presenta diferencias respecto al vehículo ($126,8 \pm 12,1$ % vs. $100,0 \pm 12,0$ %).



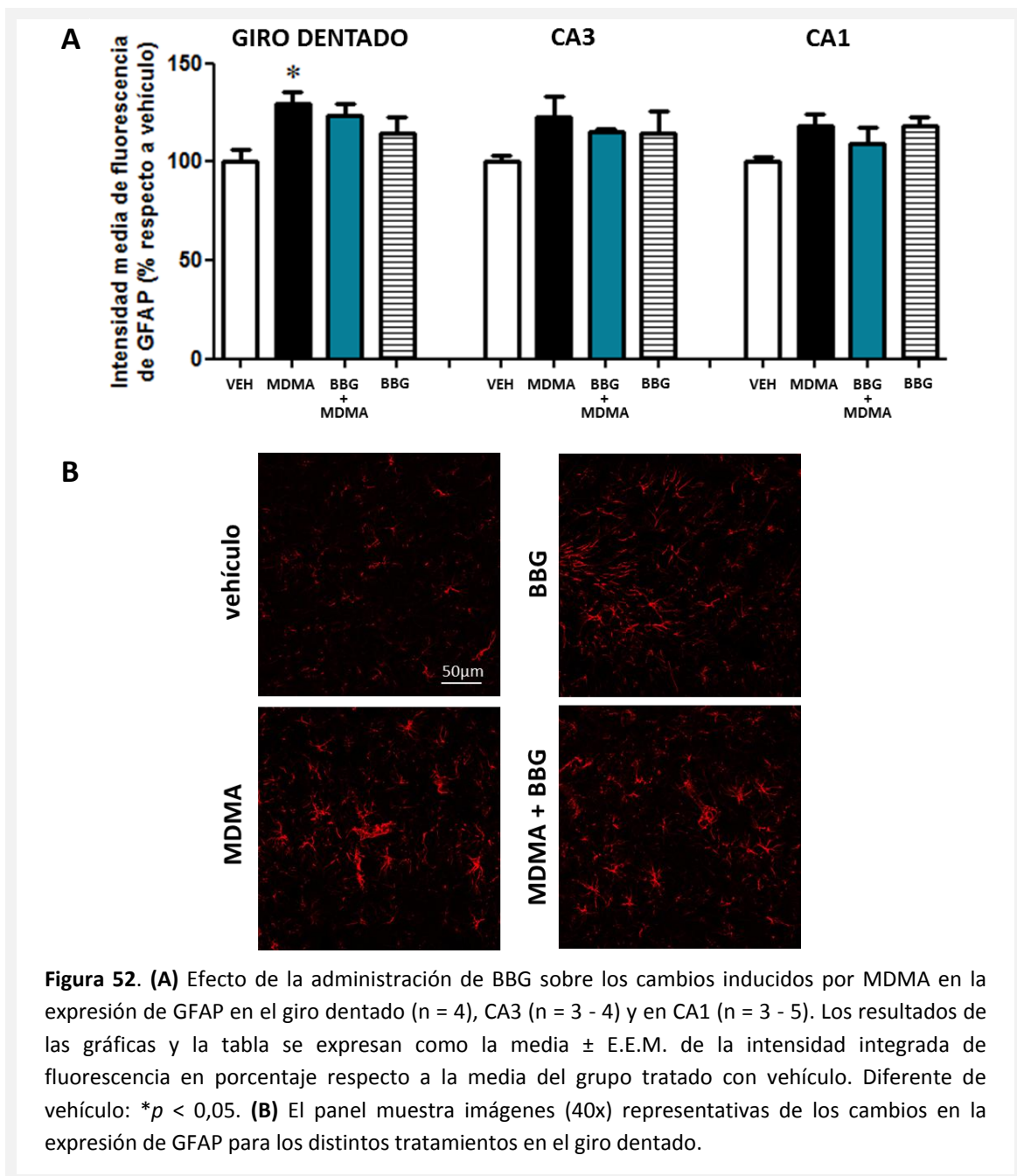
7.2 Efecto de BBG sobre la activación microglial y astrocitaria

Puesto que la activación del receptor P2X₇ es uno de los mecanismos que activa el proceso neuroinflamatorio, se estudió el efecto de la administración de BBG sobre el incremento en la expresión de OX-42 y GFAP que tiene lugar 6 horas después de la administración de MDMA.

El ANOVA de una vía aplicada a los datos de intensidad media de fluorescencia obtenidos para el marcador OX-42 (figura 51) para los distintos tratamientos indica la existencia de cambios estadísticamente significativos en el giro dentado ($F_{3,10} = 28,32, p < 0,0001$), CA3 ($F_{3,14} = 8,72, p < 0,002$) y CA1 ($F_{3,14} = 11,52, p < 0,0004$). El post-test Newman-Keuls revela las diferencias entre grupos indicando que la administración de BBG previene completamente el incremento en la expresión del OX-42 inducida por MDMA que tiene lugar en todas las áreas del hipocampo analizadas.



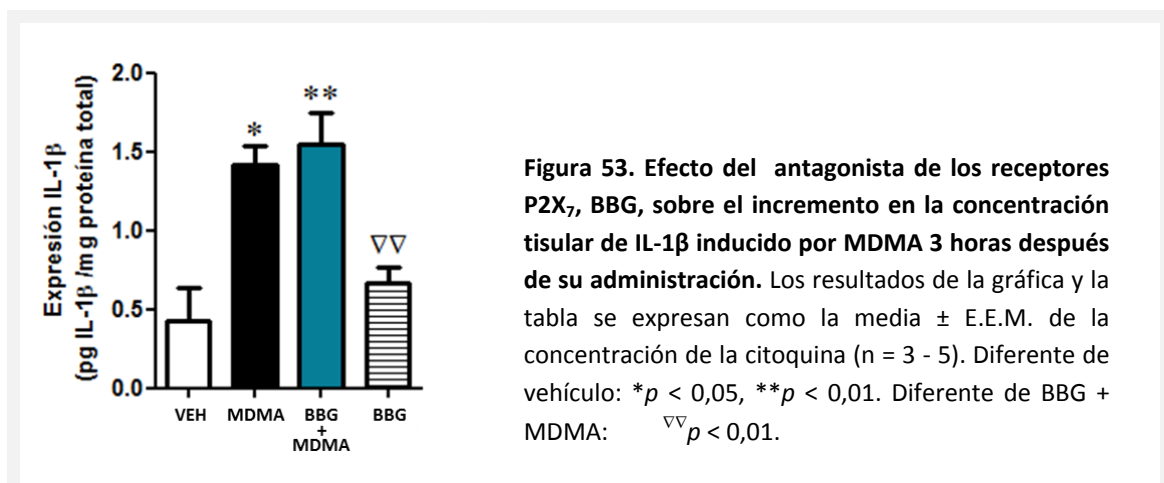
El ANOVA de una vía aplicada a los datos de intensidad media de fluorescencia obtenidos para el marcador GFAP (figura 52) para los distintos tratamientos indica la existencia de cambios estadísticamente significativos solo en el giro dentado ($F_{3,12} = 3,951$, $p < 0,0358$). El efecto consiste en un incremento en la señal de GFAP inducido por MDMA que no se revierte mediante el tratamiento con BBG. Sin embargo, la estadística no resulta significativa para los datos de CA1 ($F_{3,10} = 2,15$, $p = 1,57$), a pesar de lo cual, es posible apreciar una tendencia a estar incrementada la expresión de GFAP tras la administración de MDMA cuando se compara con el grupo tratado con vehículo ($100,0 \pm 2,2$ % vs $118,1 \pm 6,4$ %).



Por otro lado, en CA3 no se aprecia efecto estadísticamente significativo de la MDMA según el ANOVA de una vía ($F_{3,12} = 1,52$, $p = 2,6$), al igual que en los resultados de la curva del efecto temporal de la droga descritos en el apartado 6.2. No obstante, es posible apreciar una tendencia al aumento para la expresión de GFAP al comparar el grupo tratado con MDMA con el grupo vehículo ($100,0 \pm 3,4\%$ vs $123,0 \pm 10,2\%$).

7.3 Efecto de BBG sobre la expresión de IL-1 β

El efecto del antagonista de receptores P2X₇, BBG, sobre el incremento en el contenido hipocampal de IL-1 β que tiene lugar 3 horas después de la administración de MDMA se analizó mediante ANOVA de una vía, obteniéndose un efecto significativo de los tratamientos (figura 53; $F_{4,15} = 6,05$, $p = 0,004$). El test de comparación múltiple Newman-Keuls indica que la concentración de IL-1 β 3 horas después de la administración de MDMA se mantiene incrementada a pesar del pretratamiento con BBG.



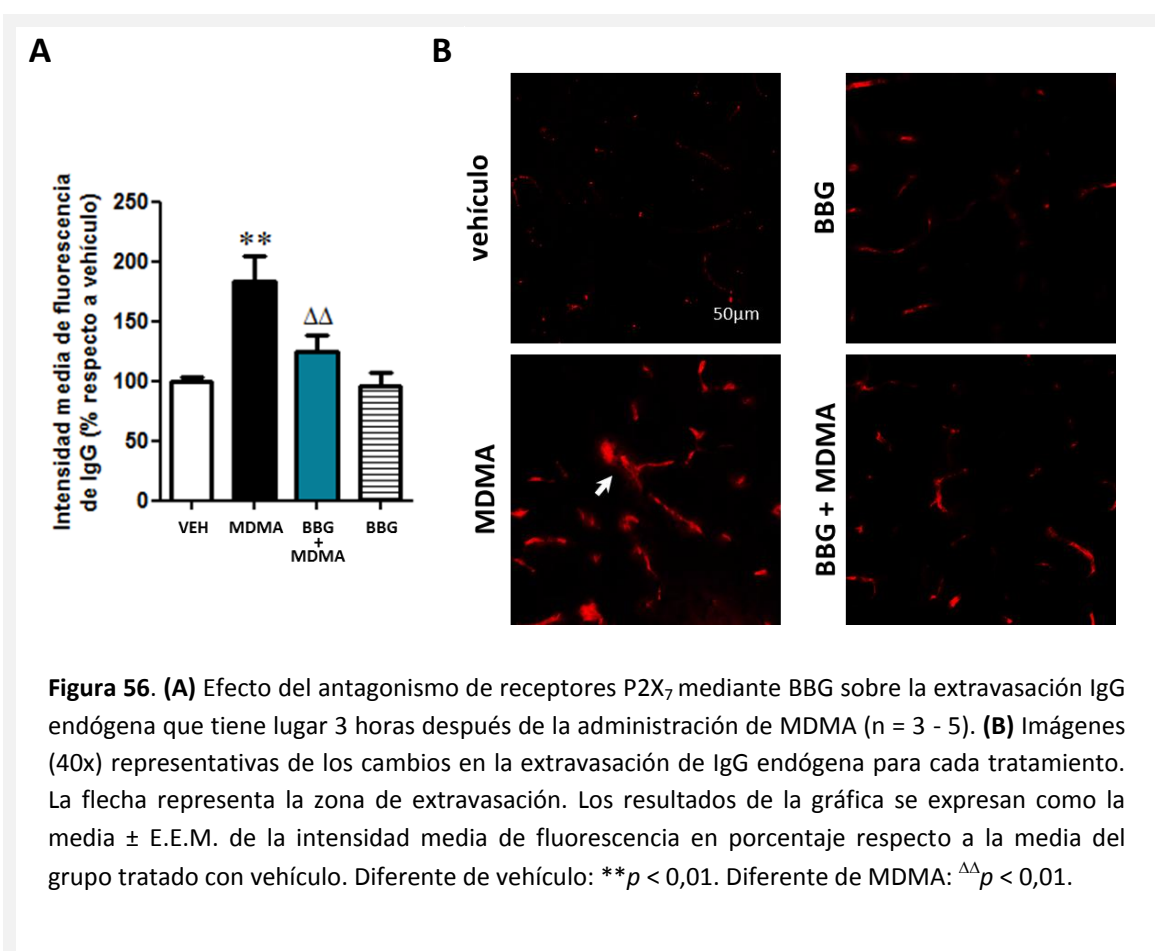
8. Efecto del antagonismo de receptores P2X₇ sobre los cambios inducidos por MDMA en la BHE

El proceso neuroinflamatorio conlleva una serie de cambios que en ocasiones pueden contribuir a la alteración de la BHE. Las células de la microglía y los astrocitos activos pueden secretar mediadores como la IL-1 β , MMP-9, MMP-3 y especies reactivas de oxígeno que originan cambios en las proteínas que dan integridad a la unión neurovascular. De este modo, y para estudiar si los cambios en la integridad y la permeabilidad de la BHE que tienen lugar a corto

plazo tras la administración de MDMA están relacionados con la respuesta neuroinflamatoria que produce la droga, se realizaron estudios de antagonismo de los receptores P2X₇.

8.1 Efecto de la administración de BBG sobre la alteración de la permeabilidad de la BHE inducida por MDMA: IgG endógena

El efecto del antagonismo de P2X₇ mediante la administración de BBG sobre los cambios en la permeabilidad de la BHE que genera la MDMA, se analizó mediante la determinación de la expresión de IgG endógena en el hipocampo.

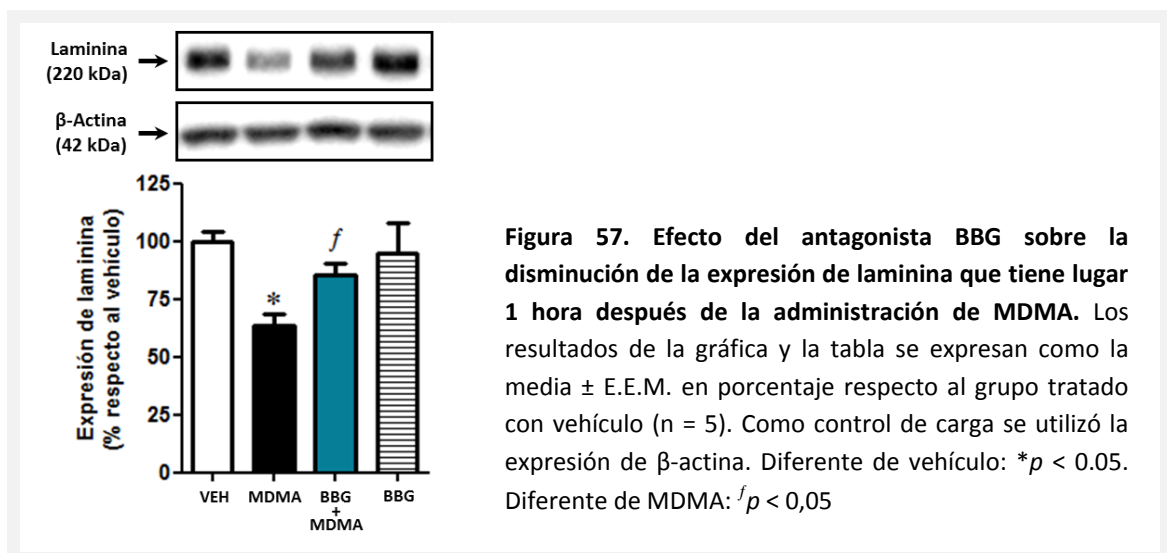


El ANOVA de una vía para la intensidad media de fluorescencia de IgG endógena determina un efecto significativo del tratamiento (figura 56; $F_{3,16} = 8,17$, $p = 0,0016$). El post-test Newman-Keuls indica que el antagonista previene el aumento en la expresión de IgG endógena mediado por MDMA.

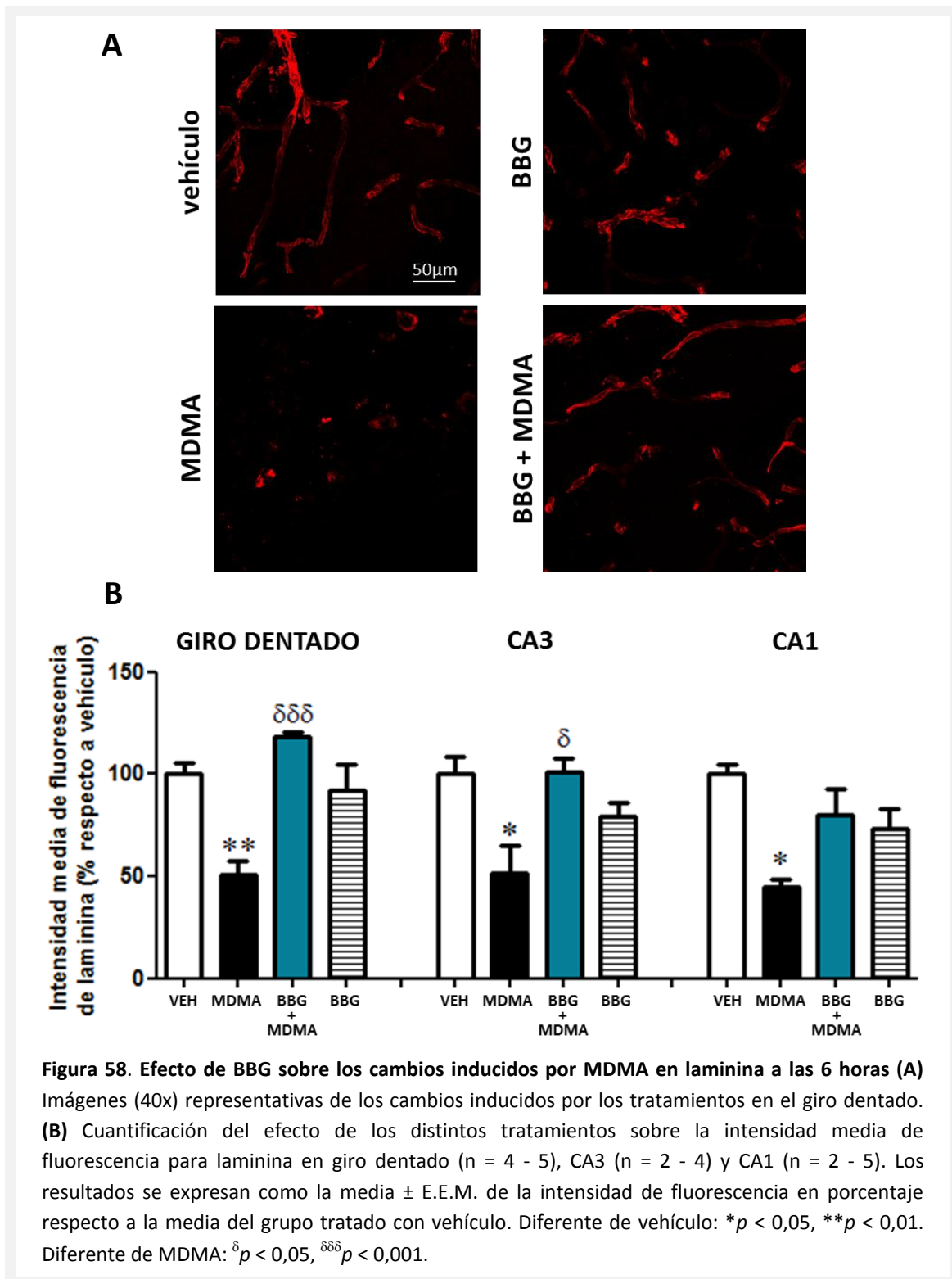
8.2 Efecto del antagonismo de receptores P2X₇ sobre la alteración inducida por MDMA en la expresión de laminina y colágeno-IV

Para determinar el efecto de la activación de receptores P2X₇ sobre los cambios detectados en la integridad de la lámina basal tras la administración de MDMA se analizó el efecto del antagonista BBG sobre la disminución en la expresión de laminina y colágeno-IV que genera la droga.

El análisis de la varianza para la expresión proteica de laminina detectada mediante western blot en el hipocampo determina un efecto significativo del tratamiento (figura 57, $F_{3,16} = 4,36$, $p = 0,02$). El post-test Newman-Keuls indica que el antagonista previene la disminución en la expresión de laminina mediada por MDMA a la hora.

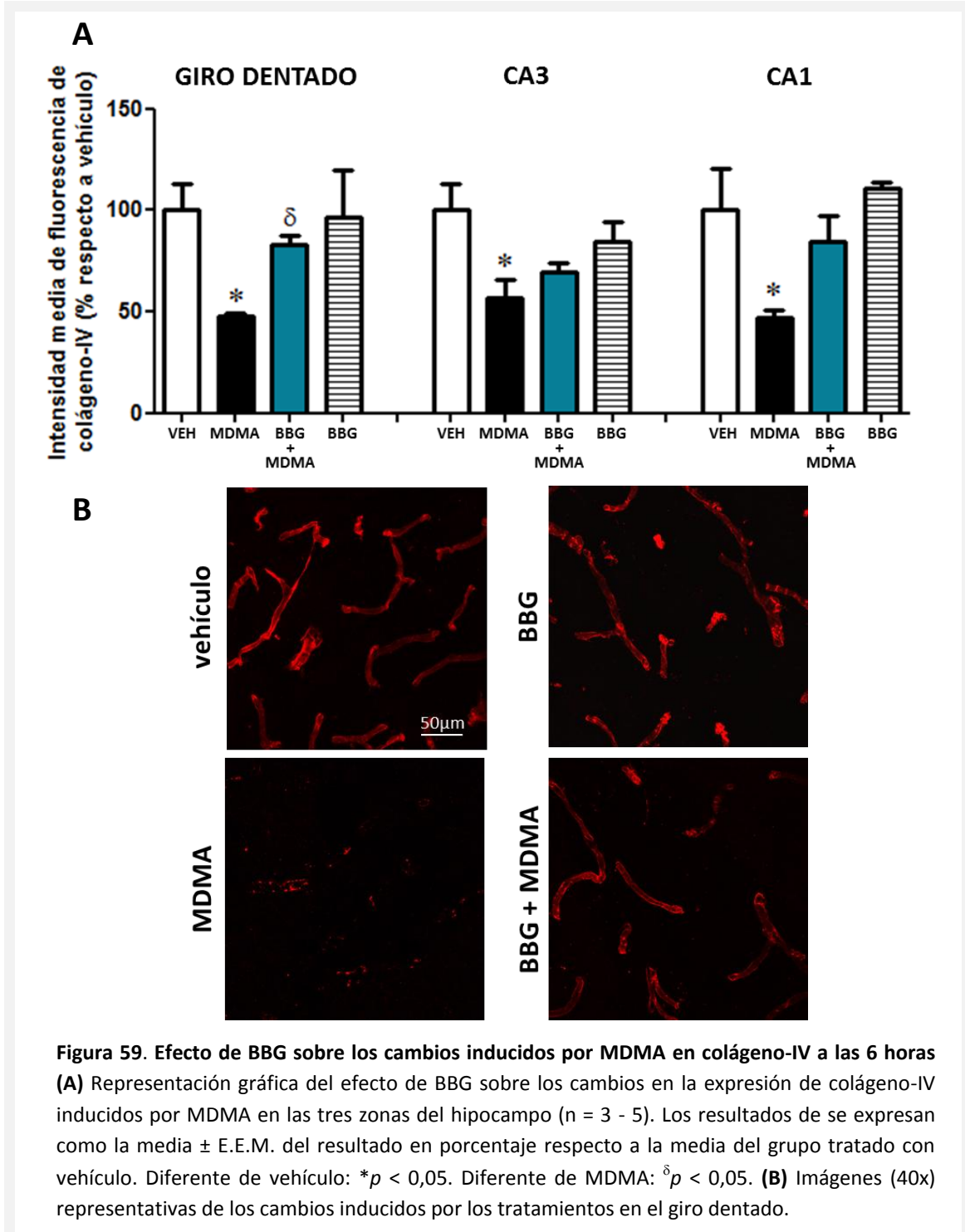


Mediante inmunohistoquímica se estudió detalladamente en cada zona del hipocampo el efecto de BBG sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de laminina a las 6 horas (figura 58). El ANOVA de una vía determina la existencia de cambios en el giro dentado ($F_{3,13} = 15,20$, $p = 0,0002$), CA3 ($F_{3,9} = 5,47$, $p = 0,02$) y CA1 ($F_{3,11} = 4,08$, $p = 0,036$). El test de comparación múltiple Newman-Keuls indica que el antagonista BBG previene la disminución de laminina generada por MDMA en giro dentado y CA3. Aunque estadísticamente la prevención no resulta significativa en CA1, hay una tendencia a la recuperación, pues los valores de intensidad media de fluorescencia media para laminina en el grupo tratado con MDMA y BBG se aproximan a los encontrados para el grupo vehículo ($80,3 \pm 12,3\%$ vs. $100 \pm 4,7\%$).



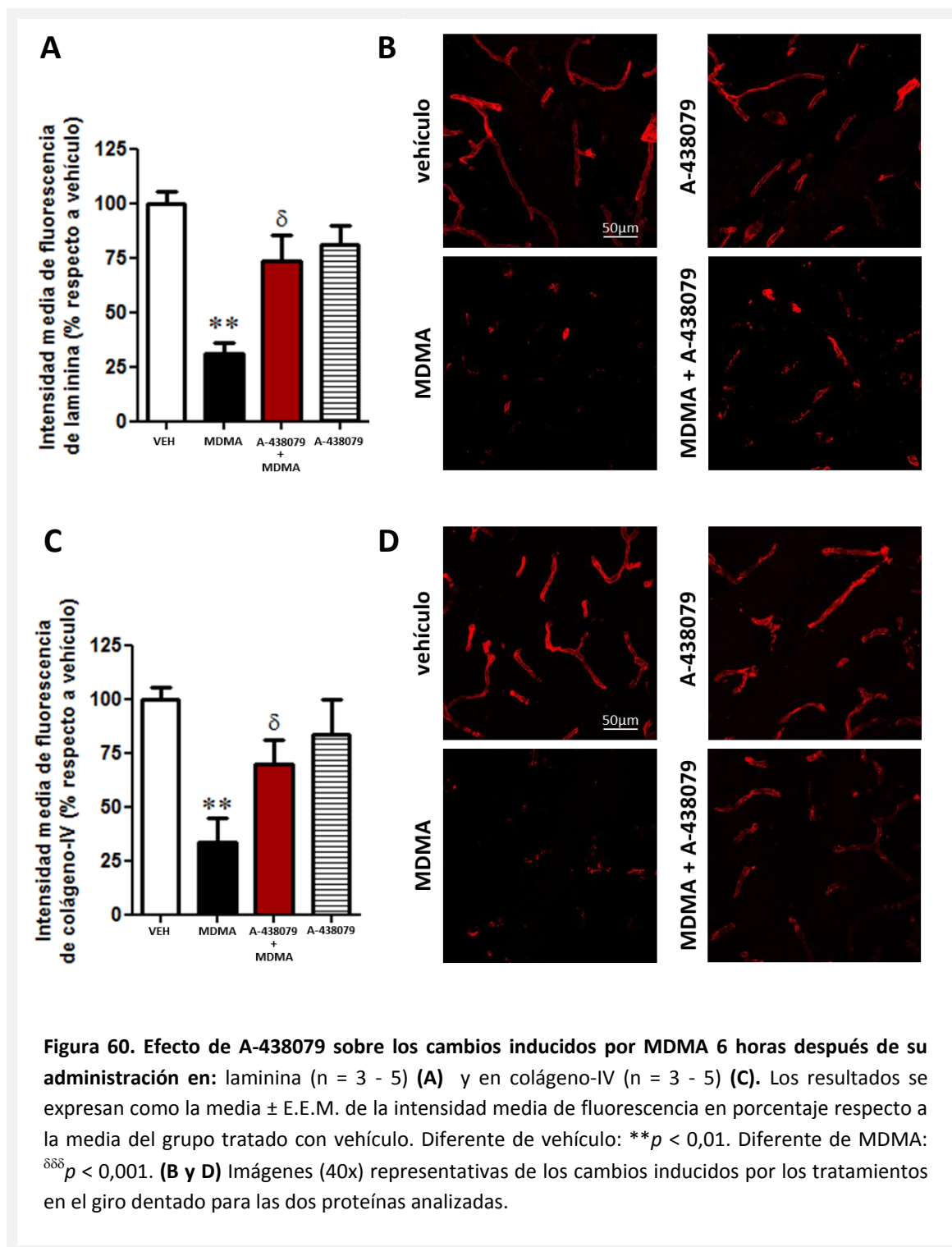
Respecto al efecto del antagonismo de receptores P2X₇ mediante la administración de BBG sobre la expresión de colágeno-IV (figura 59), el ANOVA de una vía revela diferencias significativas para los tratamientos en giro dentado ($F_{3,12} = 4,7$, $p = 0,022$), CA3 ($F_{3,13} = 4,33$, $p = 0,025$) y CA1 ($F_{3,12} = 4,00$, $p = 0,035$).

El *post-hoc* Newman-Keuls indica que el tratamiento con BBG previene la disminución de colágeno-IV que produce la administración de MDMA en el giro dentado. Sin embargo, este efecto no se aprecia en CA3 ni en CA1.



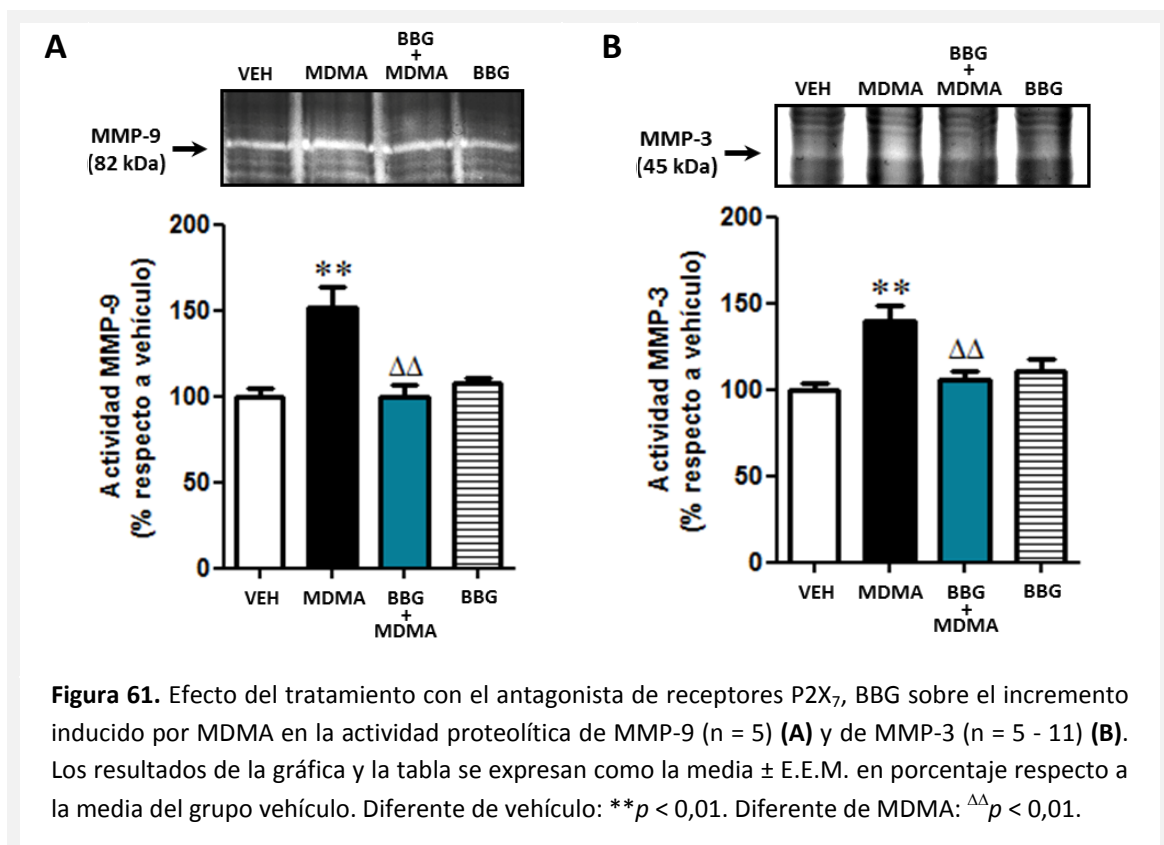
Con el fin de confirmar los resultados obtenidos, se examinó el efecto de otro antagonista de P2X₇, el A-438079, sobre los cambios en la expresión de laminina y colágeno-IV

inducidos por MDMA en el giro dentado (figura 60). El ANOVA de una vía aplicada a los datos de intensidad media de fluorescencia tanto para laminina ($F_{3,14} = 8,00$, $p = 0,002$) como para colágeno-IV ($F_{3,11} = 5,82$, $p = 0,012$) muestra diferencias significativas debidas a los tratamientos. Según el *post-test* Newman-keuls el antagonista A-438079 previene la disminución en la expresión de laminina y de colágeno-IV que produce la MDMA.



8.3 Efecto del antagonismo con BBG sobre los cambios inducidos por MDMA en la actividad de MMP-9 y MMP-3

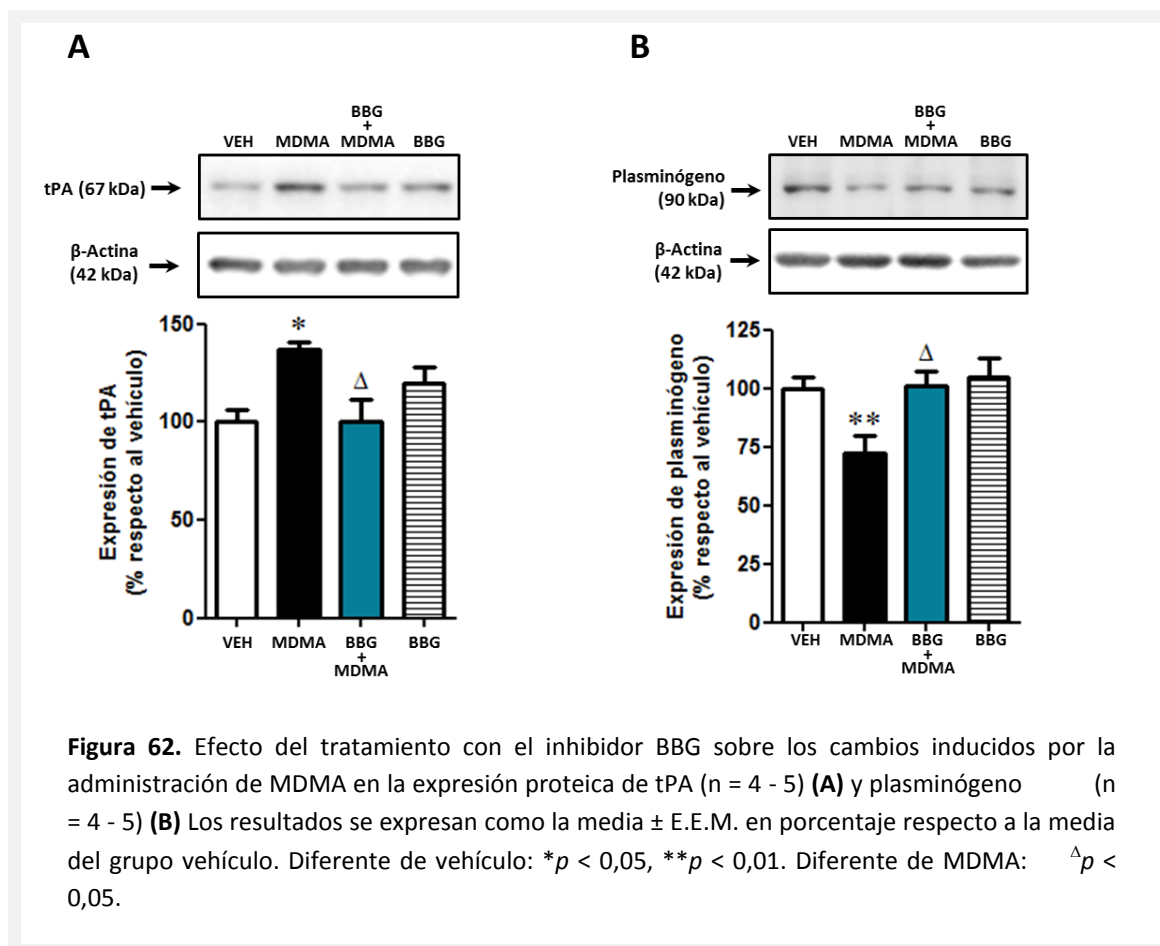
Para estudiar la posible relación entre la activación de los receptores P2X₇ y la neuroinflamación, con el incremento en la actividad de MMPs inducida por MDMA, se analizó el efecto del pretratamiento con BBG sobre los cambios generados por MDMA en la actividad proteolítica de MMP-9 y MMP-3, 1 y 3 horas después de la administración de MDMA, respectivamente (figura 61). El ANOVA de una vía revela la existencia de diferencias debidas al tratamiento para la actividad proteolítica de MMP-9 ($F_{3,16} = 10,35, p = 0,0005$) y MMP-3 ($F_{3,30} = 7,25, p = 0,0008$). El análisis *post-hoc* indica que el tratamiento con BBG previene el incremento generado por la droga en la actividad proteolítica de ambas MMPs.



8.4 Efecto de la administración de BBG sobre los cambios inducidos por MDMA en la expresión de tPA y plasminógeno

El efecto de la administración de BBG sobre los niveles de expresión proteica de tPA y plasminógeno se analizó mediante ANOVA de una vía, detectándose diferencias significativas

debidas a los tratamientos tanto para tPA (figura 62, A; $F_{3,15} = 4,72$, $p = 0,016$), como para plasminógeno (figura 62, B; $F_{3,15} = 4,94$, $p = 0,014$). El análisis de comparación múltiple Newman-Keuls determina que la administración de BBG previene el incremento en la expresión de tPA y la disminución de plasminógeno inducida por MDMA 3 horas después de la administración de la droga.

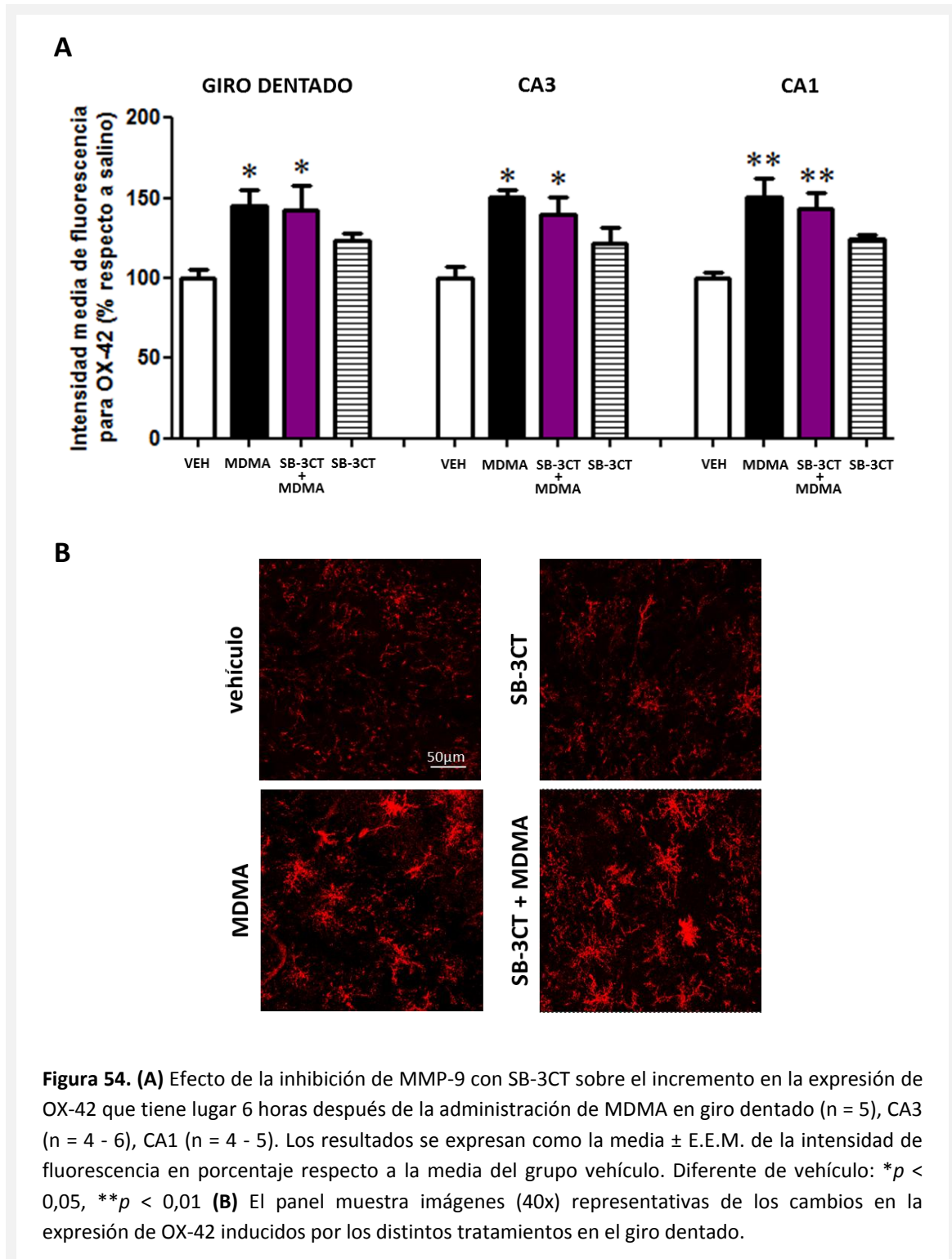


9. Efecto de la inhibición de la actividad de MMP-9 mediante SB-3CT sobre los cambios inducidos por MDMA en la respuesta neuroinflamatoria

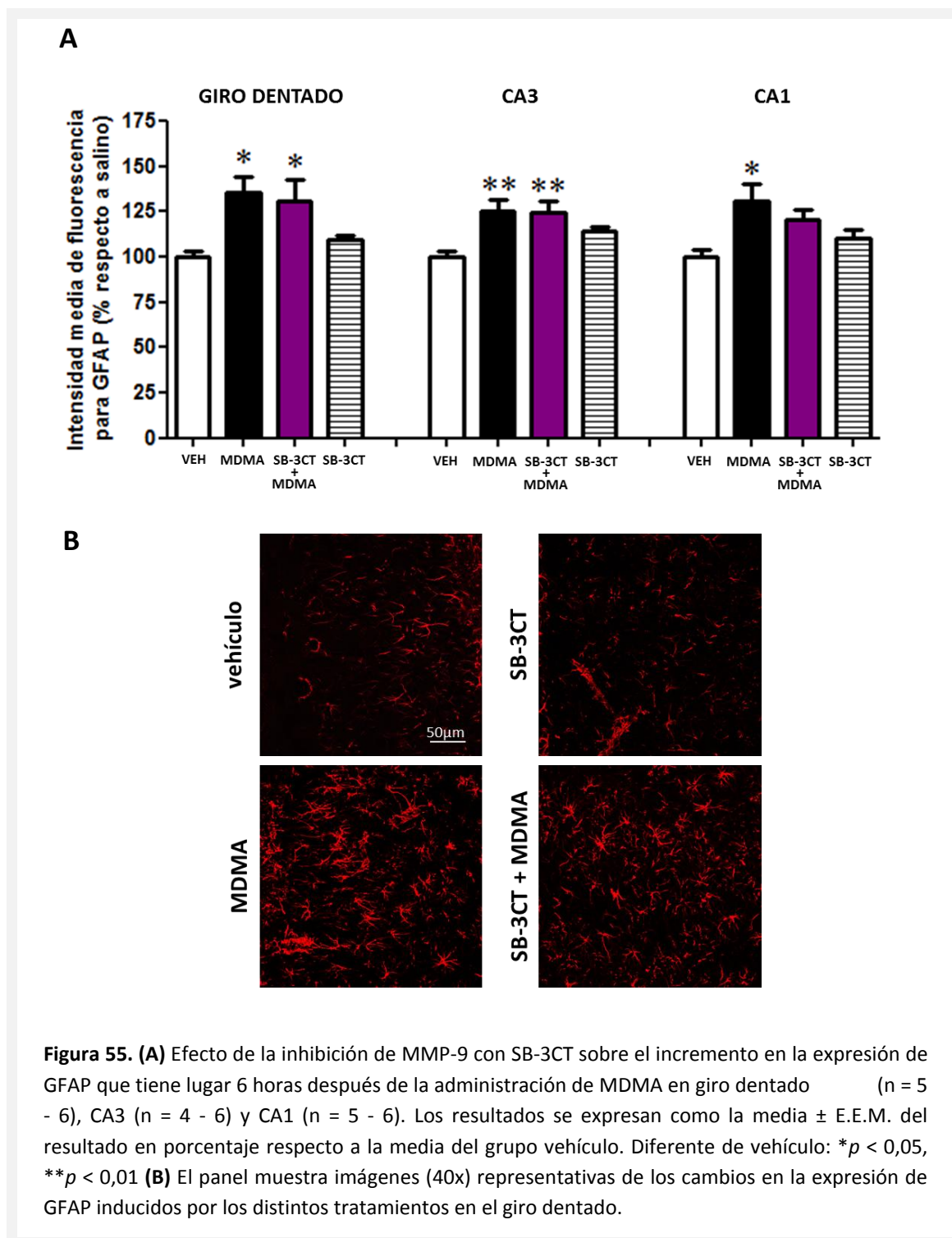
9.1 Efecto de SB-3CT sobre la activación microglial y astrocitaria

El efecto de la inhibición de MMP-9 con SB-3CT sobre el estado neuroinflamatorio inducido por MDMA 6 horas después de su administración se estudió sobre el incremento que produce la droga en la expresión de OX-42 y GFAP.

El ANOVA de una vía para la expresión de OX-42 muestra un efecto estadísticamente significativo de los tratamientos en el giro dentado ($F_{3,16} = 4,64$, $p = 0,016$), CA3 ($F_{3,16} = 8,42$, $p = 0,0014$) y CA1 ($F_{3,15} = 7,96$, $p = 0,0021$) (figura 54, A y B). El análisis *post-hoc* Newman-Keuls determina que el tratamiento con SB-3CT no previene el incremento que produce la MDMA en OX-42 en ninguna de las zonas del hipocampo.



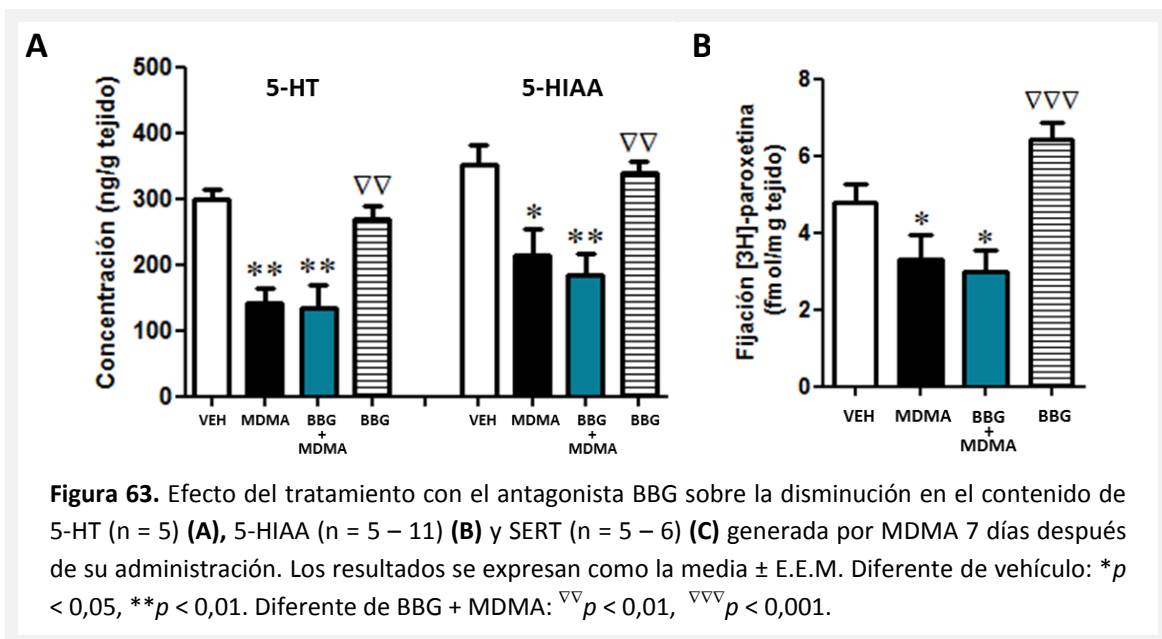
El ANOVA de una vía para la intensidad media de fluorescencia de GFAP muestra diferencias significativas debidas a los tratamientos en el giro dentado ($F_{3,18} = 5,13, p = 0,01$), CA3 ($F_{3,17} = 6,17, p = 0,005$) y CA1 ($F_{3,17} = 4,56, p = 0,016$) (figura 55, B y C). El test de comparación múltiple determina que la administración de SB-3CT no revierte el incremento de la intensidad media de fluorescencia para GFAP en ninguna de las zonas del hipocampo.



10. Efecto del antagonismo de receptores P2X₇ sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA

10.1 Niveles tisulares de 5-HT, 5-HIAA y densidad de SERT

Para conocer la implicación de la señalización a través de receptores P2X₇ y la activación de la respuesta neuroinflamatoria en la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por MDMA a largo plazo, se analizó el efecto de BBG sobre los cambios generados por MDMA en el contenido hipocampal de 5-HT, 5-HIAA y la densidad de SERT 7 días después de la administración de la droga (figura 63). El ANOVA de una vía detecta diferencias entre grupos para la concentración de 5-HT ($F_{3,16} = 11,43$, $p = 0,0003$), de 5-HIAA ($F_{3,17} = 8,73$, $p = 0,001$) y de la densidad de SERT ($F_{3,18} = 9,02$, $p = 0,0007$). El post-test Newman-Keuls aplicado a cada conjunto de datos revela que el tratamiento con BBG no previene las disminuciones generadas por MDMA en el contenido tisular de 5-HT, 5-HIAA y en la densidad de SERT.



11. Efecto de la administración de BBG y A-438079 sobre la hipertermia inducida por MDMA

La hipotermia o la prevención de la respuesta hipertérmica inducida por MDMA tienen un efecto neuroprotector parcial sobre el efecto neurotóxico que produce la droga a largo plazo. Además, la temperatura puede afectar a la integridad de la BHE. Para comprobar si el protocolo

de administración de los antagonistas del receptor P2X₇ afecta a la hipertermia, se analizó la temperatura rectal de los animales sometidos a los distintos tratamientos.

Los datos de temperatura rectal se analizaron mediante ANOVA de dos vías considerando los factores: tratamiento (vehículo, MDMA, MDMA + BBG y BBG) y tiempo (figura 64). Los resultados estadísticos demuestran que tanto el tratamiento ($F_{3,140} = 40,46$; $p < 0,0001$), como el tiempo ($F_{9,140} = 17,86$; $p < 0,0001$), tienen efecto sobre la temperatura rectal de los animales, existiendo además interacción entre ambos factores ($F_{27,140} = 24,21$; $p < 0,0001$). El post-test de Bonferroni, revela un incremento de la temperatura rectal de aproximadamente 2°C, a todos los tiempos analizados desde 0,5 horas después de la administración de MDMA, con un valor de $p < 0,001$ en todos los casos. Este aumento de temperatura inducido por la droga tiene lugar aunque haya sido administrado conjuntamente con BBG. Por lo tanto, la administración de BBG no modifica en ningún caso la hipertermia inducida por MDMA.

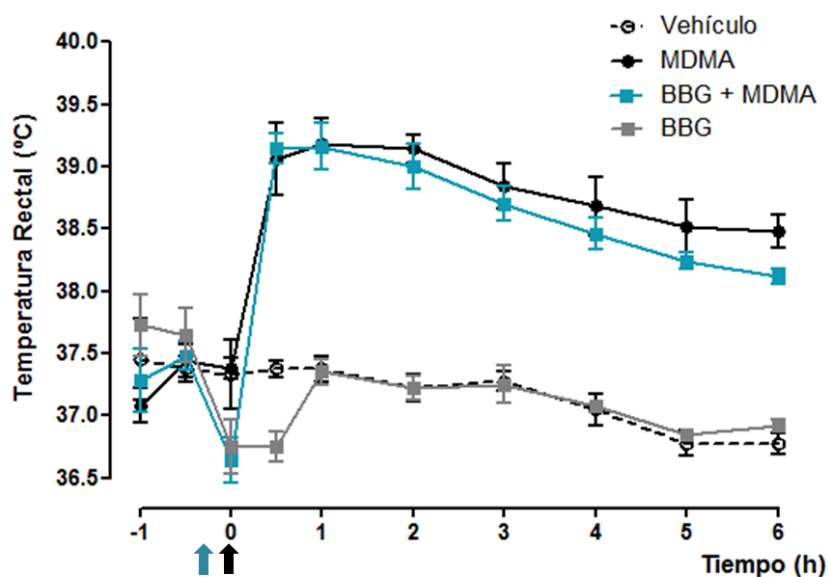


Figura 64. Efecto de la administración de BBG sobre la hipertermia inducida por MDMA. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la temperatura rectal ($n = 6 - 8$). La flecha negra indica el momento (0h) al que se administró MDMA o salino, mientras que la flecha azul muestra el momento (-10 minutos) al que se administró el antagonista o su vehículo.

De igual modo, se analizó el efecto del antagonista del receptor P2X₇, A-438079 sobre la respuesta hipertérmica generada por MDMA (figura 65). El ANOVA de dos vías revela un efecto del tratamiento ($F_{3,181} = 24,24$; $p < 0,0001$), del tiempo ($F_{11,181} = 34,27$; $p < 0,0001$) e interacción entre ambos factores ($F_{33,181} = 33,40$; $p < 0,0001$). Mediante el post-test de Bonferroni se evidencian diferencias entre el grupo tratado con vehículo y el resto de grupos en el momento

correspondiente a la administración de la primera inyección del inhibidor (-1h). Puesto que estas diferencias ya no se detectan media hora después es probable que dicho efecto se disolviera al incrementar el número de animales por grupo. Por otro lado, se observa un incremento de 1,5 °C media hora después de la administración de MDMA en comparación con el grupo tratado con vehículo, con un valor de $p < 0,001$. El aumento de temperatura se mantiene hasta las 6 horas, acercándose progresivamente a los valores de temperatura rectal del control. Este efecto ocurre como consecuencia de la administración de la droga incluso en presencia del A-438079, si bien en este grupo se pierde la significación estadística a partir de las 4h.

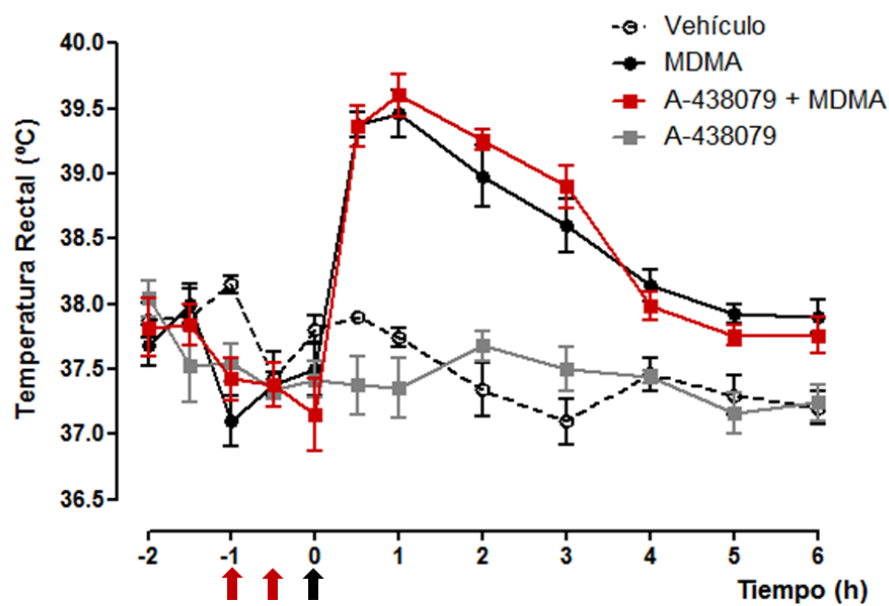


Figura 65. Efecto de la administración de A-438079 sobre la hipertermia inducida por MDMA. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la temperatura rectal ($n = 4 - 5$). La flecha negra indica el momento (0h) al que se administró MDMA o salino, mientras que las flechas rojas muestran los momentos (-1h y -0.5h) a los que se administró el antagonista o su vehículo.

DISCUSIÓN

La BHE actúa como defensa fisiológica para asegurar el correcto funcionamiento del SNC y salvaguardar su integridad frente a fluctuaciones iónicas, patógenos, neurotoxinas y metabolitos que pudieran ser perjudiciales [159, 163, 231]. Algunos de los principales factores asociados a la alteración de la BHE, tales como el estrés oxidativo [15, 16, 232], la neuroinflamación [13, 17, 18] y la hipertermia [19, 20] son eventos que ocurren tras la administración de MDMA [1, 94, 104].

En la presente Tesis Doctoral se ha evaluado el efecto de la administración de una única dosis neurotóxica de MDMA sobre la integridad de la BHE en el hipocampo de la rata, una estructura cerebral en la que se detectan cambios neuroquímicos a corto [83] y a largo plazo [3, 11, 104], y que está implicada en las alteraciones cognitivas que produce la droga [233]. Además, unas horas después de la administración periférica de MDMA se produce, en el hipocampo, un incremento en la generación de radicales libres [95, 96] y una disminución de las defensas antioxidantes [118, 234].

El efecto de la MDMA sobre la permeabilidad de la BHE se analizó mediante la cuantificación de la extravasación del colorante Azul de Evans como trazador exógeno y de la IgG endógena. Los resultados revelan un incremento en la concentración del colorante en el hipocampo de la rata 2 horas después de la administración de la droga, así como un aumento transitorio de la extravasación de IgG endógena 1 y 3 horas después del tratamiento. Tanto el Azul de Evans como la IgG son marcadores comúnmente utilizados en la evaluación de la permeabilidad de la BHE [30, 235, 236].

El colorante Azul de Evans es una molécula de pequeño tamaño que puede utilizarse como trazador de alto peso molecular gracias a que, una vez administrada intravenosamente, se transporta fuertemente unida a la albúmina sérica formando un complejo de 69 kDa [226]. Por lo tanto, la detección de Azul de Evans en el hipocampo indica, no sólo que la permeabilidad de la BHE está incrementada en esta área cerebral bajo influencia de la MDMA, sino que la albúmina accede al tejido cerebral desde la sangre. En patologías como la enfermedad de Alzheimer [237], la isquemia [238] y la epilepsia [239-241] se detecta la presencia intracerebral de albúmina como consecuencia del incremento en la permeabilidad de la barrera. La albúmina extravasada puede ser captada por las células del sistema nervioso e inducir modificaciones que contribuyan a la alteración de la BHE. Estudios realizados en cultivos de astrocitos revelan que la albúmina es capaz de mediar la liberación de MMP-9 vía activación de p38 MAPK inducida por estrés oxidativo [242]. En el hipocampo, durante el *status epilepticus* (una complicación

frecuentemente asociada a la intoxicación por MDMA [243, 244] se produce la extravasación de albúmina y su captación por astrocitos, neuronas y microglía [239-241]. Además de la albúmina, la IgG circulante aparece en el parénquima 1 y 3 horas después de la administración de MDMA. La IgG es una proteína plasmática de alto peso molecular (150 kDa) que en condiciones normales se encuentra confinada en la zona luminal de los capilares sanguíneos y está ausente en el tejido cerebral. Por lo tanto, al igual que la albúmina, su presencia en el parénquima indica una mayor permeabilidad de la BHE [235, 236, 245]. Únicamente existe un estudio publicado que examina el efecto de la administración aguda de una alta dosis de MDMA (40 mg/Kg, i.p.), próxima a la dosis letal en rata, sobre la permeabilidad de la BHE, en el cual se observa extravasación de Azul de Evans y de albúmina, además de un incremento en el contenido de agua en cerebelo, hipocampo, corteza, tálamo e hipotálamo [106].

Aunque la extravasación de proteínas plasmáticas hacia el interior del SNC se considera indicativo de un incremento anormal en la permeabilidad, puede llevarse a cabo sin alteración de la integridad de la BHE como consecuencia del aumento en la transcitosis endotelial. En algunas situaciones patológicas, el incremento en la permeabilidad de la BHE precede a su rotura. En modelos de isquemia por oclusión de la arteria media cerebral, el aumento inicial de la permeabilidad que tiene lugar tras la reperfusión es consecuencia del incremento en el número de caveolas y en la tasa de transcitosis [246], mientras que la alteración de las uniones estrechas y el incremento del transporte paracelular inducido por la rotura de la BHE suceden con posterioridad [246, 247].

Tras la administración de metanfetamina se produce la extravasación de proteínas plasmáticas [225]. Aunque estudios en cultivos determinan que el tratamiento con metanfetamina induce la transcitosis endotelial sin alterar las uniones estrechas [248], el incremento en la inmunorreactividad de IgG que tiene lugar en el estriado de ratones tratados con dicha droga colocaliza con las zonas en las que se detecta un aumento de la actividad gelatinasa [222], lo que sugiere un efecto de la metanfetamina sobre la permeabilidad como consecuencia de una alteración en la integridad de la BHE inducida por metaloproteinasas.

Para estudiar si el acceso de proteínas plasmáticas al tejido hipocampal tras la administración de MDMA se desarrolla en condiciones de rotura de la BHE, se analizó la integridad de las uniones estrechas, mediante la expresión de claudina-5, y de la lámina basal, mediante la expresión de laminina y colágeno-IV.

Los resultados de esta Tesis Doctoral revelan una disminución en la expresión de claudina-5 1 y 3 horas después de la administración de MDMA, en aparente correlación temporal con la extravasación de proteínas plasmáticas, evidenciándose de este modo una posible alteración en la vía de paso paracelular. La disminución en la expresión de claudina-5 está relacionada con el incremento de la permeabilidad y la apertura de la BHE durante la isquemia cerebral [30, 249, 250], la encefalomiелitis autoinmune experimental [251], el fallo hepático agudo [252] y el traumatismo craneoencefálico [253]. Claudina-5 es la principal proteína de las uniones estrechas endoteliales dentro del SNC y la delección de su gen induce la pérdida de la permeabilidad selectiva de la barrera [254].

Aunque la primera barrera física que restringe el paso de sustancias entre la sangre y el SNC son las uniones estrechas endoteliales, la lámina basal que engloba a todas las células de la unión neurovascular también contribuye al mantenimiento de una baja permeabilidad [255]. La lámina basal es una estructura compleja compuesta principalmente de laminina y colágeno-IV, sobre los que se anclan gran variedad de proteínas y proteoglicanos [12, 29, 166]. La degradación de los componentes de la lámina basal supone una pérdida de anclaje y de señalización para las células endoteliales, lo que afecta a la integridad y funcionalidad de las uniones estrechas y de la propia BHE [29, 250]. El presente estudio muestra por primera vez que la administración de una única dosis de MDMA, además de reducir transitoriamente la expresión de claudina-5, produce en el hipocampo de la rata una disminución en la expresión de las proteínas de la lámina basal, laminina y colágeno-IV que se mantiene incluso después de 24 horas. La alteración de la integridad de la BHE debida a la disminución en la expresión de laminina y colágeno-IV se ha observado en situaciones de daño cerebral por traumatismo [256] y durante la isquemia cerebral [257], pudiendo ser prevenida en este último modelo mediante hipotermia moderada.

La reducción en la expresión de estas proteínas puede ser consecuencia de su degradación proteolítica. La expresión de laminina y colágeno-IV se encuentra reducida en condiciones de inflamación sistémica como consecuencia de un proceso degradativo, apreciándose un incremento en la fragmentación de colágeno-IV que se reestablece mediante la inhibición de la actividad de MMP-9 [250]. Tanto claudina-5 [30, 258, 259], como laminina [222, 260, 261] y colágeno-IV [250] son degradadas por metaloproteinasas. Las MMPs son endopeptidasas que participan en la remodelación de la matriz extracelular en procesos de migración celular, angiogénesis y plasticidad sináptica. Estas proteasas, especialmente las gelatinasas MMP-9 y MMP-2, están sobreexpresadas y sobreactivadas en condiciones

patológicas que cursan con rotura de la BHE [15, 30-32]. En la alteración de la BHE que tiene lugar durante la isquemia cerebral, el incremento en la expresión y actividad de MMP-2 parece ser el responsable de la apertura inicial y reversible de la barrera, mientras que el aumento en la expresión y actividad de MMP-9 degrada las uniones estrechas y las proteínas de la lámina basal agravando el infarto cerebral, la generación de edema, la transformación hemorrágica del ictus y la neurodegeneración [15, 31].

El tratamiento con una única dosis de MDMA no modifica los niveles de expresión ni la actividad proteolítica de MMP-2, que es una metaloproteínasa de acción constitutiva, mientras que incrementa la actividad de las proteasas inducibles, MMP-9 y MMP-3. Puesto que el aumento en la actividad MMP-9 ocurre 1 hora después de la administración de la droga, y el de MMP-3 no es evidente hasta pasadas 3 horas, parece que el efecto inicial sobre la degradación de claudina-5, colágeno-IV y laminina asociada al incremento transitorio en la permeabilidad de la BHE sería consecuencia de la acción de MMP-9, mientras que MMP-3 contribuiría al mantenimiento de una baja expresión de proteínas de la lámina basal. Estas observaciones son consistentes con los resultados previos de nuestro laboratorio que demuestran un incremento en la actividad y expresión de MMP-9, en asociación a la extravasación de IgG en el estriado de ratones tratados con metanfetamina [222]. Además, la inhibición de la actividad de MMPs mediante la administración del inhibidor de amplio espectro BB-94 en este modelo, previene la degradación de laminina y reduce el efecto inducido por dicha droga psicoestimulante sobre la permeabilidad de la BHE.

La zimografía en gel indica cambios en la actividad *ex-vivo* de MMP-9 y MMP-3 con respecto a los niveles de expresión proteica. La administración de MDMA, además de aumentar la actividad proteolítica, induce un incremento en la expresión tanto de la forma activa como proactiva de MMP-9 y MMP-3, lo que indica un aumento en su producción. Los niveles de expresión de estas MMPs inducibles son muy bajos en condiciones fisiológicas, no obstante, estímulos como el estrés oxidativo [16, 262] y las citoquinas proinflamatorias [250, 263] mediante la activación de la vía de señalización NF- κ B [264], incrementan su transcripción génica y su expresión proteica [14, 26-28]. El metabolismo de MDMA y de las monoaminas liberadas que tiene lugar tras la administración de la droga, produce gran cantidad de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno de forma detectable a tiempos muy cortos [50, 56, 87, 94-96] que podrían participar en la producción y activación de las MMPs. De igual forma, las citoquinas proinflamatorias son factores que se han visto involucrados en la inducción de la expresión de MMPs y su activación [26, 232, 265].

La señalización a través de MAPKs también se ha visto relacionada con la alteración de la BHE. Existen evidencias de la implicación de la activación de p38 MAPK tanto en la disminución de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas [266], como en la consecuente generación de edema vasogénico [267] durante la isquemia cerebral. Aunque los mecanismos moleculares no están esclarecidos, la activación de MAPKs participa en la regulación a la alza de la expresión de MMP-9. Estudios en cultivos de astrocitos [265, 268] o modelos experimentales *in vivo* de encefalitis [269] y de isquemia [267, 270] asocian la activación de algunas MAPKs a la producción de MMP-9, estando implicadas un tipo u otro de kinasa de forma dependiente del estímulo generador [242].

Puesto que el incremento de MMP-9 detectado tras la administración de MDMA ocurre tanto a nivel de la actividad como de la expresión proteica, analizamos el efecto de la droga sobre la fosforilación de p38, ERK1/2 y JNK. Los resultados indican que la MDMA produce, al mismo tiempo que incrementa la expresión y actividad de MMP-9, un aumento en la fosforilación de p38 MAPK y una reducción en la de ERK1/2, que se recuperan en las horas posteriores, mientras que la fosforilación de JNK se reduce ligeramente con posterioridad (3 y 6 horas), recuperándose las condiciones basales a las 24 horas. El perfil de incremento de la expresión de MMP-9 se asemeja al encontrado para la fosforilación de p38, lo que concuerda con una posible implicación de esta kinasa en su producción. *In vitro*, los astrocitos pueden activarse y secretar MMP-9 en respuesta a albúmina por un mecanismo que involucra estrés oxidativo y activación de p38 MAPK [242]. Sin embargo, a pesar de existir extravasación de albúmina a tiempos cortos tras la administración de MDMA, la activación astrocitaria se detecta con posterioridad al incremento en la expresión de MMP-9 y p38 MAPK.

Algunos estudios determinan que la administración de dosis bajas de MDMA inducen la fosforilación de ERK1/2 a través de la activación de receptores de dopamina D1 en el núcleo accumbens de la rata [271] y el estriado del ratón [272]. Sin embargo, los resultados del presente estudio demuestran una disminución de la fosforilación ERK1/2 en el hipocampo de la rata tras la administración de la droga. Esta disminución parece ocurrir de forma opuesta al incremento detectado en la fosforilación de p38, lo que sugiere algún tipo de interacción entre ambas MAPKs, como se observa *in vitro*, en la regulación de la expresión de MMP-2 durante la migración de células cancerosas [273] o en la producción de MMP-1 por monocitos [274]. Respecto a la fosforilación de JNK, estudios previos de nuestro grupo de investigación determinan que su inhibición previene el incremento en MMP-9 inducido por metanfetamina, así como la degradación de laminina y la alteración de la BHE que tiene lugar en el estriado de

ratones tras la administración de esta droga [222]. No obstante, la administración de MDMA reduce la fosforilación de JNK en el hipocampo de la rata con posterioridad al efecto que induce en las otras MAPKs, por lo que no parece ser la responsable de los cambios iniciales inducidos por esta droga sobre la integridad de la BHE.

Por otra parte, la disminución en la fosforilación de ERK1/2 y de JNK tras la administración de MDMA podría ser consecuencia del efecto de la droga en la sobreexpresión de proteínas fosfatasa de actividad dual (*Dual Specificity Phosphatase*, DUSP) encargadas de la inactivación de MAPKs mediante desfosforilación. Estudios en ratones revelan que la administración de MDMA induce la expresión de fosfatasas dusp 1, 5 y 14 en el estriado, pudiendo ser un mecanismo implicado en la disminución de la fosforilación de ERK [272].

La aparición de IgG y de Azul de Evans en el hipocampo, junto a la disminución en la expresión de claudina-5, laminina y colágeno-IV indican una alteración en la integridad de la BHE tras la administración de MDMA, que está asociada a un rápido y transitorio incremento en la actividad y expresión de MMP-9 y MMP-3. Considerando el curso temporal de los efectos producidos por MDMA, la alteración inicial de la BHE parece ser consecuencia del incremento en MMP-9, que es la proteasa cuya expresión y actividad se encuentra incrementada a un tiempo más corto tras la administración de la droga. Para confirmar esta hipótesis, se estudiaron los cambios inducidos por MDMA tras la inhibición específica de la actividad de MMP-9 mediante la administración sistémica de SB-3CT, un inhibidor selectivo de gelatinasas que atraviesa la BHE [275].

En condiciones fisiológicas, las MMPs se mantienen inhibidas en forma de zimógeno como consecuencia del establecimiento de un enlace entre el grupo tiol del residuo cisteína del propéptido y el átomo de zinc del centro catalítico [276]. Tanto el inhibidor SB-3CT como su metabolito activo se unen a través del anillo tiirano que presentan en su molécula al centro catalítico de las MMPs. Como consecuencia, se establece un enlace tioeter que bloquea muy débilmente el centro activo [277], siendo las constantes de inhibición de SB-3CT y su metabolito para MMP-9 $K_i = 400\text{nM}$ T y $K_i = 160\text{nM}$ respectivamente [275]. No obstante, en el caso particular de las gelatinasas, la unión al centro activo induce la formación de un tiolato en el anillo tiirano del SB-3CT que le permite interactuar con el átomo de zinc de su centro activo con mayor eficacia ($K_i = 2.1\text{ nM}$ para MMP-9) frente al resto de MMPs, siendo ésta la base de la selectividad [275, 277].

El pretratamiento con SB-3CT previene el incremento inducido por MDMA en la actividad proteolítica y en la expresión de la forma proactiva de MMP-9. Tanto en modelos de isquemia [278], como de daño cerebral por traumatismo [279], el tratamiento con SB-3CT es capaz de inhibir la actividad MMP-9 y de disminuir la expresión de la forma proactiva. Este efecto sugiere que la prevención de SB-3CT tiene lugar, no sólo por su unión al centro activo de MMP-9 inhibiendo la actividad proteasa, sino también por su capacidad para inhibir el incremento en la expresión proactiva de MMP-9. Aunque los mecanismos por los que tiene lugar dicho efecto sobre la expresión proteica son desconocidos, SB-3CT parece estar involucrado en un mecanismo de autorregulación de la expresión de la proteína a nivel de la transcripción. En el presente estudio, a pesar de que los incrementos en la expresión de MMP-9 y de la fosforilación de p38 MAPK coinciden temporalmente tras la administración de MDMA, el tratamiento con SB-3CT no modifica la activación de la MAPK, por lo que no parece estar involucrada en el efecto preventivo de la sobreexpresión de la forma proactiva de MMP-9 que produce el inhibidor.

SB-3CT previene la proteólisis de laminina [260, 278] y preserva la integridad de la unión neurovascular reduciendo la formación de hemorragias [278] durante la isquemia cerebral. Además, este inhibidor rescata a las neuronas de la apoptosis en condiciones de isquemia [15] y de daño en la médula espinal [262]. Respecto a las proteínas de las uniones estrechas, se ha visto que la utilización de SB-3CT previene la disminución de ZO-1 inducida por MMP-9 en el cerebro isquémico [278] y la de ocludina inducida por MMP-2 en condiciones de privación de oxígeno, mientras que no es eficaz en la prevención de la redistribución de claudina-5 que parece ser dependiente de caveolina-1 en dicho modelo experimental [280]. En el presente estudio, la disminución en la expresión de claudina-5 detectada tras la administración de MDMA se previene con SB-3CT, lo que indica que dicha disminución es consecuencia de la sobreactivación de MMP-9 inducida por la droga.

Aunque la gran mayoría de los estudios relacionan la alteración de la BHE con la sobreexpresión de gelatinasas, MMP-3 también contribuye al proceso degradando componentes de la lámina basal y favoreciendo la infiltración leucocitaria durante la neuroinflamación [31, 281]. Además, MMP-3 puede actuar activando formas latentes de otras MMPs [282], estando de este modo involucrada en la conversión de pro-MMP9 a su forma activa [283]. Aunque el incremento en la expresión de pro-MMP-3 comienza a manifestarse una hora después de la administración de MDMA, el aumento en su actividad proteolítica no es evidente hasta las 3 horas, momento en el cual ya está disminuida la actividad MMP-9; por lo que su implicación en la conversión de MMP-9 hacia su forma activa parece poco probable en este modelo.

Además de las MMPs, existen otros sistemas proteolíticos involucrados en la alteración de la BHE, siendo quizá el más estudiado el tPA que, administrado de forma exógena es el único fármaco aceptado como tratamiento agudo del ictus isquémico [284], a pesar de asociarse a un alto riesgo de transformación hemorrágica por su acción sobre la BHE [31]. Tanto el tPA endógeno [285, 286] como el exógeno administrado por vía intracerebroventricular [285, 287, 288] incrementan la permeabilidad de la BHE y promueven la excitotoxicidad en modelos de isquemia. Aunque la plasmina generada por la proteólisis de plasminógeno mediada por tPA es capaz de degradar por sí misma componentes de la lámina basal, se ha postulado que el principal mecanismo por cual tPA ejerce este efecto deletéreo sobre la BHE es a través de la activación de MMP-3 y MMP-9 desde sus formas inactivas [31, 287]. La plasmina participa directamente en la activación de MMP-3 desde su zimógeno [21, 31] mientras que para MMP-9 este efecto parece estar mediado por la interacción de tPA con el receptor *scavenger* LRP-1 [36]. La interacción tPA/LRP-1 desencadena la activación de la vía NF- κ B [289] e incrementa la expresión de MMP-9 [290] que a su vez produce la degradación de claudina-5 y la generación de edema cerebral [217, 291]. Este mecanismo de señalización parece ser crucial en la regulación del engrosamiento astrocitario, el desanclaje de los pies astrocitarios a la lámina basal y el consecuente incremento en la permeabilidad de la barrera inducidos por tPA durante la isquemia cerebral [36].

En el presente estudio se observa que, una hora después de la administración de MDMA se encuentran incrementadas tanto la expresión del receptor LRP-1 como la de tPA, de forma que su interacción podría estar mediando el incremento de MMP-9 observado a este mismo tiempo. El aumento en la expresión de tPA, aunque no del receptor, se mantiene hasta 6 horas después de la administración de MDMA, siendo máximo a las 3 horas, momento en el cual también se aprecia un aumento en su actividad y una disminución de plasminógeno, su principal sustrato endógeno. Los resultados sugieren la posibilidad de que tPA participe en la alteración de la integridad de la BHE inducida por MDMA de manera tanto directa como indirecta. Inicialmente la interacción tPA/LRP-1 podría estar incrementando la expresión de MMP-9, si bien serían necesarios estudios complementarios de colocalización, co-inmunoprecipitación y el uso de antagonistas para confirmar dicha interacción y efecto. Por otro lado, tanto tPA como [292, 293] la plasmina [294, 295] son capaces de utilizar como sustrato y proteolizar laminina, de este modo podrían contribuir directamente al mantenimiento de la baja expresión de las proteínas de la lámina basal que se detecta hasta 24 horas después de la administración de MDMA, o bien hacerlo a través de la activación de MMP-3.

Además de su implicación en la señalización por tPA, LRP-1 interviene en el aclaramiento de múltiples proteasas como medida reguladora [296]. Evidencias *in vitro* indican que el tPA activo puede ser captado por los astrocitos mediante endocitosis mediada por LRP-1 [297]. De igual modo LRP-1 puede unir directamente MMP-9 y participar en su aclaramiento mediante endocitosis dirigida a la degradación intracelular [298]. El aclaramiento de MMP-9 mediante LRP-1, cuya expresión está incrementada una hora después de la administración de MDMA, podría ser un mecanismo regulador de la alteración de la BHE que explicaría la corta duración del aumento en la expresión y actividad MMP-9 detectados en esta Tesis Doctoral.

Frecuentemente, el incremento en la permeabilidad de la BHE, tanto reversible como irreversible, conduce a la acumulación de líquido extravascular que se introduce en el tejido nervioso desde la sangre, junto a las proteínas plasmáticas, generándose edema vasogénico [35, 171, 299]. Este tipo de edema intersticial se origina como consecuencia de la alteración de la BHE y es frecuente en condiciones de traumatismo cerebral [300, 301] y en la segunda fase del proceso isquémico [302-304]. Mediante estudios de neuroimagen, los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que la MDMA induce la extravasación de proteínas plasmáticas con generación de edema.

La resonancia magnética permite estudiar cambios en el microdinamismo del agua y determinar el desarrollo de procesos patológicos, como la formación de edema *in vivo*. Utilizando una secuencia de imágenes de eco de spin ponderada en T_2 se pueden visualizar regiones con mayor movilidad del agua como zonas brillantes o hiperintensas, lo que permite localizar las zonas edematosas en condiciones patológicas [305]. Además, la determinación del parámetro T_2 permite el análisis cuantitativo de los cambios respecto a la movilidad del agua que tienen lugar en el tejido, asociándose valores elevados de T_2 a un acumulo de agua [306]. Tras la administración de MDMA, las imágenes ponderadas en T_2 determinan un incremento difuso de la intensidad de la señal en el hipocampo, respecto a las condiciones basales para el mismo animal. Además, los valores del parámetro T_2 aumentan, aproximadamente un 10%, desde 2,5 hasta 6 horas después de la administración de MDMA, en comparación con los valores basales. Este incremento de T_2 refleja la formación en el hipocampo de edema difuso por efecto de la droga, siendo éste un efecto con carácter transitorio, ya que desaparece a las 24 horas.

De forma complementaria, las imágenes de difusión suponen un método sensible que da idea del desplazamiento molecular del agua en los tejidos. La determinación del parámetro ADC permite identificar modificaciones en la difusión del agua respecto a su localización. De este modo, valores bajos de ADC se asocian a condiciones de baja difusión que se corresponden con

la distribución intracelular del acúmulo de agua, mientras que valores elevados revelan una mayor difusión y sugieren localización extracelular [35]. Valores altos de T_2 y de ADC son indicativos de la existencia de edema intersticial, mientras que valores altos de T_2 y bajos de ADC reflejan la formación de edema por acumulación de agua intracelular [35]. Mediante la combinación de estos parámetros se pueden identificar y diferenciar el edema vasogénico del citotóxico (acumulación intracelular de agua como consecuencia del desequilibrio iónico de sodio por la alteración del transporte activo debido a la depleción energética) y determinar su progresión temporal o coexistencia en la isquemia [216, 307], en el *status epilepticus* [308-311], el traumatismo craneoencefálico [301, 312-314] y en la hemorragia cerebral [315].

Entre 3 y 6 horas después de la administración de MDMA se aprecian variaciones en los valores del parámetro ADC en el hipocampo, indicando con ello cambios en la progresión temporal del edema difuso inducido por la droga, que apuntan a la acumulación temprana (3h) de agua extracelular, frente a la acumulación intracelular algo más tardía (6h). El incremento en T_2 indica la formación de edema. Este resultado junto a los cambios observados en el parámetro ADC, la extravasación de proteínas plasmáticas y la disminución de la expresión de claudina-5 sugiere que el edema difuso producido tras la administración de MDMA tiene su origen en la alteración de la BH, es decir, es un edema de carácter vasogénico. En modelos de isquemia [316], de traumatismo cerebral [317] y de hemorragia subaracnoidea [318] este tipo de edema se desarrolla como consecuencia de la disminución de la expresión de claudina-5 asociada a la sobreactivación de MMP-9.

Estudios de microscopía electrónica ponen de manifiesto modificaciones de la lámina basal, como la disminución del grosor y la aparición de vacuolas, durante la progresión del edema cerebral [319]. Este dismantelamiento de la lámina basal conduce a la pérdida de contacto entre las células endoteliales y los pies astrocitarios, incrementándose la permeabilidad de la BHE y generándose edema [320]. Concretamente, la disminución en la expresión de colágeno-IV, se ha visto correlacionada con dicho efecto tanto en la fase de re-perfusión de la isquemia [321] como en la hemorragia subaracnoidea [322]. La disminución en la expresión de laminina y colágeno-IV mediada por la MDMA podría estar contribuyendo al incremento de la permeabilidad de la BHE y la generación de edema inducida por la droga. No obstante, los valores basales de T_2 se recuperan pasadas 24 horas desde la administración de MDMA, tiempo al cual la expresión de estas proteínas aún se encuentra disminuida, lo que indica que el edema desaparece a pesar de mantenerse la alteración de la lámina basal. Por lo tanto, debe ser la alteración de la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, estructuras esenciales en la

restricción del transporte paracelular de agua [173], la principal responsable de la generación del edema vasogénico en este modelo. Varias evidencias indican que, durante la isquemia cerebral la disminución de la expresión de claudina-5 se asocia a la generación de edema, detectado como un incremento en el parámetro T_2 [323, 324]. El pretratamiento con el inhibidor de MMP-9, SB-3CT previene la disminución de la expresión de claudina-5 que tiene lugar una hora después de la administración de MDMA, lo que señala a la sobreactivación de esta metaloproteinasa como la inductora de la alteración de la BHE inducida por la droga. Además, se observa la prevención del incremento en T_2 inducido por MDMA a las 2,5 horas, lo que confirma que la alteración de la BHE producida por MMP-9 es la responsable de la generación de edema vasogénico en este modelo. Por otro lado, el aumento en la expresión de LRP-1 que induce la MDMA a la hora también se previene mediante la inhibición de MMP-9 con SB-3CT. Esto indica que la sobreexpresión de LRP-1 es consecuencia del incremento en la actividad de la metaloproteinasa. Probablemente LRP-1 contribuya a los cambios perivasculares que inducen la formación de edema tras la administración de MDMA, ya que durante la isquemia puede detectarse el incremento de su expresión en la zona abluminal de la unidad neurovascular de las regiones en las que se localiza edema perivascular, además de ser responsable del desanclaje de los pies astrocitarios a la lámina basal como consecuencia de su interacción con tPA [325, 326]. Los resultados también dejan abierta la posibilidad de que LRP-1 esté participando en aclaramiento de MMP-9 en este modelo, lo cual explicaría que no se detecte el aumento de dicho receptor tras la inhibición de la actividad de MMP-9 con SB-3CT.

La observación de valores bajos de ADC 6 horas después de la administración de MDMA, en combinación con valores altos de T_2 , sugieren la acumulación de agua intracelular. Dicha acumulación podría ser consecuencia de la resolución del edema vasogénico al ser captada el agua intersticial por los astrocitos con el fin de redistribuirla y eliminarla hacia otras regiones. La redistribución de los cambios de agua tisular, tanto en condiciones fisiológicas [152, 173] como patológicas [171, 327] tiene lugar principalmente a través de los canales AQP4 localizados en los pies astrocitarios, que median el flujo bidireccional de agua. Los cambios en la expresión perivascular de AQP4 se correlacionan con las variaciones del ADC durante la evolución del edema en condiciones patológicas [198, 207, 312, 328-331]. En el presente estudio se observan cambios temporales en la expresión perivascular de AQP4, encontrándose disminuida 1 hora después de la administración de MDMA e incrementada a las 6 horas.

La disminución temprana de la expresión de AQP4 se correlaciona temporalmente (1h) con la disminución de claudina-5, laminina y colágeno-IV y la extravasación de IgG inducidas por

MDMA. Una baja expresión perivascular de AQP4 se asocia con la generación de edema vasogénico en condiciones de daño cerebral por traumatismo [245] e isquemia cerebral [332]. Además, su redistribución hacia regiones no perivasculares, debida a la alteración de la asociación entre la lámina basal y los pies astrocitarios [35], se observa en la isquemia cerebral y la encefalomiелitis autoinmune experimental [333]. La pérdida de AQP4 limita la turgencia celular y reduce el grado de formación del edema citotóxico [334], no obstante, en condiciones de edema vasogénico, en las que la acumulación de agua depende principalmente de la alteración de la BHE, esta pérdida afectaría principalmente a su resolución.

La sobreexpresión de AQP4 perivascular se observa en modelos de neuroinflamación [198], daño cerebral por traumatismo [312, 331] e isquemia [207, 328-330] durante la fase de resolución del edema vasogénico en correlación a los cambios detectados en el parámetro ADC. Tras la administración de MDMA la sobreexpresión de AQP4 detectada a las 6 horas, tiempo al cual se detectan los valores más bajos de ADC, refuerza la hipótesis de la resolución del edema vasogénico. Además, a este tiempo se observa un incremento en la expresión de GFAP con engrosamiento de las células astrocitarias que podría estar relacionado con el acúmulo de agua en este tipo celular.

La inhibición de MMP-9 mediante el pretratamiento con SB-3CT previene los cambios en la expresión de AQP4 inducidos por MDMA. El efecto protector ejercido por la inhibición de MMP-9 sobre el aumento de AQP4 a las 6 horas resulta consecuente con el hecho de que, al no generarse edema de origen vasogénico a las 2,5 horas su resolución por la sobreexpresión de AQP4 a tiempos posteriores resulta innecesaria. Sin embargo, el inhibidor SB-3CT no previene el incremento en el parámetro T_2 , ni el aumento en la expresión de GFAP observados 6 horas después de la administración de MDMA. Aunque AQP4 estimula la expresión de GFAP tras la administración de LPS en cultivos de astrocitos o en el cerebro del raton sometido a daño tisular [335], existen evidencias contradictorias respecto a su correlación en modelos *in vivo*, ya que el incremento de AQP4 y GFAP se observa tras la isquemia [336] y la esclerosis múltiple [337], mientras que en modelos de Parkinson esta correlación es negativa [338]. Aparentemente, esta relación depende del contexto patológico y podría estar relacionada con la activación astrogliar independientemente del edema cerebral, ya que la deficiencia de AQP4 potencia la gliosis, conduciendo a la activación de la vía NF- κ B que incrementa la producción de IL-1 β y TNF- α [338]. La falta de prevención del incremento en T_2 a las 6 horas por parte de SB-3CT, sugiere que la acumulación intracelular de agua detectada a este tiempo, además de ocurrir como mecanismo

de resolución del edema vasogénico, podría ser consecuencia de otros mecanismos independientes de la rotura de la barrera, es decir, podría tener en parte carácter citotóxico.

Por lo general, el edema citotóxico es el resultado de la disminución de la producción de ATP por agotamiento de las reservas energéticas y alteración mitocondrial que provoca el fallo del transporte activo de iones, acumulándose sodio intracelular que induce la entrada de agua en la célula a favor del gradiente osmótico [339, 340]. De este modo se origina edema cerebral en la isquemia [216, 307] y en el daño cerebral por traumatismo [301, 314]. En estas patologías el edema citotóxico aparece con anterioridad y es mucho más grave que el vasogénico, originado como consecuencia de la alteración de la BHE con posterioridad [216, 307, 312, 313]. La disminución de las reservas energéticas y del contenido celular de ATP [87, 341] y la alteración de la estructura y el funcionamiento mitocondrial [87, 342] son condiciones que también se producen tras la administración o el consumo de MDMA, y que podrían inducir la generación de edema citotóxico. Además, es necesario tener en cuenta que otros factores como la hipertermia, la hiponatremia asociada a la ingesta de cantidades masivas de agua para prevenir la deshidratación [343-348], la alteración de la secreción de vasopresina [349, 350] y los cambios asociados al fallo hepático y renal [351] que tienen lugar tras la administración o el consumo de MDMA son factores que se han visto asociados a la generación de edema cerebral [20, 252, 352, 353]. I.

Los resultados de esta Tesis Doctoral aportan evidencias suficientes que indican que la MDMA induce de forma temprana la alteración de la BHE por la acción de proteasas, a la que se asocia la formación transitoria de edema. Esta progresión de sucesos se aprecia de manera similar en modelos de neuroinflamación por administración intracerebral de citoquinas [198], en donde la respuesta neuroinflamatoria induce la alteración de la BHE y la generación de edema vasogénico asociado al incremento del T_2 y del ADC que se resuelve gracias a la sobreexpresión de AQP4.

Múltiples evidencias confirman la activación de la respuesta neuroinflamatoria tras la administración de MDMA, la cual podría ser responsable de las alteraciones detectadas en la permeabilidad e integridad de la BHE que produce la droga. Se ha descrito activación tanto microglial [7-10] como astrocitaria [56, 106-108] en varias regiones cerebrales, por acción de la MDMA administrada periféricamente. En el presente estudio se observa que, tras la administración de una única dosis neurotóxica de MDMA se produce, en el hipocampo de la rata, la sobreexpresión de OX-42 y GFAP, marcadores específicos de microglía y astrocitos respectivamente. En este modelo, la activación microglial detectada es más notable y ocurre

más tempranamente que la astrocitaria, observándose un incremento en la inmunoreactividad de OX-42 3 y 6 horas después de la administración de la droga en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, e incluso 1 hora después en el giro dentado; frente al aumento de GFAP que se aprecia tan sólo a las 6 horas y es más moderado. En condiciones adversas, las células gliales adquieren función neurosecretora y liberan especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno y citoquinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β [25]. El incremento de IL-1 β [8, 111] y la activación de la vía NF- κ B [10] han sido descritos tanto en la corteza como en el hipocampo de ratas tratadas con MDMA desde una hora después de su administración. El presente estudio demuestra el incremento en el contenido hipocampal de IL-1 β a las 3 horas que contribuiría a la propagación de la neuroinflamación. Puesto que la activación astrocitaria no se detecta hasta pasadas 6 horas, aparentemente la liberación de IL-1 β podría proceder de la microglía que ya se encuentra activa al tiempo al que los niveles de la citoquina se encuentran elevados.

Uno de los principales mecanismos que median la activación de la respuesta neuroinflamatoria es la señalización a través del receptor P2X₇ [22, 23, 25], un receptor que además es capaz de promover la formación de edema tras el daño cerebral por traumatismo [354] y de regular la expresión de AQP4 en los pies astrocitarios en condiciones de anoxia [355]. En situaciones fisiológicas, la concentración de ATP extracelular en el cerebro de la rata se mantiene en un rango nanomolar. No obstante, bajo condiciones patológicas de daño celular por anoxia cerebral, por traumatismo o durante la sobrestimulación y despolarización neuronal se liberan grandes cantidades de ATP alcanzándose el rango milimolar al cual los receptores P2X₇ son sensibles al ATP y pueden ser activados por su unión [23, 200-202]. Al ser receptores ionotrópicos, su activación induce el flujo de entrada de cationes de calcio y sodio junto a la salida de potasio de la célula [202] y la formación de canales de panexina que favorecen la salida de potasio y la entrada de proteínas con patrones moleculares asociados a daño (*Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs) las cuales finalmente activan el inflamasoma promoviendo la maduración de caspasa-1 [22]. Como consecuencia se produce la activación microglial [23, 25] y astrocitaria [23, 24], así como la maduración y liberación de IL-1 β con generación de especies reactivas de oxígeno [22, 23].

El receptor P2X₇ se sobreexpresa en las células gliales durante la neuroinflamación [23] en enfermedades neurodegenerativas [203], en condiciones de isquemia cerebral [204] y epilepsia [205], entre otras patologías. El presente estudio revela la sobreexpresión de dicho receptor de 1 a 6 horas después de la administración de MDMA, un incremento que se detecta con anterioridad a la activación glial inducida por la droga en prácticamente todas las zonas del

hipocampo analizadas. Esto sugiere que el aumento en la expresión del receptor es el que desencadena la respuesta neuroinflamatoria, permitiendo la transición de las células gliales desde el estado en reposo al estado reactivo. La administración del antagonista del receptor P2X₇, BBG previene el incremento de la expresión de dichos receptores y la de OX-42 inducidas por MDMA. Sin embargo, no es capaz de prevenir los incrementos detectados en GFAP e IL-1 β . Esto indica que la respuesta neuroinflamatoria producida por MDMA en el hipocampo tiene una regulación dual, siendo la activación microglial dependiente de la sobreexpresión y activación de receptores P2X₇, mientras que el incremento de GFAP y la producción de IL-1 β ocurrirían mediante otros mecanismos. Pese a que en numerosas condiciones inflamatorias el incremento de IL-1 β se previene por el antagonismo de receptores P2X₇ [354, 356-358], los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren un origen diferente de la microglía reactiva para la citoquina en el hipocampo de la rata tras la administración periférica de MDMA. De forma equivalente, el tratamiento con minociclina, un inhibidor de la activación microglial, pone de manifiesto que el incremento de IL-1 β inducido por MDMA en el hipotálamo de la rata presenta un origen diferente a la microglía reactiva [10] y es independiente de la activación de caspasa-1 [111], a diferencia de lo que ocurre en la corteza cerebral.

La respuesta neuroinflamatoria inducida por MDMA ocurre inmediatamente después de la inyección de la droga y es concomitante con la alteración de la integridad de la BHE, pudiendo ser en parte la responsable de la disfunción detectada en la unión neurovascular. De hecho, el antagonismo de receptores P2X₇ previene la degradación de laminina y colágeno-IV y la extravasación de IgG al evitar la sobreactivación de MMP-9 y MMP-3 (resultados publicados [359]) y la sobreexpresión de tPA. Estos datos indican que la activación temprana de receptores P2X₇ mediante ATP es un mecanismo iniciador de la cascada de eventos que conducen a la alteración de la BHE.

La generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno por la interacción entre ATP y los receptores P2X₇ [360], así como la producción por parte de la microglía activa de citoquinas proinflamatorias [25], pueden incrementar la expresión de MMPs [361] e inducir cambios en la permeabilidad de la BHE [26, 232, 265]. De hecho, IL-1 β es un potente inductor de la expresión de MMP-9 en astrocitos [264, 362, 363] EF) y células gliales periféricas [364]. Sin embargo, independientemente del mecanismo implicado en la producción de IL-1 β tras la administración de MDMA, esta citoquina no parece ser el detonante de la alteración de la BHE producida por la droga, a diferencia de otros modelos, ya que se encuentra incrementada con posterioridad al aumento de MMP-9; si bien podría regular la expresión de MMP-3 cuyo

incremento se detecta también a las 3 horas. Por otro lado, IL-1 β podría ser sustrato de las metaloproteinasas, ya que se sintetiza como una molécula precursora que debe ser proteolizada para ser biológicamente activa. Frecuentemente, esta proteólisis es mediada por la proteína caspasa-1 del inflamasoma tras la activación microglial [22, 23]. Sin embargo, estudios *in vitro* sugieren que las MMPs podrían intervenir en el procesamiento de IL-1 β , tanto en su maduración como en su inactivación, ya que tanto MMP-9 [365] como MMP-3 pueden degradarla [366]. El incremento en IL-1 β que se observa en condiciones de isquemia experimental se previene mediante la inhibición selectiva de MMP-9, lo que sugiere un efecto activador de MMP-9 sobre dicha citoquina [367]. Este efecto también se aprecia mediante el tratamiento con BB-94, un inhibidor de MMPs de amplio espectro [21]. Por el contrario, el déficit de MMP-9 que manifiestan los ratones *knock-out* para dicha metaloproteinasa produce una mayor expresión de la citoquina [368]. Aunque en el presente estudio no se determinó el efecto de la inhibición de MMP-9 mediante SB-3CT sobre el incremento inducido por MDMA en los niveles de expresión de IL-1 β , el antagonismo de receptores P2X₇ mediante BBG, eficaz en la prevención de la sobreactivación de MMP-9 y de MMP-3, no indujo modificaciones en el incremento de la citoquina tras la administración de la droga. Esto sugiere que las MMPs aparentemente no están involucradas en la producción de IL-1 β en este modelo.

Los resultados de este estudio demuestran que el antagonismo de receptores P2X₇, de forma independiente de la producción de IL-1 β , previene los cambios inducidos por MDMA sobre la alteración de la BHE probablemente por su efecto protector frente a la sobreactivación de MMP-9, la cual según los estudios de inhibición con SB-3CT es la responsable de la disminución de claudina-5, de la generación del edema cerebral y la sobreexpresión de AQP4. La sobreactivación de MMP-9 inducida por la activación de receptores P2X₇ podría producirse mediante mecanismos independientes tanto de la activación del inflamasoma, como de la producción de IL-1 β [358, 369]. Estudios en cultivo ponen de manifiesto un mecanismo mediante el cual la activación de receptores P2X₇ por ATP produce la liberación de catepsina-B al espacio extracelular, donde degrada TIMP-1, permitiendo de este modo el incremento en la actividad MMP-9 que se previene mediante el uso de antagonistas del receptor [370].

La producción de citoquinas proinflamatorias puede tener lugar por mecanismos diferentes de la señalización a través de receptores P2X₇. La proteína HMGB-1 o anfoterina, perteneciente al grupo de moléculas denominadas DAMPs, se ha visto involucrada en la producción de citoquinas y en la propagación de la respuesta neuroinflamatoria [211, 212]. Puede ser liberada de neuronas dañadas [206, 207] y por la microglía activa [207, 208] y actuar

como una citoquina proinflamatoria tras su oxidación parcial en condiciones de estrés oxidativo [371, 372]. En este estado puede interactuar con receptores de productos finales de glicación avanzada (RAGE, *Receptor for advanced glycation endproducts*) endoteliales [209] y con receptores TLR-4 (*Toll-like receptor-4*) microgliales [373] promoviendo la activación microglial y la secreción de IL-1 β [371, 372, 374]. De este modo, se ha visto que HMGB-1 media el efecto neuroinflamatorio tras la administración de metanfetamina en ratas, al ser liberada por las neuronas dopaminérgicas dañadas por la droga en varias regiones cerebrales. El tratamiento con metanfetamina incrementa la expresión de HMGB-1 en paralelo al incremento de IL-1 β en el estriado y el uso de antagonistas de HMGB-1 bloquea la producción de la citoquina inducida por metanfetamina en el núcleo accumbens [375]. Los resultados de esta Tesis Doctoral muestran una equivalencia temporal en el incremento de HMGB-1 y de IL-1 β en el hipocampo de la rata tras la administración periférica de MDMA. Esto sugiere una posible implicación de la anfoterina liberada tras el daño celular por el intenso estrés oxidativo generado por MDMA, en la producción de IL-1 β de forma independiente de la señalización a través de receptores P2X₇. Este proceso podría estar ocurriendo independientemente de la prevención del incremento de OX-42 inducido por BBG, puesto que la función secretora de la glía puede llevarse a cabo sin correlacionarse necesariamente con la sobreexpresión de marcadores específicos de activación [376].

Además de su efecto proinflamatorio, HMGB-1 se relaciona con la alteración de la BHE al incrementar la expresión de tPA en las células endoteliales [209]. De hecho, la interacción entre la anfoterina y tPA acelera la conversión de plasminógeno a plasmina [210]. Tras la administración de MDMA, el incremento hipocampal de HMGB-1 ocurre de forma simultánea a la sobreactivación de tPA y disminución de plasminógeno. El hecho de que el incremento en la actividad degradativa de tPA tenga lugar a las 3 horas, pese a estar incrementada su expresión ya a la hora, sugiere la posibilidad de que la interacción tPA/anfoterina sea necesaria para potenciar la conversión de plasminógeno en plasmina tras la administración de MDMA.

Por otro lado, HMGB-1 podría estar implicada en la evolución del edema, ya que su incremento en condiciones de daño cerebral por traumatismo [373] o su administración i.c.v. en el cerebro de la rata [374] induce un incremento en la expresión de AQP4. Además, el antagonismo de HMGB-1 previene la pérdida de anclaje entre los pies astrocitarios y el endotelio, y el engrosamiento de astrocitos que tiene lugar durante el desarrollo del edema en condiciones de isquemia cerebral [212].

Puesto que la interacción entre la activación de la respuesta neuroinflamatoria y la alteración de la BHE puede ser un proceso recíproco, se consideró la implicación de la sobreactivación de MMP-9 en la activación glial. Además de la alteración de la BHE, las MMPs participan en la modulación de la respuesta neuroinflamatoria. MMP-3 puede ser liberada ya en su forma activa por las células sometidas a estrés celular e inducir la activación microglial y la producción de citoquinas proinflamatorias. La inhibición de MMPs mediante BB-94 suprime la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), de IL-1 β y de IL-6 mediante un mecanismo que involucra la señalización a través de NF-kB, AP-1 y MAPKs [21]. En este modelo, la inhibición de MMP-9 específicamente mediante SB-3CT no modifica el incremento que induce la MDMA en la expresión de OX-42, ni de GFAP. Por lo tanto, aunque la producción de MMP-9 involucre a los receptores P2X₇, ni la propia actividad de la gelatinasa ni sus consecuencias sobre la BHE y la generación de edema difuso, parecen ser factores desencadenantes de la respuesta neuroinflamatoria inducida por la MDMA en el hipocampo de la rata. Del mismo modo, y como ya se mencionó anteriormente, la prevención de la sobreactivación y sobreexpresión de MMP-9 y MMP-3 que se produce tras la administración de BBG no afecta al incremento de IL-1 β inducido por MDMA.

Además de los mecanismos de toxicidad mediante los que actúa a corto plazo la MDMA, la administración de una única dosis neurotóxica induce a largo plazo la disminución selectiva del sistema serotoninérgico en varias regiones cerebrales, entre ellas el hipocampo [2, 4]. Siete días después de la administración de la droga se detecta una disminución en los niveles de serotonina, de su metabolito 5-HIAA y del transportador SERT. Este efecto neurotóxico puede ser modulado por la prevención de la hipertermia [101-103] y se previene mediante el uso de antioxidantes [3, 56, 98], procesos que a su vez afectan a la alteración de la BHE en varios modelos [15, 193, 196, 197]. Con el fin de relacionar la alteración de la BHE y la activación microglial con el potencial neurotóxico de la MDMA sobre el sistema serotoninérgico a largo plazo, se realizó una valoración neuroquímica de los principales parámetros alterados por la droga tras el tratamiento con BBG.

Los resultados indican que ni la prevención en la sobreactivación de MMP-9, ni la reducción de la activación microglial inducidas por la activación de receptores P2X₇, atenúan la disminución de serotonina, de 5-HIAA y de SERT que produce la droga. Estos datos indican que la alteración de la BHE y la activación de la respuesta neuroinflamatoria inducida por receptores P2X₇ en el hipocampo de la rata, no están involucrados en la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por la droga a largo plazo en dicho área cerebral, a pesar de que, estudios previos de

este laboratorio indican que la inhibición de la activación microglial mediante minociclina [10] o un agonista de receptores de cannabinoides CB2 [9] previene, al menos parcialmente, la neurotoxicidad producida por la droga en el hipotálamo y la corteza cerebral [9, 10]. Además, la administración de IL-1 β exógena i.c.v. incrementa la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por MDMA a largo plazo, a través de una potenciación de la hipertermia [111]. Por lo que, posiblemente el mantenimiento de una expresión elevada de IL-1 β , a pesar de la inhibición de la activación microglial ejercida por el antagonismo de receptores P2X₇, sea la responsable de la falta de prevención de la neurotoxicidad serotoninérgica.

La temperatura es un factor determinante en la alteración de la BHE y en la generación de edema [20, 192, 196, 225]. La hipertermia inducida por MDMA supone uno de los mecanismos a través de los cuales la droga produce la toxicidad. Se ha comprobado que la temperatura rectal de la rata resulta una medida válida que refleja los cambios producidos en la temperatura intracortical (aproximadamente 0,7°C superior a la rectal) [377]. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que la prevención de la alteración de la BHE que se observa tras la administración de BBG, A-438079 y SB-3CT son consecuencia de sus mecanismos de acción e independientes de cambios sobre la temperatura corporal de los animales.

En conjunto, los resultados de la presente tesis doctoral indican que la administración de una dosis neurotóxica de MDMA modifica la integridad de la BHE, induce la extravasación de proteínas plasmáticas y la generación de edema difuso como consecuencia de la sobreactivación de proteasas, mediante un mecanismo que involucra la activación de receptores P2X₇ en el hipocampo de la rata. El hecho de que una sola dosis de MDMA modifique de forma transitoria la permeabilidad de la BHE sugiere, además de la gravedad asociada a la generación de edema cerebral, la vulnerabilidad del SNC a la infiltración de mediadores activos periféricos e incluso a la entrada de patógenos que en condiciones fisiológicas se mantendrían retenidos en la periferia. Varios estudios muestran que la administración de metanfetamina incrementa la permeabilidad de la BHE favoreciendo de este modo el transporte de leucocitos infectados por VIH al interior del cerebro, lo que explicaría la alta incidencia de alteraciones neurológicas relacionadas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida entre los consumidores de metanfetamina [378, 379]. Aunque por el momento no existe interacción descrita entre el consumo de MDMA y la infección por VIH, a pesar de relacionarse el consumo de esta droga con el desarrollo de conductas sexuales de alto riesgo [380, 381], cualquier infección adquirida podría afectar al SNC como consecuencia de la alteración de la BHE. De igual forma, alteraciones sistémicas, ya sean infecciones, proliferación de los microorganismos que constituyen la flora del

organismo, alteraciones metabólicas o autoinmunes que en situaciones fisiológicas se encuentren restringidas fuera del SNC, podrían generar manifestaciones neurológicas como consecuencia de su acceso a través de la BHE alterada por el consumo de la droga.

Por último, los resultados aportados por este estudio resultan de gran relevancia al considerar los recientes ensayos clínicos que utilizan la administración de MDMA como tratamiento farmacológico coadyuvante en la psicoterapia para el trastorno de estrés post-traumático [47] y el autismo en adultos [382]. La dosis típica en estos estudios es de 125 mg seguida de una segunda dosis opcional de 62,5 mg 2 -2,5 horas después, administradas durante un total de 3 sesiones entre las cuales los pacientes reciben psicoterapia sin tratamiento farmacológico [48, 383]. Aunque estos estudios determinan el mantenimiento de la mejora de la sintomatología del PTSD en ausencia de alteraciones cognitivas a largo plazo [47], podría resultar importante analizar la posibilidad de que la MDMA esté induciendo en los pacientes un incremento en la permeabilidad de la BHE a corto plazo que pudiera tener repercusiones neurológicas. Por otro lado, en el caso de confirmarse el incremento transitorio de la permeabilidad de la BHE tras la administración de bajas dosis de MDMA que no produjeran efectos perjudiciales, podría utilizarse la MDMA como tratamiento para facilitar el acceso al SNC de fármacos que muestran dificultad para atravesar la barrera.

CONCLUSIONES

De los resultados presentados en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones sobre el efecto de la MDMA en el hipocampo de la rata:

1. La administración de una única dosis neurotóxica de MDMA produce a corto plazo un incremento transitorio en la permeabilidad de la BHE a las proteínas plasmáticas, asociado a la disminución en la expresión de claudina-5, laminina y colágeno-IV y a la sobreexpresión y sobreactivación de las metaloproteinasas inducibles, MMP-9 y MMP-3, y del activador tisular del plasminógeno.
2. La MDMA induce la formación de edema de origen vasogénico como consecuencia de la disminución en la expresión de claudina-5 producida por el incremento en la activación de MMP-9. Este edema se resuelve unas horas después probablemente mediante la sobreexpresión de AQP4.
3. La MDMA desencadena una respuesta neuroinflamatoria caracterizada por activación astrocitaria y microglial. Esta última es un proceso dependiente de la activación de receptores P2X₇ que conlleva el incremento en las proteasas MMP-9, MMP-3 y tPA, la disminución de la expresión de las proteínas de la lámina basal y la alteración de la permeabilidad de la BHE.
4. La alteración de la BHE inducida por MDMA a través de los receptores P2X₇ no contribuye a la neurotoxicidad serotoninérgica producida a largo plazo por la droga.

En conjunto, los resultados de la presente Tesis Doctoral revelan que la administración de una única dosis neurotóxica de MDMA produce, en el hipocampo de rata, la alteración de la integridad y permeabilidad de la BHE que genera la formación de edema, siendo estos cambios transitorios desencadenados por la acción de las metaloproteinasas inducidas por activación de receptores P2X₇.

REFERENCIAS

1. Green, A.R., et al., *The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy")*. *Pharmacol Rev*, 2003. **55**(3): p. 463-508.
2. O'Shea, E., et al., *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*, 1998. **37**(7): p. 919-26.
3. Colado, M.I. and A.R. Green, *The spin trap reagent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents 'ecstasy'-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones*. *Eur J Pharmacol*, 1995. **280**(3): p. 343-6.
4. Colado, M.I. and A.R. Green, *A study of the mechanism of MDMA ('ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT neurones using chlormethiazole, dizocilpine and other protective compounds*. *Br J Pharmacol*, 1994. **111**(1): p. 131-6.
5. Kovács, G.G., et al., *Single dose of MDMA causes extensive decrement of serotonergic fibre density without blockage of the fast axonal transport in Dark Agouti rat brain and spinal cord*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2007. **33**(2): p. 193-203.
6. O'Hearn, E., et al., *Methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxyamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity*. *J Neurosci*, 1988. **8**(8): p. 2788-803.
7. O'Shea, E., et al., *Current preclinical studies on neuroinflammation and changes in blood-brain barrier integrity by MDMA and methamphetamine*. *Neuropharmacology*, 2014. **87**: p. 125-34.
8. Orio, L., et al., *3,4-Methylenedioxyamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion*. *J Neurochem*, 2004. **89**(6): p. 1445-53.
9. Torres, E., et al., *Evidence that MDMA ('ecstasy') increases cannabinoid CB2 receptor expression in microglial cells: role in the neuroinflammatory response in rat brain*. *J Neurochem*, 2010. **113**(1): p. 67-78.
10. Orio, L., et al., *A study on the mechanisms by which minocycline protects against MDMA ('ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT cortical neurons*. *Neurotox Res*, 2010. **18**(2): p. 187-99.
11. Colado, M.I., J.L. Williams, and A.R. Green, *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*, 1995. **115**(7): p. 1281-9.
12. Daneman, R., *The blood-brain barrier in health and disease*. 2012: Annals of neurology.
13. Hawkins, B.T. and T.P. Davis, *The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease*. *Pharmacol Rev*, 2005. **57**(2): p. 173-85.
14. Pun, P.B., J. Lu, and S. Moochhala, *Involvement of ROS in BBB dysfunction*. *Free Radic Res*, 2009. **43**(4): p. 348-64.
15. Lakhan, S.E., et al., *Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke*. *Front Neurol*, 2013. **4**: p. 32.
16. Obermeier, B., R. Daneman, and R.M. Ransohoff, *Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier*. *Nat Med*, 2013. **19**(12): p. 1584-96.
17. da Fonseca, A.C.C., et al., *The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases*. *Front Cell Neurosci*, 2014. **8**: p. 362.
18. Banks, W.A., *The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation*. *Brain Behav Immun*, 2015. **44**: p. 1-8.
19. Kiyatkin, E.A., *Brain temperature homeostasis: physiological fluctuations and pathological shifts*. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2010. **15**: p. 73-92.
20. Kiyatkin, E.A. and H.S. Sharma, *Permeability of the blood-brain barrier depends on brain temperature*. *Neuroscience*, 2009. **161**(3): p. 926-39.
21. Candelario-Jalil, E., Y. Yang, and G.A. Rosenberg, *Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia*. *Neuroscience*, 2009. **158**(3): p. 983-94.
22. Tschopp, J. and K. Schroder, *NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(3): p. 210-5.
23. Rodrigues, R.J., A.R. Tomé, and R.A. Cunha, *ATP as a multi-target danger signal in the brain*. *Front Neurosci*, 2015. **9**: p. 148.
24. Franke, H. and P. Illes, *Pathological potential of astroglial purinergic receptors*. *Adv Neurobiol*, 2014. **11**: p. 213-56.

25. Monif, M., G. Burnstock, and D.A. Williams, *Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010. **42**(11): p. 1753-6.
26. Rosenberg, G.A., *Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases*. *Lancet Neurol*, 2009. **8**(2): p. 205-16.
27. Vilalta, A., J. Sahuquillo Barris, and M.A. Poca, *[Matrix metalloproteinases in neurological brain lesions: a new therapeutic target?]*. *Rev Neurol*, 2010. **51**(2): p. 95-107.
28. Swann, K., et al., *Peripheral thermal injury causes blood-brain barrier dysfunction and matrix metalloproteinase (MMP) expression in rat*. *Brain Res*, 2007. **1129**(1): p. 26-33.
29. Cardoso, F.L., D. Brites, and M.A. Brito, *Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches*. *Brain Res Rev*, 2010. **64**(2): p. 328-63.
30. Yang, Y., et al., *Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007. **27**(4): p. 697-709.
31. Jin, R., G. Yang, and G. Li, *Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator*. *Neurobiol Dis*, 2010. **38**(3): p. 376-85.
32. Vilalta, A., et al., *Brain contusions induce a strong local overexpression of MMP-9. Results of a pilot study*. *Acta Neurochir Suppl*, 2008. **102**: p. 415-9.
33. Nagai, N. and O. Matsuo, *Roles of fibrinolytic system components in the nervous system*. *Pathophysiology*, 2010. **17**(2): p. 141-7.
34. Candelario-Jalil, E., et al., *Matrix metalloproteinases are associated with increased blood-brain barrier opening in vascular cognitive impairment*. *Stroke*, 2011. **42**(5): p. 1345-50.
35. Fukuda, A.M. and J. Badaut, *Aquaporin 4: a player in cerebral edema and neuroinflammation*. *J Neuroinflammation*, 2012. **9**: p. 279.
36. Yepes, M., et al., *Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(10): p. 1533-40.
37. Badaut, J., et al., *Aquaporin and brain diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1840**(5): p. 1554-65.
38. Seifert, G., K. Schilling, and C. Steinhäuser, *Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(3): p. 194-206.
39. Lorenzo, P.L., Ignacio, *Características farmacológicas de las drogas recreativas (MDMA y otras anfetaminas, Ketamina, GHB, LSD y otros alucinógenos)*. *Adicciones*, 2003. **15**(2): p. 51-75.
40. Kalant, H., *The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs*. *CMAJ*, 2001. **165**(7): p. 917-28.
41. Freudenmann, R.W., F. Oxler, and S. Bernschneider-Reif, *The origin of MDMA (ecstasy) revisited: the true story reconstructed from the original documents*. *Addiction*, 2006. **101**(9): p. 1241-5.
42. Karch, S.B., *A Historical Review of MDMA*. 2011: *The Open Forensic Science Journal*, p. 20-24.
43. Shulgin, A.T.N., D E, *Characterization of three new psychotomimetics*, in *The Psychopharmacology of Hallucinogens*, R.C.W. Stillman, R E, Editor. 1978, Pergamon: New York.
44. Benzenhöfer, U. and T. Passie, *Rediscovering MDMA (ecstasy): the role of the American chemist Alexander T. Shulgin*. *Addiction*, 2010. **105**(8): p. 1355-61.
45. Ricaurte, G., et al., *Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals*. *Science*, 1985. **229**(4717): p. 986-8.
46. Meyer, J.S., *3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): current perspectives*. *Subst Abuse Rehabil*, 2013. **4**: p. 83-99.
47. Mithoefer, M.C., et al., *Durability of improvement in post-traumatic stress disorder symptoms and absence of harmful effects or drug dependency after 3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy: a prospective long-term follow-up study*. *J Psychopharmacol*, 2013. **27**(1): p. 28-39.
48. Mithoefer, M.C., et al., *The safety and efficacy of {+/-}3,4-methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy in subjects with chronic, treatment-resistant posttraumatic stress disorder: the first randomized controlled pilot study*. *J Psychopharmacol*, 2011. **25**(4): p. 439-52.
49. Johansen, P.-Ø. and T.S. Krebs, *Psychedelics not linked to mental health problems or suicidal behavior: a population study*. *J Psychopharmacol*, 2015. **29**(3): p. 270-9.
50. Green, A.R., et al., *Lost in translation: preclinical studies on 3,4-methylenedioxymethamphetamine provide information on mechanisms of action, but do not allow accurate prediction of adverse events in humans*. *Br J Pharmacol*, 2012. **166**(5): p. 1523-36.
51. PNSD. Available from: <http://www.pnsd.msc.es/ca/Categoria2/publica/publicaciones/drogas.htm>.

52. OEDT, *Informe Europeo sobre Drogas 2015: Tendencias y novedades*. 2015: Luxemburgo. Oficina de Publicaciones de la Unión Europea. p. 82.
53. UNODC, *World Drug Report*. 2014.
54. EMCDDA. *Methylenedioxyamphetamine (MDMA or 'Ecstasy') drug profile 2015*; Available from: <http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/mdma>.
55. Caudevilla Gállego, F., [*Ecstasy: a review of scientific literature about MDMA*]. *Med Clin (Barc)*, 2003. **120**(13): p. 505-15.
56. Capela, J.P., et al., *Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: an overview*. *Mol Neurobiol*, 2009. **39**(3): p. 210-71.
57. Morefield, K.M., et al., *Pill content, dose and resulting plasma concentrations of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) in recreational 'ecstasy' users*. *Addiction*, 2011. **106**(7): p. 1293-300.
58. <http://energycontrol.org/>, *Infodrogas*.
59. www.ectasydata.org. *Providing access to lab testing results for street ecstasy tablets*.
60. Volkow, N.D., *Abuso de la MDMA (Éxtasis)*. 2006, National Institute on Drug Abuse.
61. de la Torre, R., et al., *Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition*. *Ther Drug Monit*, 2004. **26**(2): p. 137-44.
62. Cole, J.C. and H.R. Sumnall, *The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA)*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2003. **27**(3): p. 199-217.
63. Colado, M.I., E. O'Shea, and A.R. Green, *Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2004. **173**(3-4): p. 249-63.
64. Fonsart, J., et al., *Sprague-Dawley rats display sex-linked differences in the pharmacokinetics of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and its metabolite 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA)*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **241**(3): p. 339-47.
65. Green, A.R., et al., *MDMA: on the translation from rodent to human dosing*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009. **204**(2): p. 375-8.
66. Parrott, A.C., *MDMA and temperature: a review of the thermal effects of 'Ecstasy' in humans*. *Drug Alcohol Depend*, 2012. **121**(1-2): p. 1-9.
67. Green, A.R., E. O'shea, and M.I. Colado, *A review of the mechanisms involved in the acute MDMA (ecstasy)-induced hyperthermic response*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **500**(1-3): p. 3-13.
68. Gudelsky, G.A. and B.K. Yamamoto, *Actions of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) on cerebral dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008. **90**(2): p. 198-207.
69. Mehan, A.O., et al., *The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, 'ecstasy') to rats*. *Br J Pharmacol*, 2002. **135**(1): p. 170-80.
70. Matsumoto, T., et al., *5-hydroxytryptamine- and dopamine-releasing effects of ring-substituted amphetamines on rat brain: a comparative study using in vivo microdialysis*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014. **24**(8): p. 1362-70.
71. Shioda, K., et al., *Risperidone attenuates and reverses hyperthermia induced by 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) in rats*. *Neurotoxicology*, 2008. **29**(6): p. 1030-6.
72. Anneken, J.H. and G.A. Gudelsky, *MDMA produces a delayed and sustained increase in the extracellular concentration of glutamate in the rat hippocampus*. *Neuropharmacology*, 2012. **63**(6): p. 1022-7.
73. Anneken, J.H., et al., *MDMA increases glutamate release and reduces parvalbumin-positive GABAergic cells in the dorsal hippocampus of the rat: role of cyclooxygenase*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2013. **8**(1): p. 58-65.
74. Yamamoto, B.K. and J. Raudensky, *The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2008. **3**(4): p. 203-17.
75. Nagayasu, K., et al., *Sustained exposure to 3,4-methylenedioxyamphetamine induces the augmentation of exocytotic serotonin release in rat organotypic raphe slice cultures*. *J Pharmacol Sci*, 2010. **113**(2): p. 197-201.
76. O'Shea, E., et al., *MDMA-induced neurotoxicity: long-term effects on 5-HT biosynthesis and the influence of ambient temperature*. *Br J Pharmacol*, 2006. **148**(6): p. 778-85.
77. Battaglia, G., S.Y. Yeh, and E.B. De Souza, *MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1988. **29**(2): p. 269-74.

78. Huff, C., et al., *Effect of repeated exposure to MDMA on the function of the 5-HT transporter as assessed by synaptosomal 5-HT uptake*. Brain Res Bull, 2013. **91**: p. 52-7.
79. Biezonski, D.K. and J.S. Meyer, *Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on serotonin transporter and vesicular monoamine transporter 2 protein and gene expression in rats: implications for MDMA neurotoxicity*. J Neurochem, 2010. **112**(4): p. 951-62.
80. Bhide, N.S., et al., *Repeated exposure to MDMA provides neuroprotection against subsequent MDMA-induced serotonin depletion in brain*. Brain Res, 2009. **1286**: p. 32-41.
81. Mayado, A., et al., *Increased interleukin-18 levels following low dose MDMA induces tolerance against the 5-HT neurotoxicity produced by challenge MDMA*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 165.
82. Sanchez, V., et al., *The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain*. Br J Pharmacol, 2001. **134**(1): p. 46-57.
83. Esteban, B., et al., *3,4-Methylenedioxymethamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose*. Psychopharmacology (Berl), 2001. **154**(3): p. 251-60.
84. Miller, R.T., S.S. Lau, and T.J. Monks, *Effects of intracerebroventricular administration of 5-(glutathion-S-yl)-alpha-methyldopamine on brain dopamine, serotonin, and norepinephrine concentrations in male Sprague-Dawley rats*. Chem Res Toxicol, 1996. **9**(2): p. 457-65.
85. Molliver, M.E., et al., *Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **600**: p. 649-61; discussion 661-4.
86. Ricaurte, G.A., J. Yuan, and U.D. McCann, *(+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy')-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals*. Neuropsychobiology, 2000. **42**(1): p. 5-10.
87. Halpin, L.E., S.A. Collins, and B.K. Yamamoto, *Neurotoxicity of methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine*. Life Sci, 2014. **97**(1): p. 37-44.
88. Capela, J.P., et al., *Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons*. Neurotoxicology, 2007. **28**(4): p. 868-75.
89. Capela, J.P., et al., *The neurotoxicity of hallucinogenic amphetamines in primary cultures of hippocampal neurons*. Neurotoxicology, 2013. **34**: p. 254-63.
90. Schmued, L.C., *Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat forebrain following a single exposure to MDMA*. Brain Res, 2003. **974**(1-2): p. 127-33.
91. Soleimani Asl, S., et al., *Evaluation of Bcl-2 Family Gene Expression in Hippocampus of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine Treated Rats*. Cell J, 2012. **13**(4): p. 275-80.
92. Cerretani, D., et al., *Cardiac oxidative stress determination and myocardial morphology after a single ecstasy (MDMA) administration in a rat model*. Int J Legal Med, 2008. **122**(6): p. 461-9.
93. Cerretani, D., et al., *Acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induces oxidative stress, lipoperoxidation and TNF α -mediated apoptosis in rat liver*. Pharmacol Res, 2011. **64**(5): p. 517-27.
94. Song, B.-J., et al., *Mechanisms of MDMA (ecstasy)-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and organ damage*. Curr Pharm Biotechnol, 2010. **11**(5): p. 434-43.
95. Colado, M.I., et al., *In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(5): p. 889-900.
96. Shankaran, M., B.K. Yamamoto, and G.A. Gudelsky, *Ascorbic acid prevents 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced hydroxyl radical formation and the behavioral and neurochemical consequences of the depletion of brain 5-HT*. Synapse, 2001. **40**(1): p. 55-64.
97. Sprague, J.E. and D.E. Nichols, *The monoamine oxidase-B inhibitor L-deprenyl protects against 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **273**(2): p. 667-73.
98. Darvesh, A.S., B.K. Yamamoto, and G.A. Gudelsky, *Evidence for the involvement of nitric oxide in 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletion in the rat brain*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **312**(2): p. 694-701.
99. Colado, M.I., et al., *In vivo evidence against clomethiazole being neuroprotective against MDMA ('ecstasy')-induced degeneration of rat brain 5-HT nerve terminals by a free radical scavenging mechanism*. Neuropharmacology, 1999. **38**(2): p. 307-14.
100. da Silva, D.D., E. Silva, and H. Carmo, *Combination effects of amphetamines under hyperthermia - the role played by oxidative stress*. J Appl Toxicol, 2014. **34**(6): p. 637-50.

101. Colado, M.I., et al., *Role of hyperthermia in the protective action of clomethiazole against MDMA ('ecstasy')-induced neurodegeneration, comparison with the novel NMDA channel blocker AR-R15896AR*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(3): p. 479-84.
102. Goni-Allo, B., et al., *The relationship between core body temperature and 3,4-methylenedioxymethamphetamine metabolism in rats: implications for neurotoxicity*. Psychopharmacology (Berl), 2008. **197**(2): p. 263-78.
103. Colado, M.I., et al., *Studies on the neuroprotective effect of pentobarbitone on MDMA-induced neurodegeneration*. Psychopharmacology (Berl), 1999. **142**(4): p. 421-5.
104. Torres, E., et al., *Changes in interleukin-1 signal modulators induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): regulation by CB2 receptors and implications for neurotoxicity*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 53.
105. Angoa-Pérez, M., et al., *Effects of combined treatment with mephedrone and methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine on serotonin nerve endings of the hippocampus*. Life Sci, 2014. **97**(1): p. 31-6.
106. Sharma, H.S. and S.F. Ali, *Acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine induces profound hyperthermia, blood-brain barrier disruption, brain edema formation, and cell injury*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1139**: p. 242-58.
107. Monks, T.J., et al., *The role of metabolism in 3,4-(+)-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-(+)-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) toxicity*. Ther Drug Monit, 2004. **26**(2): p. 132-6.
108. Adori, C., et al., *Damage of serotonergic axons and immunolocalization of Hsp27, Hsp72, and Hsp90 molecular chaperones after a single dose of MDMA administration in Dark Agouti rat: temporal, spatial, and cellular patterns*. J Comp Neurol, 2006. **497**(2): p. 251-69.
109. Wang, X., et al., *3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration to rats decreases brain tissue serotonin but not serotonin transporter protein and glial fibrillary acidic protein*. Synapse, 2004. **53**(4): p. 240-8.
110. Li, S.-X., et al., *[Long-term neurotoxic effects of MDMA result in cortical and hippocampal structural changes]*. Sheng Li Xue Bao, 2006. **58**(1): p. 34-40.
111. O'Shea, E., et al., *3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases pro-interleukin-1beta production and caspase-1 protease activity in frontal cortex, but not in hypothalamus, of Dark Agouti rats: role of interleukin-1beta in neurotoxicity*. Neuroscience, 2005. **135**(4): p. 1095-105.
112. Docherty, J.R. and A.R. Green, *The role of monoamines in the changes in body temperature induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) and its derivatives*. Br J Pharmacol, 2010. **160**(5): p. 1029-44.
113. Saadat, K.S., et al., *The role of 5-HT in the impairment of thermoregulation observed in rats administered MDMA ('ecstasy') when housed at high ambient temperature*. Psychopharmacology (Berl), 2005. **179**(4): p. 884-90.
114. Brown, P.L. and E.A. Kiyatkin, *Brain hyperthermia induced by MDMA (ecstasy): modulation by environmental conditions*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(1): p. 51-8.
115. Green, A.R., et al., *Studies on the effect of MDMA ('ecstasy') on the body temperature of rats housed at different ambient room temperatures*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(2): p. 306-12.
116. Mechan, A.O., et al., *A neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) to rats results in a long-term defect in thermoregulation*. Psychopharmacology (Berl), 2001. **155**(4): p. 413-8.
117. Baumann, M.H. and R.B. Rothman, *Neural and cardiac toxicities associated with 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)*. Int Rev Neurobiol, 2009. **88**: p. 257-96.
118. Ho, Y.-J., et al., *Acute and long-term consequences of single MDMA administration in relation to individual anxiety levels in the rat*. Behav Brain Res, 2004. **149**(2): p. 135-44.
119. Mechan, A.O., et al., *A study of the effect of a single neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; "ecstasy") on the subsequent long-term behaviour of rats in the plus maze and open field*. Psychopharmacology (Berl), 2002. **159**(2): p. 167-75.
120. Skelton, M.R., M.T. Williams, and C.V. Vorhees, *Developmental effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine: a review*. Behav Pharmacol, 2008. **19**(2): p. 91-111.
121. McAleer, L.M., T. Schallert, and C.L. Duvauchelle, *Weekend Ecstasy use disrupts memory in rats*. Neurosci Lett, 2013. **549**: p. 173-6.
122. Ricaurte, G.A., et al., *5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates*. Brain Res, 1988. **474**(2): p. 359-63.

123. Mueller, M., et al., *Single oral doses of (\pm) 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('Ecstasy') produce lasting serotonergic deficits in non-human primates: relationship to plasma drug and metabolite concentrations.* Int J Neuropsychopharmacol, 2013. **16**(4): p. 791-801.
124. Ricaurte, G.A., et al., *(+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates.* JAMA, 1988. **260**(1): p. 51-5.
125. Gouzoulis-Mayfrank, E. and J. Daumann, *Neurotoxicity of methylenedioxyamphetamines (MDMA; ecstasy) in humans: how strong is the evidence for persistent brain damage?* Addiction, 2006. **101**(3): p. 348-61.
126. Goodwin, A.K., Mueller, M., Shell, C.D., Ricaurte, G.A., Ator, N.A., *Behavioral Effects and Pharmacokinetics of (\pm)-3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) after Intragastric Administration to Baboons* The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2013. **345**(3): p. 342-353.
127. Galicia, M., et al., *[Visits to the emergency department due to ecstasy (MDMA) and amphetamine derivative consumption: Epidemiological, clinical and evolutionary profile].* Rev Clin Esp, 2010. **210**(8): p. 371-8.
128. Liechti, M.E., I. Kunz, and H. Kupferschmidt, *Acute medical problems due to Ecstasy use. Case-series of emergency department visits.* Swiss Med Wkly, 2005. **135**(43-44): p. 652-7.
129. Milroy, C.M., J.C. Clark, and A.R. Forrest, *Pathology of deaths associated with "ecstasy" and "eve" misuse.* J Clin Pathol, 1996. **49**(2): p. 149-53.
130. Milroy, C.M., *"Ecstasy" associated deaths: what is a fatal concentration ? Analysis of a case series.* Forensic Sci Med Pathol, 2011. **7**(3): p. 248-52.
131. Kish, S.J., et al., *Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (Ecstasy) user.* Neurology, 2000. **55**(2): p. 294-6.
132. Martins, S.S., et al., *Perceived risk associated with ecstasy use: a latent class analysis approach.* Addict Behav, 2011. **36**(5): p. 551-4.
133. Jacobsen, L.K., et al., *Preliminary evidence of hippocampal dysfunction in adolescent MDMA ("ecstasy") users: possible relationship to neurotoxic effects.* Psychopharmacology (Berl), 2004. **173**(3-4): p. 383-90.
134. Blagrove, M., et al., *Procedural and declarative memory task performance, and the memory consolidation function of sleep, in recent and abstinent ecstasy/MDMA users.* J Psychopharmacol, 2011. **25**(4): p. 465-77.
135. Soar, K., A. Parrott, and J. Turner, *Attributions for psychobiological changes in ecstasy/MDMA and other polydrug users.* J Psychopharmacol, 2009. **23**(7): p. 745-58.
136. Mueller, F., et al., *Neuroimaging in moderate MDMA use: A systematic review.* Neurosci Biobehav Rev, 2015. **62**: p. 21-34.
137. Reneman, L., et al., *Effects of dose, sex, and long-term abstinence from use on toxic effects of MDMA (ecstasy) on brain serotonin neurons.* Lancet, 2001. **358**(9296): p. 1864-9.
138. Vollenweider, F.X., R.T. Jones, and M.J. Baggott, *Caveat emptor: editors beware.* Neuropsychopharmacology, 2001. **24**(4): p. 461-3.
139. McCann, U.D. and G.A. Ricaurte, *Caveat emptor: editors beware.* Neuropsychopharmacology, 2001. **24**(3): p. 333-6.
140. O'Shea, E. and M.I. Colado, *Is frequent dosing with ecstasy a risky business for dopamine-containing neurons?* Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(6): p. 272-4.
141. Moratalla, R., et al., *Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: Main mechanisms.* Prog Neurobiol, 2015.
142. McCann, U.D.R., George A., *Neuroimagen y neurotoxicidad inducida por MDMA (éxtasis).* Adicciones, 2003. **15**(2): p. 111-120.
143. Benningfield, M.M. and R.L. Cowan, *Brain serotonin function in MDMA (ecstasy) users: evidence for persisting neurotoxicity.* Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(1): p. 253-5.
144. Di Iorio, C.R., et al., *Evidence for chronically altered serotonin function in the cerebral cortex of female 3,4-methylenedioxymethamphetamine polydrug users.* Arch Gen Psychiatry, 2012. **69**(4): p. 399-409.
145. Urban, N.B., et al., *Sustained recreational use of ecstasy is associated with altered pre and postsynaptic markers of serotonin transmission in neocortical areas: a PET study with [¹¹C]DASB and [¹¹C]MDL 100907.* Neuropsychopharmacology, 2012. **37**(6): p. 1465-73.
146. Adamaszek, M., et al., *Evidence of neurotoxicity of ecstasy: sustained effects on electroencephalographic activity in polydrug users.* PLoS One, 2010. **5**(11): p. e14097.

147. Kish, S.J., et al., *Decreased cerebral cortical serotonin transporter binding in ecstasy users: a positron emission tomography/[¹¹C]DASB and structural brain imaging study*. *Brain*, 2010. **133**(Pt 6): p. 1779-97.
148. Downey, L.A. and J.M. Loftis, *Altered energy production, lowered antioxidant potential, and inflammatory processes mediate CNS damage associated with abuse of the psychostimulants MDMA and methamphetamine*. *Eur J Pharmacol*, 2014. **727**: p. 125-9.
149. Bosch, O.G., et al., *Verbal memory deficits are correlated with prefrontal hypometabolism in (¹⁸F)FDG PET of recreational MDMA users*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e61234.
150. Abbott, N.J., et al., *Structure and function of the blood-brain barrier*. *Neurobiol Dis*, 2010. **37**(1): p. 13-25.
151. Abbott, N.J., L. Rönnbäck, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. *Nat Rev Neurosci*, 2006. **7**(1): p. 41-53.
152. Verkman, A.S., *More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 15): p. 3225-32.
153. Nag, S., *Pathophysiology of blood-brain barrier breakdown*. *Methods Mol Med*, 2003. **89**: p. 97-119.
154. Wolburg, H., et al., *Brain endothelial cells and the glio-vascular complex*. *Cell Tissue Res*, 2009. **335**(1): p. 75-96.
155. Abbott, N.J., *Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery*. *J Inher Metab Dis*, 2013. **36**(3): p. 437-49.
156. Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard, *The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications*. *Neurobiol Dis*, 2004. **16**(1): p. 1-13.
157. Persidsky, Y., et al., *Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions*. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006. **1**(3): p. 223-36.
158. Correale, J. and A. Villa, *Cellular elements of the blood-brain barrier*. *Neurochem Res*, 2009. **34**(12): p. 2067-77.
159. Gloor, S.M., et al., *Molecular and cellular permeability control at the blood-brain barrier*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001. **36**(2-3): p. 258-64.
160. Abbott, N.J., *Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*. *J Anat*, 2002. **200**(6): p. 629-38.
161. Luissint, A.C., et al., *Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation*. *Fluids Barriers CNS*, 2012. **9**(1): p. 23.
162. Luissint, A.-C., et al., *Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation*. *Fluids Barriers CNS*, 2012. **9**(1): p. 23.
163. Daneman, R., *The blood-brain barrier in health and disease*. *Ann Neurol*, 2012. **72**(5): p. 648-72.
164. Hallmann, R., et al., *Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(3): p. 979-1000.
165. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 422-33.
166. Hohenester, E. and P.D. Yurchenco, *Laminins in basement membrane assembly*. *Cell Adh Migr*, 2013. **7**(1): p. 56-63.
167. Birk, D.E.B., *Peter Collagens, Suprastructures, and Collagen Fibril Assembly*, in *The Extracellular Matrix: an Overview*, R.P. Mecham, Editor. 2011, Springer Berlin Heidelberg. p. 77-115.
168. Daneman, R. and A. Prat, *The blood-brain barrier*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. **7**(1): p. a020412.
169. Xu, J.M., *Deane Fibronectin and Other Adhesive Glycoproteins*, in *The Extracellular Matrix: an Overview*, R.P. Mecham, Editor. 2011, Springer Berlin Heidelberg. p. 41-75.
170. Etique, N., et al., *LRP-1: a checkpoint for the extracellular matrix proteolysis*. *Biomed Res Int*, 2013. **2013**: p. 152163.
171. Chen, Y. and R.A. Swanson, *Astrocytes and brain injury*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003. **23**(2): p. 137-49.
172. Buffo, A., C. Rolando, and S. Ceruti, *Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **79**(2): p. 77-89.
173. Amiry-Moghaddam, M. and O.P. Ottersen, *The molecular basis of water transport in the brain*. *Nat Rev Neurosci*, 2003. **4**(12): p. 991-1001.
174. Haj-Yasein, N.N., et al., *Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(43): p. 17815-20.

175. Hsu, M.S., et al., *Laminar-specific and developmental expression of aquaporin-4 in the mouse hippocampus*. Neuroscience, 2011. **178**: p. 21-32.
176. Chen, Y. and R.A. Swanson, *The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures*. J Neurochem, 2003. **84**(6): p. 1332-9.
177. Quaegebeur, A., I. Segura, and P. Carmeliet, *Pericytes: blood-brain barrier safeguards against neurodegeneration?* Neuron, 2010. **68**(3): p. 321-3.
178. Armulik, A., A. Abramsson, and C. Betsholtz, *Endothelial/pericyte interactions*. Circ Res, 2005. **97**(6): p. 512-23.
179. Armulik, A., et al., *Pericytes regulate the blood-brain barrier*. Nature, 2010. **468**(7323): p. 557-61.
180. Dziembowska, M. and J. Wlodarczyk, *MMP9: a novel function in synaptic plasticity*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(5): p. 709-13.
181. Thanabalasundaram, G., et al., *Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro*. Brain Res, 2010. **1347**: p. 1-10.
182. Thanabalasundaram, G., et al., *Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro*. Brain Res, 2010. **1347**: p. 1-10.
183. Benekareddy, M., et al., *Antidepressant treatments regulate matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2/MMP-9) and tissue inhibitors of the metalloproteinases (TIMPS 1-4) in the adult rat hippocampus*. Synapse, 2008. **62**(8): p. 590-600.
184. Karin, M., *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16483-6.
185. Wu, C.-Y., et al., *IL-1beta induces MMP-9 expression via a Ca2+-dependent CaMKII/JNK/c-JUN cascade in rat brain astrocytes*. Glia, 2009. **57**(16): p. 1775-89.
186. Ortolano, S. and C. Spuch, *tPA in the central nervous system: relations between tPA and cell surface LRP5*. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2013. **7**(1): p. 65-76.
187. Haorah, J., et al., *Oxidative stress activates protein tyrosine kinase and matrix metalloproteinases leading to blood-brain barrier dysfunction*. J Neurochem, 2007. **101**(2): p. 566-76.
188. Asahi, M., et al., *Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia*. J Neurosci, 2001. **21**(19): p. 7724-32.
189. Chen, Z.L., et al., *Proteolytic fragments of laminin promote excitotoxic neurodegeneration by up-regulation of the KA1 subunit of the kainate receptor*. J Cell Biol, 2008. **183**(7): p. 1299-1313.
190. Mantuano, E., M.S. Lam, and S.L. Gonias, *LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein*. J Biol Chem, 2013. **288**(47): p. 34009-18.
191. Chodobski, A., B.J. Zink, and J. Szymdynger-Chodobska, *Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury*. Transl Stroke Res, 2011. **2**(4): p. 492-516.
192. Watson, P., S.M. Shirreffs, and R.J. Maughan, *Blood-brain barrier integrity may be threatened by exercise in a warm environment*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **288**(6): p. R1689-94.
193. Sharma, H.S., et al., *Cerebrolysin attenuates blood-brain barrier and brain pathology following whole body hyperthermia in the rat*. Acta Neurochir Suppl, 2010. **106**: p. 321-5.
194. Hildebrandt, B., et al., *The cellular and molecular basis of hyperthermia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **43**(1): p. 33-56.
195. Sharma, H.S., J.A. Duncan, and C.E. Johanson, *Whole-body hyperthermia in the rat disrupts the blood-cerebrospinal fluid barrier and induces brain edema*. Acta Neurochir Suppl, 2006. **96**: p. 426-31.
196. Natah, S.S., et al., *Effects of acute hypoxia and hyperthermia on the permeability of the blood-brain barrier in adult rats*. J Appl Physiol (1985), 2009. **107**(4): p. 1348-56.
197. Sharma, H.S. and E.A. Kiyatkin, *Rapid morphological brain abnormalities during acute methamphetamine intoxication in the rat: an experimental study using light and electron microscopy*. J Chem Neuroanat, 2009. **37**(1): p. 18-32.
198. Tourdias, T., et al., *Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 143.
199. Kettenmann, H., et al., *Physiology of microglia*. Physiol Rev, 2011. **91**(2): p. 461-553.
200. Melani, A., et al., *ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia*. Neurochem Int, 2005. **47**(6): p. 442-8.

201. Fiebich, B.L., S. Akter, and R.S. Akundi, *The two-hit hypothesis for neuroinflammation: role of exogenous ATP in modulating inflammation in the brain*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 260.
202. Burnstock, G., *Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 659-797.
203. Lee, H.G., et al., *Microglial P2X₇ receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease*. Exp Mol Med, 2011. **43**(1): p. 7-14.
204. Melani, A., et al., *P2X₇ receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006. **26**(7): p. 974-82.
205. Engel, T., et al., *ATPergic signalling during seizures and epilepsy*. Neuropharmacology, 2015.
206. Frank, M.G., et al., *Stress sounds the alarm: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming*. Brain Behav Immun, 2015. **48**: p. 1-7.
207. Xiong, X.-X., et al., *Probenecid protects against transient focal cerebral ischemic injury by inhibiting HMGB1 release and attenuating AQP4 expression in mice*. Neurochem Res, 2014. **39**(1): p. 216-24.
208. Hayakawa, K., et al., *Delayed treatment with minocycline ameliorates neurologic impairment through activated microglia expressing a high-mobility group box1-inhibiting mechanism*. Stroke, 2008. **39**(3): p. 951-8.
209. Fiuza, C., et al., *Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2652-60.
210. Parkkinen, J. and H. Rauvala, *Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16730-5.
211. Scaffidi, P., T. Misteli, and M.E. Bianchi, *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 191-5.
212. Zhang, J., et al., *Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats*. Stroke, 2011. **42**(5): p. 1420-8.
213. Lu, H., et al., *Relationship between AQP4 expression and structural damage to the blood-brain barrier at early stages of traumatic brain injury in rats*. Chin Med J (Engl), 2013. **126**(22): p. 4316-21.
214. Xiong, X.X., et al., *Probenecid protects against transient focal cerebral ischemic injury by inhibiting HMGB1 release and attenuating AQP4 expression in mice*. Neurochem Res, 2014. **39**(1): p. 216-24.
215. Huang, X.N., et al., *The relationship between aquaporin-4 expression and blood-brain and spinal cord barrier permeability following experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat*. Anat Rec (Hoboken), 2011. **294**(1): p. 46-54.
216. Vella, J., et al., *The central role of aquaporins in the pathophysiology of ischemic stroke*. Front Cell Neurosci, 2015. **9**: p. 108.
217. Zhang, C., et al., *Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(12): p. 1946-54.
218. Dietrich, J.B., *Alteration of blood-brain barrier function by methamphetamine and cocaine*. Cell Tissue Res, 2009. **336**(3): p. 385-92.
219. Song, B.J., et al., *Mechanisms of MDMA (ecstasy)-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and organ damage*. Curr Pharm Biotechnol, 2010. **11**(5): p. 434-43.
220. Kiyatkin, E.A. and H.S. Sharma, *Acute methamphetamine intoxication: brain hyperthermia, blood-brain barrier, brain edema, and morphological cell abnormalities*. Int Rev Neurobiol, 2009. **88**: p. 65-100.
221. Krasnova, I.N. and J.L. Cadet, *Methamphetamine toxicity and messengers of death*. Brain Res Rev, 2009. **60**(2): p. 379-407.
222. Urrutia, A., et al., *A study on the effect of JNK inhibitor, SP600125, on the disruption of blood-brain barrier induced by methamphetamine*. Neurobiol Dis, 2013. **50**: p. 49-58.
223. Northrop, N.A. and B.K. Yamamoto, *Persistent neuroinflammatory effects of serial exposure to stress and methamphetamine on the blood-brain barrier*. J Neuroimmune Pharmacol, 2012. **7**(4): p. 951-68.
224. Martins, T., et al., *Methamphetamine transiently increases the blood-brain barrier permeability in the hippocampus: role of tight junction proteins and matrix metalloproteinase-9*. Brain Res, 2011. **1411**: p. 28-40.

225. Kiyatkin, E.A., P.L. Brown, and H.S. Sharma, *Brain edema and breakdown of the blood-brain barrier during methamphetamine intoxication: critical role of brain hyperthermia*. Eur J Neurosci, 2007. **26**(5): p. 1242-53.
226. Yen, L.F., et al., *Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans blue and sodium fluorescein in rats*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68595.
227. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2005, Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press. xliii, [166] p.
228. Green, A.R., A.J. Cross, and G.M. Goodwin, *Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy")*. Psychopharmacology (Berl), 1995. **119**(3): p. 247-60.
229. Hewitt, K.E. and A.R. Green, *Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by administration of MDMA ('Ecstasy') to rats*. Neuropharmacology, 1994. **33**(12): p. 1589-95.
230. LOWRY, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
231. Abbott, N.J., et al., *Structure and function of the blood-brain barrier*. Neurobiol Dis, 2010. **37**(1): p. 13-25.
232. Pun, P.B.L., J. Lu, and S. Moochhala, *Involvement of ROS in BBB dysfunction*. Free Radic Res, 2009. **43**(4): p. 348-64.
233. Rodsiri, R., et al., *Acute concomitant effects of MDMA binge dosing on extracellular 5-HT, locomotion and body temperature and the long-term effect on novel object discrimination in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2011. **213**(2-3): p. 365-76.
234. Riezzo, I., et al., *Enzymatic-nonenzymatic cellular antioxidant defense systems response and immunohistochemical detection of MDMA, VMAT2, HSP70, and apoptosis as biomarkers for MDMA (Ecstasy) neurotoxicity*. J Neurosci Res, 2010. **88**(4): p. 905-16.
235. Ruth, R.E. and G.S. Feinerman, *Foreign and endogenous serum protein extravasation during harmaline tremors or kainic acid seizures in the rat: a comparison*. Acta Neuropathol, 1988. **76**(4): p. 380-7.
236. Shin, J.A., et al., *Activation of estrogen receptor β reduces blood-brain barrier breakdown following ischemic injury*. Neuroscience, 2013. **235**: p. 165-73.
237. Giannoni, P., et al., *Cerebrovascular pathology during the progression of experimental Alzheimer's disease*. Neurobiol Dis, 2016. **88**: p. 107-117.
238. Albayrak, S., et al., *Effect of transient focal ischemia on blood-brain barrier permeability in the rat: correlation to cell injury*. Acta Neuropathol, 1997. **94**(2): p. 158-63.
239. Weissberg, I., et al., *Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF- β /ALK5 signaling in a model of acquired epilepsy following blood-brain barrier dysfunction*. Neurobiol Dis, 2015. **78**: p. 115-25.
240. van Vliet, E.A., et al., *Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy*. Brain, 2007. **130**(Pt 2): p. 521-34.
241. Braganza, O., et al., *Albumin is taken up by hippocampal NG2 cells and astrocytes and decreases gap junction coupling*. Epilepsia, 2012. **53**(11): p. 1898-906.
242. Ralay Ranaivo, H., et al., *Albumin induces upregulation of matrix metalloproteinase-9 in astrocytes via MAPK and reactive oxygen species-dependent pathways*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 68.
243. Giorgi, F.S., et al., *Previous exposure to (+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine produces long-lasting alteration in limbic brain excitability measured by electroencephalogram spectrum analysis, brain metabolism and seizure susceptibility*. Neuroscience, 2005. **136**(1): p. 43-53.
244. Feldman, K.W. and S. Mazor, *Ecstasy ingestion causing heatstroke-like, multiorgan injury in a toddler*. Pediatr Emerg Care, 2007. **23**(10): p. 725-6.
245. Ke, C., et al., *Heterogeneous responses of aquaporin-4 in oedema formation in a replicated severe traumatic brain injury model in rats*. Neurosci Lett, 2001. **301**(1): p. 21-4.
246. Knowland, D., et al., *Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke*. Neuron, 2014. **82**(3): p. 603-17.
247. Nag, S., R. Venugopalan, and D.J. Stewart, *Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(5): p. 459-69.
248. Martins, T., et al., *Methamphetamine-induced nitric oxide promotes vesicular transport in blood-brain barrier endothelial cells*. Neuropharmacology, 2013. **65**: p. 74-82.

249. Jiao, H., et al., *Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult*. J Mol Neurosci, 2011. **44**(2): p. 130-9.
250. McColl, B.W., N.J. Rothwell, and S.M. Allan, *Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice*. J Neurosci, 2008. **28**(38): p. 9451-62.
251. Errede, M., et al., *Blood-brain barrier alterations in the cerebral cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuropathol Exp Neurol, 2012. **71**(10): p. 840-54.
252. McMillin, M.A., et al., *TGF β 1 exacerbates blood-brain barrier permeability in a mouse model of hepatic encephalopathy via upregulation of MMP9 and downregulation of claudin-5*. Lab Invest, 2015. **95**(8): p. 903-13.
253. Wen, J., et al., *Overexpression of netrin-1 increases the expression of tight junction-associated proteins, claudin-5, occludin, and ZO-1, following traumatic brain injury in rats*. Exp Ther Med, 2014. **8**(3): p. 881-886.
254. Nitta, T., et al., *Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice*. J Cell Biol, 2003. **161**(3): p. 653-60.
255. Keaney, J. and M. Campbell, *The dynamic blood-brain barrier*. FEBS J, 2015.
256. Mueller, A., et al., *Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat*. J Neurotrauma, 2003. **20**(8): p. 745-54.
257. Hamann, G.F., et al., *Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion*. Stroke, 1995. **26**(11): p. 2120-6.
258. Nguyen, J.H., et al., *Matrix metalloproteinase-9 contributes to brain extravasation and edema in fulminant hepatic failure mice*. J Hepatol, 2006. **44**(6): p. 1105-14.
259. Yang, Y. and G.A. Rosenberg, *MMP-mediated disruption of claudin-5 in the blood-brain barrier of rat brain after cerebral ischemia*. Methods Mol Biol, 2011. **762**: p. 333-45.
260. Gu, Z., et al., *A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia*. J Neurosci, 2005. **25**(27): p. 6401-8.
261. Lee, H., et al., *Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia*. Neurobiol Dis, 2009. **34**(2): p. 189-98.
262. Yu, F., et al., *Induction of mmp-9 expression and endothelial injury by oxidative stress after spinal cord injury*. J Neurotrauma, 2008. **25**(3): p. 184-95.
263. Sbai, O., et al., *Differential vesicular distribution and trafficking of MMP-2, MMP-9, and their inhibitors in astrocytes*. Glia, 2010. **58**(3): p. 344-66.
264. Yang, C.-M., et al., *IL-1 β Induces MMP-9-Dependent Brain Astrocytic Migration via Transactivation of PDGF Receptor/NADPH Oxidase 2-Derived Reactive Oxygen Species Signals*. Mol Neurobiol, 2015. **52**(1): p. 303-17.
265. Wu, C.-Y., et al., *Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK and nuclear factor-kappa B in interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocytes*. J Neurochem, 2004. **90**(6): p. 1477-88.
266. Zhang, T., et al., *Excess salt exacerbates blood-brain barrier disruption via a p38/MAPK/SGK1-dependent pathway in permanent cerebral ischemia*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16548.
267. Nito, C., et al., *Role of the p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 signaling pathway in blood-brain barrier disruption after focal cerebral ischemia and reperfusion*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(10): p. 1686-96.
268. Hsieh, H.-L., et al., *Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF- κ B pathways*. J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 88.
269. Tung, W.-H., et al., *Japanese encephalitis virus induces matrix metalloproteinase-9 in rat brain astrocytes via NF- κ B signalling dependent on MAPKs and reactive oxygen species*. Br J Pharmacol, 2010. **161**(7): p. 1566-83.
270. Deng, X., et al., *MiR-21 involve in ERK-mediated upregulation of MMP9 in the rat hippocampus following cerebral ischemia*. Brain Res Bull, 2013. **94**: p. 56-62.
271. Acquas, E., et al., *Differential effects of intravenous R,S-(+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) and its S(+)- and R(-)-enantiomers on dopamine transmission and extracellular signal regulated kinase phosphorylation (pERK) in the rat nucleus accumbens shell and core*. J Neurochem, 2007. **102**(1): p. 121-32.

272. Marie-Claire, C., et al., *Characteristics of dual specificity phosphatases mRNA regulation by 3,4-methylenedioxymethamphetamine acute treatment in mice striatum*. Brain Res, 2008. **1239**: p. 42-8.
273. Munshi, H.G., et al., *Differential regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase activity by ERK 1/2- and p38 MAPK-modulated tissue inhibitor of metalloproteinases 2 expression controls transforming growth factor-beta1-induced pericellular collagenolysis*. J Biol Chem, 2004. **279**(37): p. 39042-50.
274. Zhang, Y. and L.M. Wahl, *Cytokine-induced monocyte MMP-1 is negatively regulated by GSK-3 through a p38 MAPK-mediated decrease in ERK1/2 MAPK activation*. J Leukoc Biol, 2015.
275. Gooyit, M., et al., *Selective gelatinase inhibitor neuroprotective agents cross the blood-brain barrier*. ACS Chem Neurosci, 2012. **3**(10): p. 730-6.
276. Snoek-van Beurden, P.A.M. and J.W. Von den Hoff, *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. Biotechniques, 2005. **38**(1): p. 73-83.
277. Forbes, C., et al., *Active site ring-opening of a thirane moiety and picomolar inhibition of gelatinases*. Chem Biol Drug Des, 2009. **74**(6): p. 527-34.
278. Cui, J., et al., *Inhibition of MMP-9 by a selective gelatinase inhibitor protects neurovasculature from embolic focal cerebral ischemia*. Mol Neurodegener, 2012. **7**: p. 21.
279. Hadass, O., et al., *Selective inhibition of matrix metalloproteinase-9 attenuates secondary damage resulting from severe traumatic brain injury*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e76904.
280. Liu, J., et al., *Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage*. J Neurosci, 2012. **32**(9): p. 3044-57.
281. Gurney, K.J., E.Y. Estrada, and G.A. Rosenberg, *Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation*. Neurobiol Dis, 2006. **23**(1): p. 87-96.
282. Ramos-DeSimone, N., et al., *Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion*. J Biol Chem, 1999. **274**(19): p. 13066-76.
283. Kim, E.-M. and O. Hwang, *Role of matrix metalloproteinase-3 in neurodegeneration*. J Neurochem, 2011. **116**(1): p. 22-32.
284. Kaur, J., et al., *The neurotoxicity of tissue plasminogen activator?* J Cereb Blood Flow Metab, 2004. **24**(9): p. 945-63.
285. Armstead, W.M., et al., *Neutralizing the neurotoxic effects of exogenous and endogenous tPA*. Nat Neurosci, 2006. **9**(9): p. 1150-5.
286. Yepes, M., et al., *Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis*. Blood, 2000. **96**(2): p. 569-76.
287. Tsuji, K., et al., *Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia*. Stroke, 2005. **36**(9): p. 1954-9.
288. Su, E.J., et al., *Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke*. Nat Med, 2008. **14**(7): p. 731-7.
289. Zhang, X., et al., *Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation*. Am J Pathol, 2007. **171**(4): p. 1281-90.
290. Wang, X., et al., *Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1313-7.
291. Papadopoulos, M.C. and A.S. Verkman, *Aquaporin water channels in the nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(4): p. 265-77.
292. Salonen, E.M., A. Zitting, and A. Vaheri, *Laminin interacts with plasminogen and its tissue-type activator*. FEBS Lett, 1984. **172**(1): p. 29-32.
293. Moser, T.L., et al., *The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin contain binding domains for human plasminogen and tissue plasminogen activator*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 18917-23.
294. Skrzypiec, A.E., et al., *Plasmin-mediated degradation of laminin gamma-1 is critical for ethanol-induced neurodegeneration*. Biol Psychiatry, 2009. **66**(8): p. 785-94.
295. Chen, Z.L. and S. Strickland, *Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin*. Cell, 1997. **91**(7): p. 917-25.
296. Yamamoto, K., G. Murphy, and L. Troeberg, *Extracellular regulation of metalloproteinases*. Matrix Biol, 2015. **44-46**: p. 255-63.

297. Fernández-Monreal, M., et al., *Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator?* Mol Cell Neurosci, 2004. **25**(4): p. 594-601.
298. Hahn-Dantona, E., et al., *The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism.* J Biol Chem, 2001. **276**(18): p. 15498-503.
299. Michinaga, S. and Y. Koyama, *Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs.* Int J Mol Sci, 2015. **16**(5): p. 9949-75.
300. Fukuda, A.M., et al., *Posttraumatic reduction of edema with aquaporin-4 RNA interference improves acute and chronic functional recovery.* J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(10): p. 1621-32.
301. Unterberg, A.W., et al., *Edema and brain trauma.* Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 1021-9.
302. He, Z., et al., *Treadmill pre-training ameliorates brain edema in ischemic stroke via down-regulation of aquaporin-4: an MRI study in rats.* PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84602.
303. Pillai, D.R., et al., *Neurovascular protection by targeting early blood-brain barrier disruption with neurotrophic factors after ischemia-reperfusion in rats*.* J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(4): p. 557-66.
304. Simard, J.M., et al., *Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications.* Lancet Neurol, 2007. **6**(3): p. 258-68.
305. Gass, A., T. Niendorf, and J.G. Hirsch, *Acute and chronic changes of the apparent diffusion coefficient in neurological disorders--biophysical mechanisms and possible underlying histopathology.* J Neurol Sci, 2001. **186 Suppl 1**: p. S15-23.
306. Caballero, L., Puentes, S., Rivera, D.M., *Resonancia magnética cerebral: secuencias básicas e interpretación.* Universitas Médica [en línea], 2011. **2 (Julio-Septiembre)**
307. Kahle, K.T., et al., *Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport.* Physiology (Bethesda), 2009. **24**: p. 257-65.
308. Senn, P., et al., *Changes on diffusion-weighted MRI with focal motor status epilepticus: case report.* Neuroradiology, 2003. **45**(4): p. 246-9.
309. Shibuya, S., et al., *[Early detection of brain damages in status epilepticus using apparent diffusion coefficient mapping].* Rinsho Shinkeigaku, 2004. **44**(9): p. 615-7.
310. Fabene, P.F., et al., *Magnetic resonance imaging of changes elicited by status epilepticus in the rat brain: diffusion-weighted and T2-weighted images, regional blood volume maps, and direct correlation with tissue and cell damage.* Neuroimage, 2003. **18**(2): p. 375-89.
311. Wall, C.J., E.J. Kendall, and A. Obenaus, *Rapid alterations in diffusion-weighted images with anatomic correlates in a rodent model of status epilepticus.* AJNR Am J Neuroradiol, 2000. **21**(10): p. 1841-52.
312. Fukuda, A.M., et al., *Delayed increase of astrocytic aquaporin 4 after juvenile traumatic brain injury: possible role in edema resolution?* Neuroscience, 2012. **222**: p. 366-78.
313. Maegele, M., et al., *Multimodal MR imaging of acute and subacute experimental traumatic brain injury: Time course and correlation with cerebral energy metabolites.* Acta Radiol Short Rep, 2015. **4**(1): p. 2047981614555142.
314. Blixt, J., et al., *Aquaporins and blood-brain barrier permeability in early edema development after traumatic brain injury.* Brain Res, 2015. **1611**: p. 18-28.
315. Yang, G.Y., et al., *Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats.* J Neurosurg, 1994. **81**(1): p. 93-102.
316. Rosenberg, G.A. and Y. Yang, *Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia.* Neurosurg Focus, 2007. **22**(5): p. E4.
317. Shigemori, Y., et al., *Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats.* Acta Neurochir Suppl, 2006. **96**: p. 130-3.
318. Wang, Z., et al., *Potential contribution of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 to blood-brain barrier disruption and brain edema after experimental subarachnoid hemorrhage.* J Mol Neurosci, 2012. **48**(1): p. 273-80.
319. Castejón, O.J., *Ultrastructural alterations of human cortical capillary basement membrane in human brain oedema.* Folia Neuropathol, 2014. **52**(1): p. 10-21.
320. Wang, C.X. and A. Shuaib, *Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury.* Prog Neurobiol, 2007. **83**(3): p. 140-8.
321. Hamann, G.F., et al., *Mild to moderate hypothermia prevents microvascular basal lamina antigen loss in experimental focal cerebral ischemia.* Stroke, 2004. **35**(3): p. 764-9.

322. Schöller, K., et al., *Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats*. Brain Res, 2007. **1142**: p. 237-46.
323. Huang, P., et al., *Cerebralcare Granule® attenuates blood-brain barrier disruption after middle cerebral artery occlusion in rats*. Exp Neurol, 2012. **237**(2): p. 453-63.
324. Kaur, J., et al., *Quantitative MRI reveals the elderly ischemic brain is susceptible to increased early blood-brain barrier permeability following tissue plasminogen activator related to claudin 5 and occludin disassembly*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(9): p. 1874-85.
325. Polavarapu, R., et al., *Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit*. Blood, 2007. **109**(8): p. 3270-8.
326. An, J., et al., *Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain*. Blood, 2008. **112**(7): p. 2787-94.
327. Venero, J.L., et al., *Aquaporins in the central nervous system*. Prog Neurobiol, 2001. **63**(3): p. 321-36.
328. Ribeiro, M.d.C., et al., *Time course of aquaporin expression after transient focal cerebral ischemia in mice*. J Neurosci Res, 2006. **83**(7): p. 1231-40.
329. Lu, H. and S.-Q. Sun, *A correlative study between AQP4 expression and the manifestation of DWI after the acute ischemic brain edema in rats*. Chin Med J (Engl), 2003. **116**(7): p. 1063-9.
330. Hirt, L., et al., *Protective role of early aquaporin 4 induction against postischemic edema formation*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(2): p. 423-33.
331. Higashida, T., et al., *The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury*. J Neurosurg, 2011. **114**(1): p. 92-101.
332. Steiner, E., et al., *Loss of astrocyte polarization upon transient focal brain ischemia as a possible mechanism to counteract early edema formation*. Glia, 2012. **60**(11): p. 1646-59.
333. Wolburg-Buchholz, K., et al., *Loss of astrocyte polarity marks blood-brain barrier impairment during experimental autoimmune encephalomyelitis*. Acta Neuropathol, 2009. **118**(2): p. 219-33.
334. Manley, G.T., et al., *Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke*. Nat Med, 2000. **6**(2): p. 159-63.
335. Ikeshima-Kataoka, H., Y. Abe, and M. Yasui, *Aquaporin 4-dependent expression of glial fibrillary acidic protein and tenascin-C in activated astrocytes in stab wound mouse brain and in primary culture*. J Neurosci Res, 2015. **93**(1): p. 121-9.
336. Aoki, K., et al., *Enhanced expression of aquaporin 4 in human brain with infarction*. Acta Neuropathol, 2003. **106**(2): p. 121-4.
337. Sinclair, C., et al., *Absence of aquaporin-4 expression in lesions of neuromyelitis optica but increased expression in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter*. Acta Neuropathol, 2007. **113**(2): p. 187-94.
338. Sun, H., et al., *Aquaporin-4 mediates communication between astrocyte and microglia: Implications of neuroinflammation in experimental Parkinson's disease*. Neuroscience, 2016. **317**: p. 65-75.
339. Liang, D., et al., *Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling*. Neurosurg Focus, 2007. **22**(5): p. E2.
340. Michinaga, S., et al., *Improvement of cold injury-induced mouse brain edema by endothelin ETB antagonists is accompanied by decreases in matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor-A*. Eur J Neurosci, 2015. **42**(6): p. 2356-70.
341. Darvesh, A.S. and G.A. Gudelsky, *Evidence for a role of energy dysregulation in the MDMA-induced depletion of brain 5-HT*. Brain Res, 2005. **1056**(2): p. 168-75.
342. Barbosa, D.J., et al., *The mixture of "ecstasy" and its metabolites impairs mitochondrial fusion/fission equilibrium and trafficking in hippocampal neurons, at in vivo relevant concentrations*. Toxicol Sci, 2014. **139**(2): p. 407-20.
343. Balmelli, C., et al., *[Fatal brain edema after ingestion of ecstasy and benzylpiperazine]*. Dtsch Med Wochenschr, 2001. **126**(28-29): p. 809-11.
344. O'Connor, A., et al., *Death from hyponatraemia-induced cerebral oedema associated with MDMA ("Ecstasy") use*. N Z Med J, 1999. **112**(1091): p. 255-6.
345. Finch, E., L. Sell, and D. Arnold, *Cerebral oedema after MDMA ("ecstasy") and unrestricted water intake. Drug workers emphasise that water is not an antidote to drug*. BMJ, 1996. **313**(7058): p. 690.

346. Baumann, S., et al., [*Hyponatremia-induced life-threatening cerebral edema after ecstasy use*]. Med Klin Intensivmed Notfmed, 2015.
347. Ghatol, A. and A. Kazory, *Ecstasy-associated acute severe hyponatremia and cerebral edema: a role for osmotic diuresis?* J Emerg Med, 2012. **42**(6): p. e137-40.
348. van Dijken, G.D., et al., *High incidence of mild hyponatraemia in females using ecstasy at a rave party*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(9): p. 2277-83.
349. Henry, J.A., et al., *Low-dose MDMA ("ecstasy") induces vasopressin secretion*. Lancet, 1998. **351**(9118): p. 1784.
350. Forsling, M.L., et al., *The effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and its metabolites on neurohypophysial hormone release from the isolated rat hypothalamus*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(3): p. 649-56.
351. Campbell, G.A. and M.H. Rosner, *The agony of ecstasy: MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) and the kidney*. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. **3**(6): p. 1852-60.
352. Krieg, S.M., et al., *Effect of small molecule vasopressin V1a and V2 receptor antagonists on brain edema formation and secondary brain damage following traumatic brain injury in mice*. J Neurotrauma, 2015. **32**(4): p. 221-7.
353. Hertz, L., et al., *Antagonists of the Vasopressin V1 Receptor and of the β (1)-Adrenoceptor Inhibit Cytotoxic Brain Edema in Stroke by Effects on Astrocytes - but the Mechanisms Differ*. Curr Neuropharmacol, 2014. **12**(4): p. 308-23.
354. Kimbler, D.E., et al., *Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41229.
355. Lee, M., et al., *Regulation of AQP4 protein expression in rat brain astrocytes: role of P2X7 receptor activation*. Brain Res, 2008. **1195**: p. 1-11.
356. Bernardino, L., et al., *Inflammatory events in hippocampal slice cultures prime neuronal susceptibility to excitotoxic injury: a crucial role of P2X7 receptor-mediated IL-1beta release*. J Neurochem, 2008. **106**(1): p. 271-80.
357. Choi, H.B., et al., *Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain*. J Neurosci, 2007. **27**(18): p. 4957-68.
358. Murphy, N., et al., *The neuroprotective effect of a specific P2X₇ receptor antagonist derives from its ability to inhibit assembly of the NLRP3 inflammasome in glial cells*. Brain Pathol, 2012. **22**(3): p. 295-306.
359. Rubio-Araiz, A., et al., *3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) disrupts blood-brain barrier integrity through a mechanism involving P2X7 receptors*. Int J Neuropsychopharmacol, 2014. **17**(8): p. 1243-55.
360. Chiao, C.-W., et al., *P2X7 receptor activation contributes to an initial upstream mechanism of lipopolysaccharide-induced vascular dysfunction*. Clin Sci (Lond), 2013. **125**(3): p. 131-41.
361. Gu, B.J. and J.S. Wiley, *Rapid ATP-induced release of matrix metalloproteinase 9 is mediated by the P2X7 receptor*. Blood, 2006. **107**(12): p. 4946-53.
362. Wu, C.-Y., et al., *IL-1 beta induces proMMP-9 expression via c-Src-dependent PDGFR/PI3K/Akt/p300 cascade in rat brain astrocytes*. J Neurochem, 2008. **105**(4): p. 1499-512.
363. Thornton, P., et al., *Matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator mediate interleukin-1-induced neurotoxicity*. Mol Cell Neurosci, 2008. **37**(1): p. 135-42.
364. Chattopadhyay, S., et al., *Cytokine regulation of MMP-9 in peripheral glia: implications for pathological processes and pain in injured nerve*. Brain Behav Immun, 2007. **21**(5): p. 561-8.
365. Chauvet, N., et al., *Rat microglial cells secrete predominantly the precursor of interleukin-1beta in response to lipopolysaccharide*. Eur J Neurosci, 2001. **14**(4): p. 609-17.
366. Ito, A., et al., *Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14657-60.
367. Amantea, D., et al., *Early upregulation of matrix metalloproteinases following reperfusion triggers neuroinflammatory mediators in brain ischemia in rat*. Int Rev Neurobiol, 2007. **82**: p. 149-69.
368. Tian, W. and T.R. Kyriakides, *Matrix metalloproteinase-9 deficiency leads to prolonged foreign body response in the brain associated with increased IL-1beta levels and leakage of the blood-brain barrier*. Matrix Biol, 2009. **28**(3): p. 148-59.
369. Lopez-Castejon, G., et al., *P2X(7) receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases*. J Immunol, 2010. **185**(4): p. 2611-9.

370. Kim, E.-A., et al., *The azetidine derivative, KHG26792 protects against ATP-induced activation of NFAT and MAPK pathways through P2X7 receptor in microglia*. *Neurotoxicology*, 2015. **51**: p. 198-206.
371. Frank, M.G., et al., *The redox state of the alarmin HMGB1 is a pivotal factor in neuroinflammatory and microglial priming: A role for the NLRP3 inflammasome*. *Brain Behav Immun*, 2015.
372. Venereau, E., et al., *Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release*. *J Exp Med*, 2012. **209**(9): p. 1519-28.
373. Laird, M.D., et al., *High mobility group box protein-1 promotes cerebral edema after traumatic brain injury via activation of toll-like receptor 4*. *Glia*, 2014. **62**(1): p. 26-38.
374. Ohnishi, M., et al., *High-mobility group box 1 up-regulates aquaporin 4 expression via microglia-astrocyte interaction*. *Neurochem Int*, 2014. **75**: p. 32-8.
375. Frank, M.G., et al., *The danger-associated molecular pattern HMGB1 mediates the neuroinflammatory effects of methamphetamine*. *Brain Behav Immun*, 2015.
376. Norden, D.M., et al., *Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge*. *Glia*, 2015.
377. Escobedo, I., et al., *Evidence for a role of Hsp70 in the neuroprotection induced by heat shock pre-treatment against 3,4-methylenedioxymethamphetamine toxicity in rat brain*. *J Neurochem*, 2007. **101**(5): p. 1272-83.
378. Cisneros, I.E. and A. Ghorpade, *HIV-1, methamphetamine and astrocyte glutamate regulation: combined excitotoxic implications for neuro-AIDS*. *Curr HIV Res*, 2012. **10**(5): p. 392-406.
379. Weber, E., et al., *Substance use is a risk factor for neurocognitive deficits and neuropsychiatric distress in acute and early HIV infection*. *J Neurovirol*, 2013. **19**(1): p. 65-74.
380. Klein, H., K.W. Elifson, and C.E. Sterk, *Self-esteem and HIV risk practices among young adult ecstasy users*. *J Psychoactive Drugs*, 2010. **42**(4): p. 447-56.
381. Dunn, M., et al., *Sexual and injecting risk behaviours among regular ecstasy users*. *Addict Behav*, 2010. **35**(2): p. 157-60.
382. Danforth, A.L., et al., *MDMA-assisted therapy: A new treatment model for social anxiety in autistic adults*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2016. **64**: p. 237-49.
383. Oehen, P., et al., *A randomized, controlled pilot study of MDMA (\pm 3,4-Methylenedioxymethamphetamine)-assisted psychotherapy for treatment of resistant, chronic Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD)*. *J Psychopharmacol*, 2013. **27**(1): p. 40-52.

ANEXO



3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) disrupts blood-brain barrier integrity through a mechanism involving P2X₇ receptors

Ana Rubio-Araiz*, Mercedes Perez-Hernandez*, Andrés Urrutia, Francesca Porcu, Erika Borcel, Maria Dolores Gutierrez-Lopez, Esther O'Shea and Maria Isabel Colado

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Red de Trastornos Adictivos del Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract

The recreational drug 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 'ecstasy') produces a neuro-inflammatory response in rats characterized by an increase in microglial activation and IL-1 β levels. The integrity of the blood-brain barrier (BBB) is important in preserving the homeostasis of the brain and has been shown to be affected by neuro-inflammatory processes. We aimed to study the effect of a single dose of MDMA on the activity of metalloproteinases (MMPs), expression of extracellular matrix proteins, BBB leakage and the role of the ionotropic purinergic receptor P2X₇ (P2X₇R) in the changes induced by the drug. Adult male Dark Agouti rats were treated with MDMA (10 mg/kg, i.p.) and killed at several time-points in order to evaluate MMP-9 and MMP-3 activity in the hippocampus and laminin and collagen-IV expression and IgG extravasation in the dentate gyrus. Microglial activation, P2X₇R expression and localization were also determined in the dentate gyrus. Separate groups were treated with MDMA and the P2X₇R antagonists Brilliant Blue G (BBG; 50 mg/kg, i.p.) or A-438079 (30 mg/kg, i.p.). MDMA increased MMP-3 and MMP-9 activity, reduced laminin and collagen-IV expression and increased IgG immunoreactivity. In addition, MDMA increased microglial activation and P2X₇R immunoreactivity in these cells. BBG suppressed the increase in MMP-9 and MMP-3 activity, prevented basal lamina degradation and IgG extravasation into the brain parenchyma. A-438079 also prevented the MDMA-induced reduction in laminin and collagen-IV immunoreactivity. These results indicate that MDMA alters BBB permeability through an early P2X₇R-mediated event, which in turn leads to enhancement of MMP-9 and MMP-3 activity and degradation of extracellular matrix.

Received 20 August 2013; Reviewed 27 September 2013; Revised 20 December 2013; Accepted 25 January 2014;
First published online 14 March 2014

Key words: Collagen-IV, IgG, laminin, MDMA, P2X₇R.

Introduction

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) results in both acute and long-term neurotoxic effects in the brain of rodents. The major acute changes observed are an intense cellular stress, reflected by an increase in hydroxyl radical formation and in lipid peroxidation (Colado et al., 1997a, b) and signs of neuro-inflammation consisting of microglial activation (Orio et al., 2004) and several changes in interleukin-1 signal modulators in discrete brain areas (Torres et al., 2010, 2011). In addition, shortly after administration of MDMA there is microglial overexpression of the cannabinoid CB2 receptor, which is thought to be aimed at controlling the production

of pro-inflammatory cytokines. In fact, repeated administration of the CB2 agonist JWH-015 prevents the MDMA-induced reduction in IL-1 receptor type I (IL-1RI) expression and the increase in microglial activation and IL-1 β and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) release (Torres et al., 2011) produced by the drug.

There is evidence showing that blood-brain barrier (BBB) integrity is altered by a number of factors including increased levels of inflammatory cytokines (Shaftel et al., 2007; Tian and Kyriakides, 2009) and free radicals (Gasche et al., 2001; Katsu et al., 2010), factors/mediators, which are increased following administration of MDMA. In turn, both reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines, particularly IL-1 β , are involved in the activation and induction of metalloproteinases (MMPs) *in vivo* as well as *in vitro* (Vecil et al., 2000; Liu and Rosenberg, 2005; Katsu et al., 2010). MMPs are zinc- and calcium-dependent endopeptidases that degrade components of the extracellular matrix and tight-junction proteins in endothelial cells (Rosenberg, 2009). While these functions are essential for remodelling,

Address for correspondence: Professor M. I. Colado, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid 28040, Spain.

Tel.: +91 394 1213 Fax: +91 394 1463

Email: colado@med.ucm.es

* The first two authors contributed equally to this study.

MMPs have also been implicated in the disruption of the BBB, neuro-inflammatory response and neuronal cell death in many neurological diseases (Lindberg et al., 2001; Montaner et al., 2001; Zhou et al., 2011). To our knowledge the effect of MDMA on MMP expression and its consequences on basal lamina degradation have not been studied.

The ionotropic purinergic receptor P2X₇R is an ATP-gated cation channel whose activation by ATP allows influx of Ca²⁺ and Na⁺ and concomitant efflux of K⁺ (Burnstock, 2007). It is highly expressed in macrophage-like cells of the brain (Sim et al., 2004) and is implicated in the microglia response to inflammation (Collo et al., 1997), microglial proliferation (Bianco et al., 2005; Monif et al., 2009), and maturation and release of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β (Solle et al., 2001; Chakfe et al., 2002; Clark et al., 2010). To our knowledge there are no data on the role of P2X₇R linking inflammatory responses with neuronal damage in the MDMA-induced model of neuro-inflammation.

The present study was undertaken to determine: (1) the effect of MDMA on the activity of MMP-9 and MMP-3, expression of laminin and type IV collagen (collagen-IV) and extravasation of IgG in rat hippocampus, (2) the ability of P2X₇R antagonists to prevent the changes induced by MDMA in MMP activities, basal lamina and BBB disruption in the hippocampus, and (3) time-course expression and localization of P2X₇R using double immunostaining for microglial cells.

Materials and method

Animals and drug administration

Male Dark Agouti rats (175–200 g, Harlan Laboratories Models, Spain) were used. Rats were housed in groups of six in conditions of constant temperature (21 \pm 2 °C) and a 12 h light/dark cycle (lights on: 08:00) and given free access to food and water. MDMA was given at the dose of 10 mg/kg (i.p.), animals being sacrificed 1, 3, 6 or 24 h later. Room temperature at the time of MDMA administration was 21–22 °C.

Brilliant Blue G (BBG, 50 mg/kg, i.p. Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was given 10 min before MDMA administration (Peng et al., 2009). This compound was chosen because of its low toxicity (Remy et al., 2008) and high selectivity (Jiang et al., 2000) for blocking the potential adverse effects of P2X₇R activation. In addition, as recent studies have reported the ability of this compound to inhibit voltage gated sodium channels (Jo and Bean, 2011) and to discard that this property might have relevance in the *ex vivo* effects, some of the studies were replicated by administering A-438079 (30 mg/kg, i.p. Tocris Bioscience, UK), a more selective P2X₇R antagonist (Nelson et al., 2006; Marcellino et al., 2010). This compound was injected 60 and 30 min before MDMA. MDMA (Servicio de Estupefacientes y Psicotropos, MSPSI, Spain) and

BBG were dissolved in saline (0.9% NaCl) while A-438079 was dissolved in saline containing ethanol (5%) and Tween 80 (10%). All compounds were given in a volume of 1 ml/kg. Doses of MDMA, BBG and A-438079 are reported in terms of the base.

All experimental procedures were performed in accordance with the guidelines of the Animal Welfare Committee of the Universidad Complutense de Madrid (following European Council Directives 86/609/CEE and 2003/65/CE).

Zymography of matrix metalloproteinases (MMP-9 and MMP-3)

Hippocampi were homogenized and lysed in NP-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, pH 8.0) supplemented with 5% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Protein concentrations were measured using a DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Spain). The activity of MMP-9 was assessed by gelatin zymography and that of MMP-3 by casein zymography. Similar protein quantities were mixed with non reducing Laemmli buffer for 15 min at 37 °C and, for MMP-9 activity, subjected to SDS-PAGE using 9% acrylamide gel containing 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich). For MMP-3 activity, gels used were Novex 12% Zymogram (Casein) Gel (Life Technologies, USA). Gels were removed and washed, incubated for 1 h at room temperature with slight shaking in modified enzymatic activation buffer (50 mM Tris-HCl, 6 mM CaCl₂, 1.5 μ M ZnCl₂, pH 7.4) containing 2.5% Triton X-100 to remove SDS and restore gelatinase activity. Gels were then incubated at 37 °C for 48 h in modified enzymatic activation buffer without Triton X-100. Gels were stained in Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad) until they were coloured dark blue, followed by immersion in destaining solution (40% methanol, 10% acetic acid, 50% water) until bands were clear and the reaction was stopped by placing gels in 10% acetic acid. Gels were dried and digitized. A total of three independent experiments were run, which were densitometrically analysed.

Western blot analysis

Rats were killed and decapitated 1, 3, 6 and 24 h after MDMA administration, the brains rapidly removed and the hippocampus dissected out on ice. Samples were homogenized and lysed in NP-40 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1% NP-40, pH 8.0) supplemented with 5% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Protein concentrations were measured using a DC Protein Assay kit (Bio-Rad). The samples were boiled in Laemmli buffer and proteins were resolved by 7% (for laminin) or 10% (for MMP-9 and MMP-3) SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Non-specific binding was blocked by incubation for 1 h in TBS buffer containing 0.1% Tween 20 and 5% skimmed milk. Membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: polyclonal anti-laminin

(Sigma-Aldrich, 1:1000), anti-MMP9 (Millipore, Spain, 1:1000), anti-MMP3 (Abcam, UK, 1:1000) followed by incubation with the secondary antibodies goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (Santa Cruz, USA, 1:2000), rabbit anti-goat IgG-horseradish peroxidase (Sigma Aldrich 1:5000) and goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (Amersham GE, Spain; 1:5000) for 2 h. Equal protein sample loading was confirmed by quantification of the β -actin signal (Sigma-Aldrich, 1:10 000).

IgG extravasation

IgG leakage from serum into the brain was assessed in the dentate gyrus as a marker of vasculature damage. Rats were anesthetized with sodium pentobarbital and sacrificed. Brains were then frozen in powdered dry ice and stored at -80°C . The brains were sliced at $20\ \mu\text{m}$ in the coronal plane through the hippocampus. After three washes with 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), sections were blocked by incubation with 0.5% BSA, 10% horse serum and 0.1% Triton X-100 for 1 h, incubated at 4°C overnight with the antibody Alexa Fluor[®] 594 donkey anti-rat IgG (1:1000) and covered with ProLong[®] Gold (Life Technologies). Images were acquired with a Zeiss Axio Imager A1 microscope taking 8 fields of $40\times$ magnifications per animal and condition. All images were converted to grey scale and blood vessels were outlined to provide an integrated grey scale value for image analysis with ImageJ Software (version 1.43; NIH, USA).

Immunohistochemistry

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused transcardially through the left ventricle with 200 ml of 0.1 M PBS (pH 7.4) followed by 200 ml of 4% paraformaldehyde-PBS. Brains were removed, post-fixed in the same solution for 4 h and cryoprotected by immersion in 30% sucrose-PBS at 4°C . The brains were sliced at $40\ \mu\text{m}$ in the coronal plane through the hippocampus and stored in cryoprotectant solution at -20°C . For double-labelling studies, cerebral free-floating sections containing dentate gyrus were blocked by incubation with 0.5% BSA, 10% normal horse serum and 0.1% Triton X-100 for 1 h and incubated at 4°C with the appropriate primary antibodies (OX-42, Serotec, Spain, 1:500; P2X₇R, Alomone, Israel, 1:250; laminin, Sigma-Aldrich, 1:1000; Collagen-IV, Abcam, 1:250) followed by the Alexa Fluor[®] 488 donkey anti-rabbit IgG (1:1000), Alexa Fluor[®] 594 donkey anti-mouse IgG (1:1000) and mounted in ProLong[®] Gold with the nuclear marker DAPI (Life Technologies). Images were acquired sequentially on a Leica TCS-SP2AOBS confocal microscope (Leica Microsystems, Germany) for each fluorophore to avoid any cross signal between them. The specificity of the antibodies used was confirmed in the literature and verified by carrying out the corresponding secondary antibody controls to rule out the possibility of reaction between them and images were taken using the same settings for

each antibody staining. In the case of the anti-P2X₇R antibody (Melani et al., 2006) we incubated tissue sections with the corresponding primary and secondary antibodies in the presence of the antigen specific control for the primary antibody, P2X₇R (576–595) Peptide (Alomone, Israel). No signal was detected in the presence of this blocking peptide thus confirming the specificity of the primary antibody for the P2X₇R.

Measurement of rectal temperature

Immediately before and up to 6 h after MDMA injection, temperature was measured by use of a digital readout thermocouple (BAT12 thermometer, Physitemp, USA) with a resolution of 0.1°C and accuracy of $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ attached to a RET-2 Rodent Sensor which was inserted 2.5 cm into the rectum of the rat, the animal being lightly restrained by holding it in the hand. A steady readout was obtained within 10 s of probe insertion. Temperature readings were taken every 30 min immediately before and after MDMA injection and hourly thereafter.

Statistics

Data are presented as mean \pm s.e.m. Data from MMP activity and expression, IgG extravasation, laminin, collagen-IV and P2X₇R expression by Western blot and immunofluorescence and microglial activation were analysed using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls test (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software Inc., USA). Rectal temperature measurements were analysed using two-way ANOVA for repeated measures (BMDP, Statistical Solutions, Ireland). Treatment was used as the between-subjects factor and time as the repeated measure. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results

MDMA increases the expression and activity of MMP-9 and MMP-3

Figure 1a, b illustrate a representative Western blot of the pro-active and active forms of MMP-9 and zymogram in the hippocampus of saline- and MDMA-treated rats.

Gelatin zymography reveals a band at approximately 82 kDa corresponding to the active form of MMP-9 (Fig. 1b). Quantitative image analysis by one-way ANOVA revealed a significant effect of MDMA (10 mg/kg, i.p.) on MMP-9 activity (Fig. 1b; $F_{4,28}=8.87$, $p < 0.0001$). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA produced a substantial increase in MMP-9 activity 1 h (75%) after administration. This effect was not evident at 6 or 24 h although MMP-9 activity remained slightly elevated at 3 h.

To study the possibility that augmented MMP-9 activity was due to increased enzyme expression, Western blot analysis was performed (Fig. 1a). Pro-active and

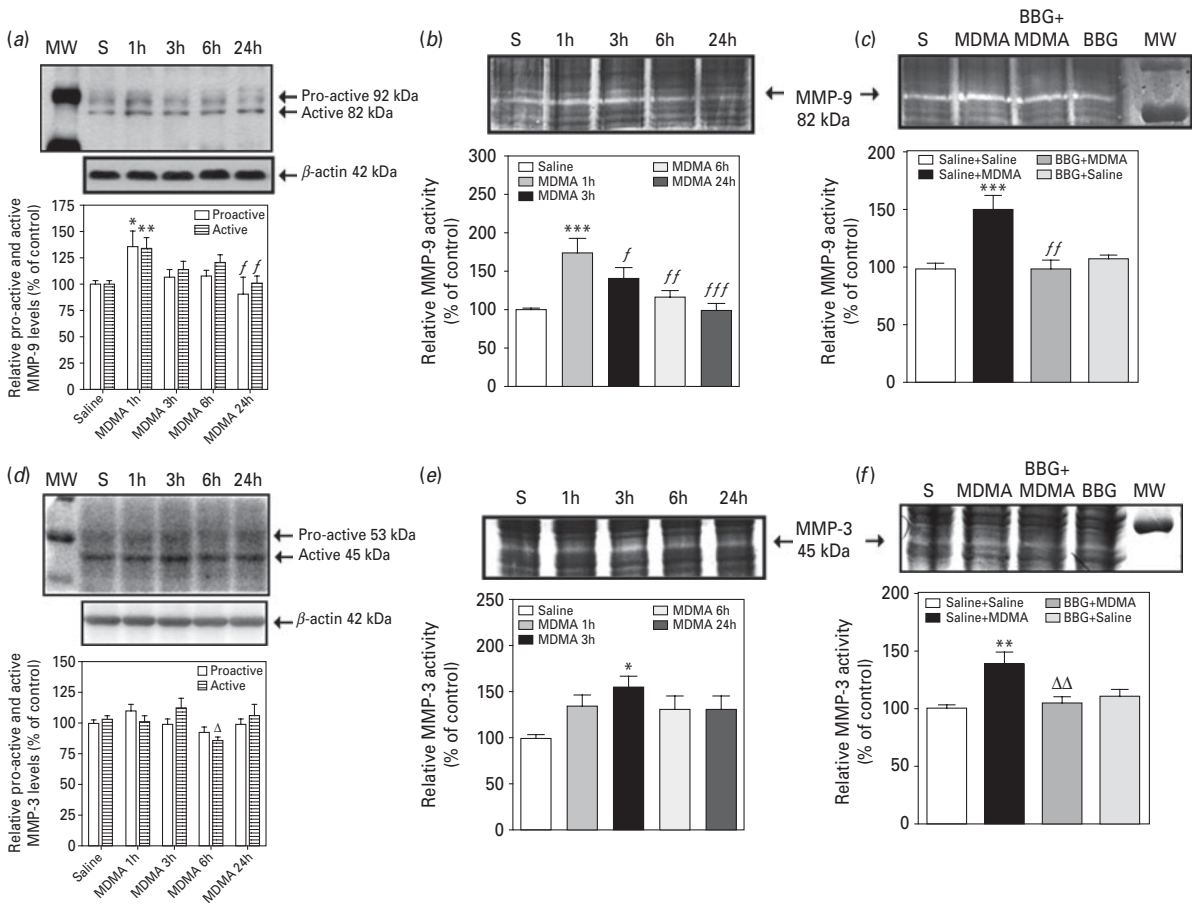


Fig. 1. Time-course of MDMA-induced changes in hippocampal MMP-9 and MMP-3 expression and activity and effect of Brilliant Blue G (BBG). Rats received MDMA (10 mg/kg, i.p.) and were killed 1, 3, 6 or 24 h later. BBG (50 mg/kg, i.p.) was given 30 min before MDMA (10 mg/kg, i.p.) and rats killed 1 h (for MMP-9) or 3 h (for MMP-3) after MDMA. (a) Representative Western blots showing immunoreactivity of the pro-active (92 kDa) and active (82 kDa) MMP-9 and quantitative analysis of protein expression relative to β -actin. MW: molecular weight marker of 100 and 75 kDa. (b) Zymogram of MMP-9 showing gelatinase MMP-9 cleaved as molecular weight of 82 kDa. Quantitative analysis of MMP-9 activity was determined by densitometry of the 82 kDa band. (c) Effect of BBG on the changes induced by MDMA in hippocampal MMP-9 activity. MW: molecular weight marker of 100 and 75 kDa. (d) Representative Western blots showing immunoreactivity of the pro-active (92 kDa) and active (45 kDa) MMP-3 and quantitative analysis of protein expression relative to β -actin. MW: molecular weight marker of 75, 50 and 37 kDa. (e) Zymogram of MMP-3 showing caseinase MMP-3 cleaved as molecular weight of 45 kDa. Quantitative analysis of MMP-3 activity was determined by densitometry of the 45 kDa band. (f) Effect of BBG on the changes induced by MDMA in hippocampal MMP-3 activity. MW: molecular weight marker of 50 kDa. Data expressed as per cent of control. Results shown as mean \pm S.E.M. ($n=5-11$). Different from saline: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Different from MDMA-treated group at 1 h: $^f p<0.05$, $^{ff} p<0.01$, $^{fff} p<0.001$. Different from MDMA-treated group at 3 h: $^{\Delta} p<0.05$, $^{\Delta\Delta} p<0.01$.

active MMP-9 bands were detected at 92 and 82 kDa, respectively (Fig. 1a). Quantitative image analysis of each of the two bands by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on the expression of pro-active MMP-9 (Fig. 1a; $F_{4,28}=3.09$, $p=0.033$) and active MMP-9 (Fig. 1a; $F_{4,27}=4.68$, $p=0.005$). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA significantly increased the expression of pro-active (36%) and active MMP-9 (35%) 1 h after drug administration. This effect was not evident 3, 6 or 24 h later.

Figure 1d, e show a representative Western blot of the pro-active and active forms of MMP-3 and zymogram in the hippocampus of saline- and MDMA-treated rats. Casein zymography shows a band at approximately

45 kDa corresponding to active MMP-3 (Fig. 1e). Quantitative image analysis by one-way ANOVA revealed a significant effect of MDMA (10 mg/kg, i.p.) on MMP-3 activity (Fig. 1e; $F_{4,25}=4.24$, $p=0.009$). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA produced a substantial increase in MMP-3 activity 3 h after administration (55%).

Pro-active and active MMP-3 bands were detected by Western blot at 53 and 45 kDa, respectively (Fig. 1d). Quantitative image analysis of each of the two bands by one-way ANOVA revealed no effect of treatment on the expression of pro-active MMP-3 (Fig. 1d; $F_{4,23}=2.31$, $p=0.089$) and a significant effect of treatment on the

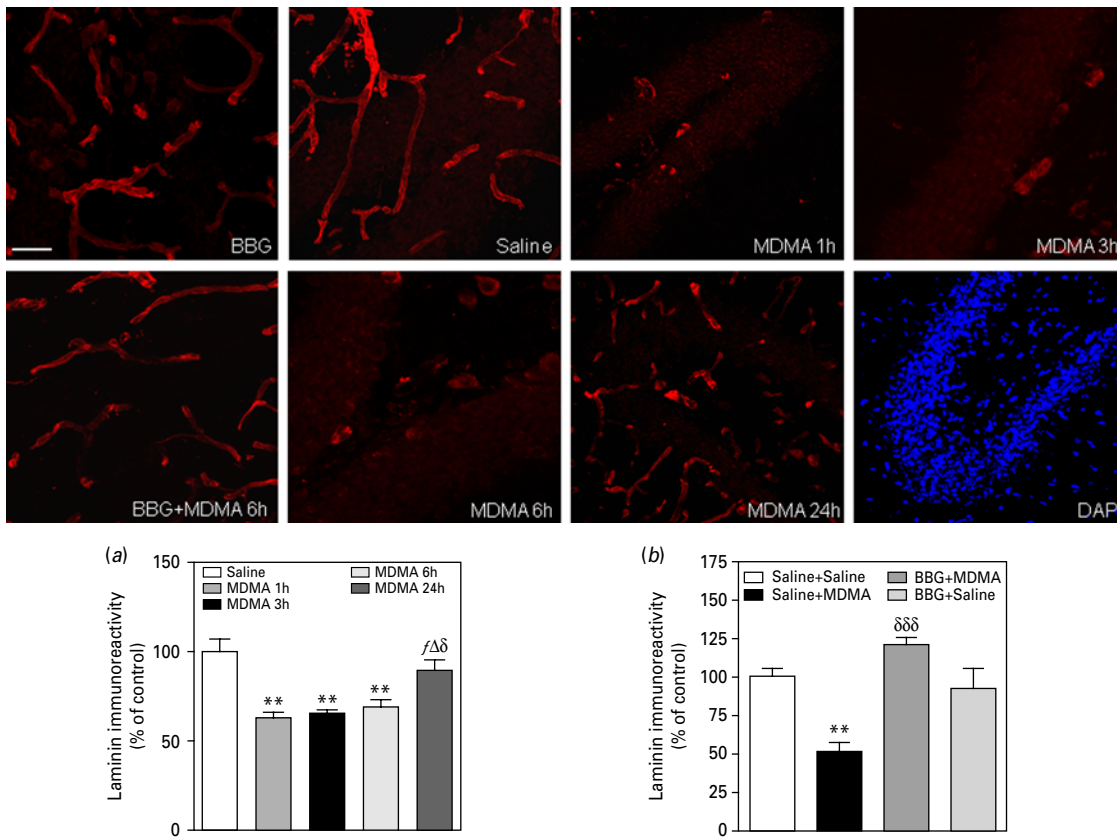


Fig. 2. Time-course of MDMA-induced changes in dentate gyrus laminin immunoreactivity and effect of Brilliant Blue G (BBG). Upper panel shows fluorescence images (40 \times) of representative laminin immunostained sections of dentate gyrus. DAPI staining shows nuclear staining in the dentate gyrus. Scale bar=100 μ m. (a) Quantitative analysis of intensity of immunostaining at different times after MDMA administration. Rats received MDMA (10 mg/kg, i.p.) and were killed 1, 3, 6 or 24 h later. (b) Quantitative analysis of intensity of immunostaining showing effect of BBG on MDMA-induced changes. BBG (50 mg/kg, i.p.) was given 30 min before MDMA (10 mg/kg, i.p.) and rats killed 6 h after MDMA. Data expressed as per cent of control. Results shown as mean \pm S.E.M. ($n=4-9$). Different from saline: ** $p<0.01$. Different from MDMA-treated group at 1 h: ^f $p<0.01$. Different from MDMA-treated group at 3 h: ^Δ $p<0.05$. Different from MDMA-treated group at 6 h: ^δ $p<0.05$, ^{δδδ} $p<0.001$.

expression of active MMP-3 (Fig. 1d; $F_{4,23}=3.39$, $p=0.026$). *Post-hoc* analysis indicated that the expression of active MMP-3 6 h after MDMA injection was different from that observed at 3 h.

MDMA reduces laminin and collagen-IV expression and increases IgG extravasation

An increased activity of MMP-9 and MMP-3 is associated with laminin and collagen-IV degradation. Therefore, by means of immunohistochemical and Western blot studies we examined the effect of MDMA on laminin (Fig. 2, Supplementary Figure S1) and collagen-IV (Fig. 3) immunoreactivity.

Figure 2 (upper panel) shows fluorescence images (40 \times) of representative laminin immunostained sections of dentate gyrus at different times after MDMA administration. Quantitative image analysis by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on the immunoreactivity of laminin (Fig. 2a; $F_{4, 22}=7.54$, $p=0.0006$). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA significantly

reduced laminin immunostaining at 1 h (37%), 3 h (35%) and 6 h (31%).

To further confirm data on laminin, Western blot analyses were carried out. A major band for laminin was detected at 220 kDa (Supplementary Figure S1A). One-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F_{4,24}=10.05$; $p<0.0001$). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA produced a substantial decrease in laminin expression 1 h (48%), 3 h (47%) and 6 h (27%) after dosing.

Figure 3 (upper panel) shows fluorescence images (40 \times) of representative collagen-IV immunostained sections of dentate gyrus at different times after MDMA administration. Quantitative image analysis by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment on the immunoreactivity of collagen-IV (Fig. 3a; $F_{4,21}=6.28$, $p=0.0017$). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA significantly reduced collagen-IV immunostaining at 1 h (60%), 3 h (54%), 6 h (60%) and 24 h (29%).

BBB permeability was visualized and quantified by means of IgG immunostaining (Fig. 4). IgG expression in the brain parenchyma is indicative of disruption of

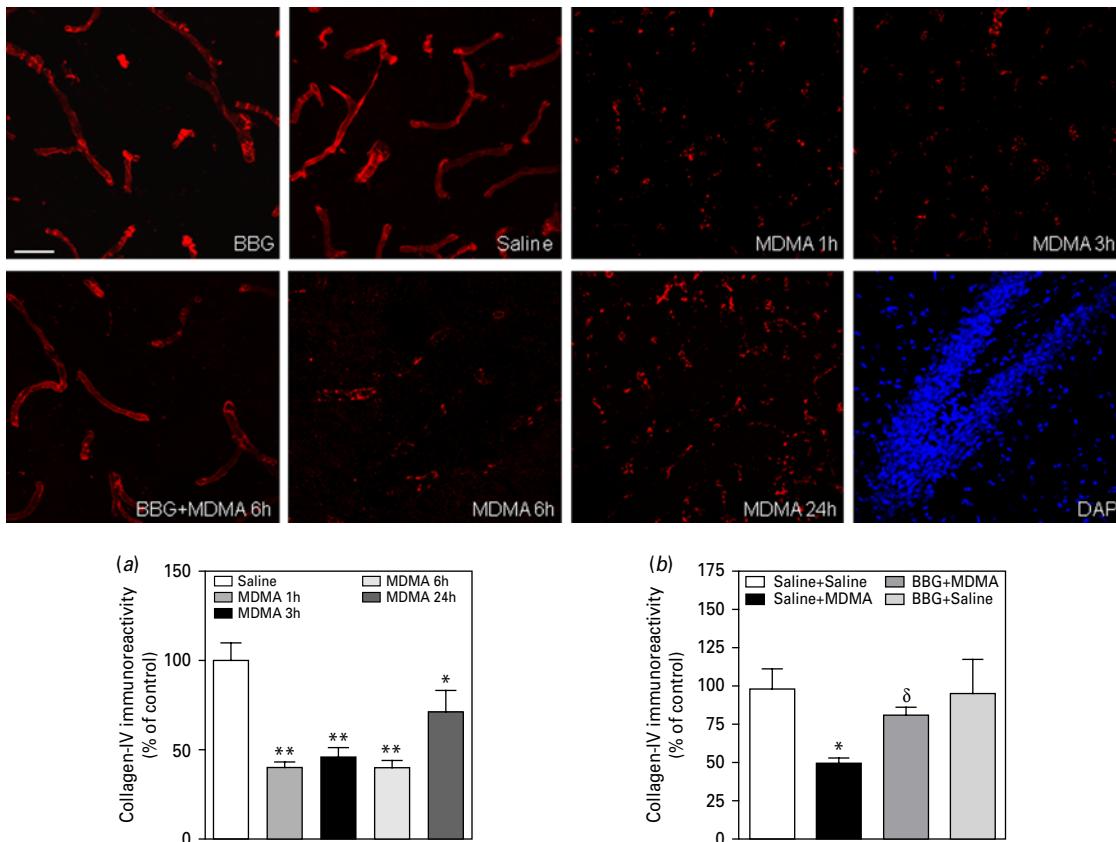


Fig. 3. Time-course of MDMA-induced changes in dentate gyrus collagen-IV immunoreactivity and effect of Brilliant Blue G (BBG). Upper panel shows fluorescence images (40 \times) of representative collagen-IV immunostained sections of dentate gyrus. DAPI staining shows nuclear staining in the dentate gyrus. Scale bar=100 μ m. (a) Quantitative analysis of intensity of immunostaining at different times after MDMA administration. Rats received MDMA (10 mg/kg, i.p.) and were killed 1, 3, 6 or 24 h later. (b) Quantitative analysis of intensity of immunostaining showing effect of BBG on MDMA-induced changes. BBG (50 mg/kg, i.p.) was given 30 min before MDMA (10 mg/kg, i.p.) and rats killed 6 h after MDMA. Data expressed as per cent of control. Results shown as mean \pm S.E.M ($n=4-8$). Different from saline: * $p<0.05$, ** $p<0.01$. Different from MDMA-treated group: $\delta p<0.05$.

the BBB. Figure 4 (upper panel) shows fluorescence images (40 \times) of representative IgG immunostained sections of dentate gyrus at different times after MDMA administration. One-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 4a; $F_{4,22}=2.96$, $p=0.043$). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA substantially increased dentate gyrus IgG leakage 3 h post-injection (38%).

Brilliant Blue G (BBG) prevents the MDMA-induced changes in MMP-9 and MMP-3 activities

To investigate the role of P2X₇R on the changes induced by MDMA in MMP activity, the ability of BBG to prevent these changes was examined. Figure 1c, f show representative zymograms of MMP-9 and MMP-3. Quantitative analysis of MMP-9 and MMP-3 activity by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (for MMP-9: Fig. 1c; $F_{3,16}=10.35$, $p=0.0005$ and for MMP-3: Fig. 1f; $F_{3,30}=7.25$, $p=0.0008$). *Post-hoc* analysis indicated that BBG prevented the MDMA-induced increases in MMP-9 and MMP-3 activities.

BBG prevents the MDMA-induced changes in basal lamina proteins and IgG extravasation

BBG was able to prevent degradation of basal lamina proteins (Fig. 2, Supplementary Figure S1B, Fig. 3) and IgG extravasation (Fig. 4).

Figure 2 (upper panel) shows fluorescence images (40 \times) of representative laminin immunostained sections of dentate gyrus. Quantitative analysis by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 2b; $F_{3,14}=17.83$, $p<0.0001$). *Post-hoc* analysis indicated that BBG completely prevented the MDMA-induced reduction in laminin immunoreactivity (Fig. 2b). These results were confirmed by Western blot analysis (Supplementary Figure S1B). One-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Supplementary Figure S1B; $F_{3,15}=6.03$, $p=0.0066$). *Post-hoc* analysis indicated that BBG completely prevented the MDMA-induced reduction in laminin expression.

Figure 3 (upper panel) shows fluorescence images (40 \times) of representative collagen-IV immunostained sections of dentate gyrus. Quantitative analysis by one-way

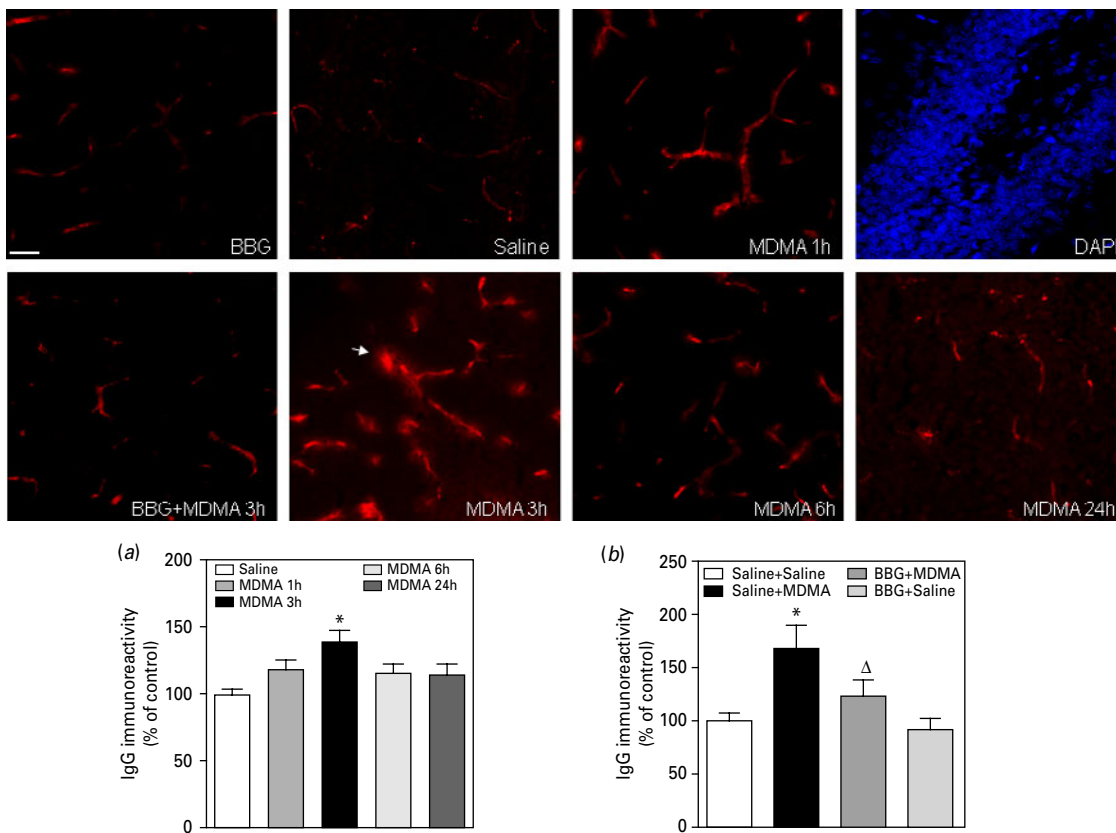


Fig. 4. Time-course of MDMA-induced changes in dentate gyrus IgG immunoreactivity and effect of Brilliant Blue G (BBG). Upper panel shows fluorescence images (40 \times) of representative IgG immunostained sections of dentate gyrus. DAPI staining shows nuclear staining in the dentate gyrus. Scale bar=100 μ m. Arrow shows a transversally cut vessel. (a) Quantitative analysis of intensity of immunostaining at different times after MDMA administration. Rats received MDMA (10 mg/kg, i.p.) and were killed 1, 3, 6 or 24 h later. (b) Quantitative analysis of intensity of immunostaining showing effect of BBG on MDMA-induced changes. BBG (50 mg/kg, i.p.) was given 30 min before MDMA (10 mg/kg, i.p.) and rats killed 3 h after MDMA. Data expressed as per cent of control. Results shown as mean \pm S.E.M ($n=5-6$). Different from saline: * $p<0.05$. Different from MDMA-treated group: $\Delta p<0.05$.

ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 3b; $F_{3,13}=4.92$, $p=0.017$). *Post-hoc* analysis indicated that BBG attenuated the MDMA-induced reduction in collagen-IV immunoreactivity.

Figure 4 (upper panel) shows fluorescence images (40 \times) of representative IgG immunostained sections of dentate gyrus. Quantitative analysis by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 4b; $F_{3,16}=5.61$, $p=0.008$). *Post-hoc* analysis indicated that BBG attenuated the MDMA-induced increase in IgG immunostaining.

A-438079 prevents the MDMA-induced changes in basal lamina proteins

Figure 5 shows fluorescence images (40 \times ; upper panel) of representative laminin (left panel) and collagen-IV (right panel) immunostained sections of dentate gyrus. Quantitative analysis by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 5a, $F_{3,14}=7.80$, $p=0.0024$; Fig. 5b, $F_{3,13}=5.05$, $p=0.0155$). *Post-hoc* analysis indicated that A-438079 prevented the

MDMA-induced reduction in laminin and collagen-IV immunoreactivity.

MDMA increases P2X₇R expression and microglial activation

The effect of MDMA on P2X₇R expression in dentate gyrus was determined at different post-injection time-points (1, 3, 6 and 24 h) by immunohistochemical analyses (Fig. 6). Figure 6 (upper panel) shows fluorescence images (40 \times) of representative sections of dentate gyrus stained for P2X₇R (green). Quantitative analysis of intensity of P2X₇R immunostaining by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 6a; $F_{4,24}=9.28$, $p=0.0001$). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA significantly increased P2X₇R expression 3 h (59%) and 6 h (57%) after dosing. Little modification of the expression of the purinergic receptor was found at 1 and 24 h.

Next, expression of P2X₇R in microglia was examined. First of all, the effect of MDMA on OX-42 immunostaining (red) in dentate gyrus at several post-injection time-points was evaluated (Fig. 6). Figure 6 (upper panel)

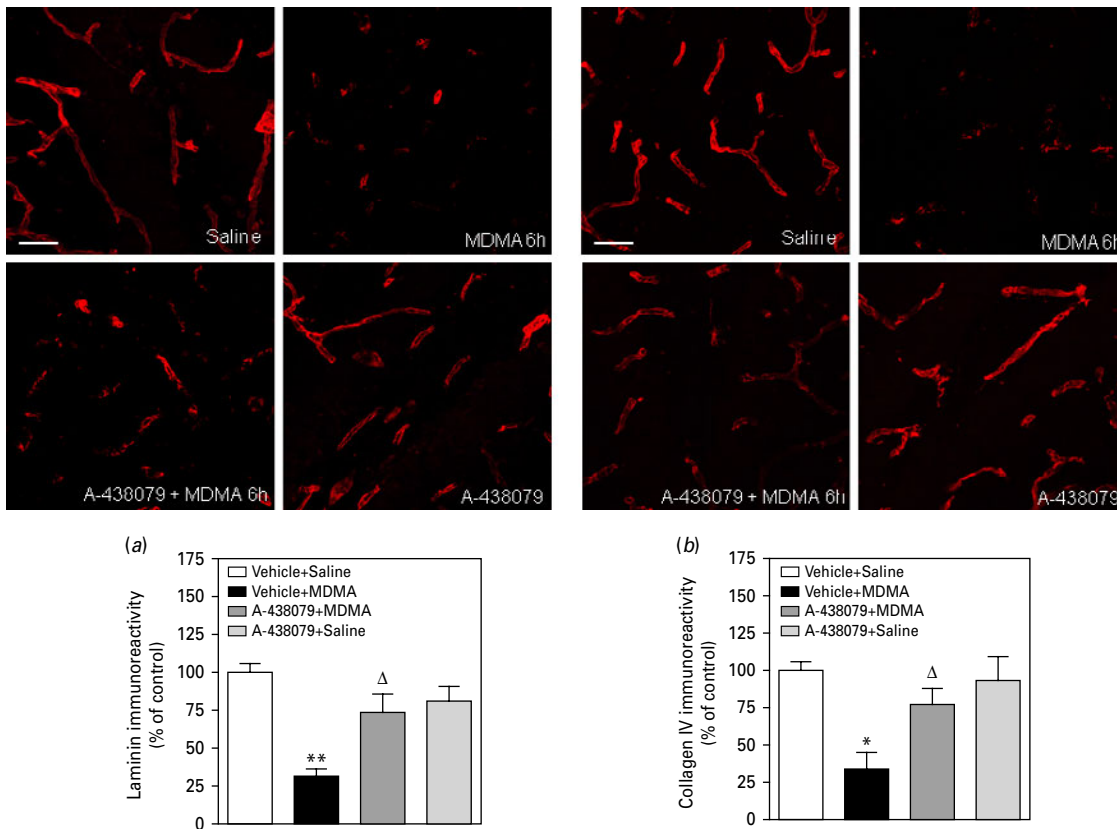


Fig. 5. Effect of A-438079 on the MDMA-induced changes in laminin and collagen-IV immunoreactivity in dentate gyrus. Upper panel shows fluorescence images (40 \times) of representative laminin (left panel) and collagen-IV (right panel) immunostained sections of dentate gyrus. Scale bar=100 μ m. (a) and (b) Quantitative analysis of intensity of immunostaining showing effect of A-438079 +MDMA on laminin and collagen-IV immunoreactivity, respectively. A-438079 (30 mg/kg, i.p.) was given 60 and 30 min before MDMA (10 mg/kg, i.p.) and rats killed 6 h after MDMA. Data expressed as per cent of control. Results shown as mean \pm S.E.M (n=5–6). Different from saline: * p <0.05, ** p <0.01. Different from MDMA-treated group: ^Δ p <0.05.

shows fluorescence images (40 \times) of representative sections of dentate gyrus stained for OX-42. Quantitative analysis of intensity of OX-42 immunostaining by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 6b; $F_{4,24}=10.31$, p <0.0001). *Post-hoc* analysis indicated that there was increased OX-42 immunoreactivity 6 h (54%) after dosing. Merged images of double-immunofluorescence staining showed P2X₇R expression to be localized in microglia at 6 h (Fig. 6, upper panel).

BBG reduces the MDMA-induced changes on P2X₇R expression and microglial activation

Figure 6 (upper panel) shows fluorescence images (40 \times) of representative sections of dentate gyrus stained for P2X₇R (green) and OX-42 (red). Quantitative analysis of P2X₇R immunostaining by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 6c; $F_{3,12}=58.64$, p <0.0001). *Post-hoc* analysis indicated that MDMA increased P2X₇R staining at 6 h and this was reduced by BBG pre-treatment such that P2X₇R immunoreactivity in rats treated with BBG and MDMA was similar to that observed in the saline group.

Because P2X₇R could modulate the microglial activation (Monif et al., 2009), we investigated the effects of BBG on OX-42 immunostaining following MDMA (Fig. 6). Quantitative analysis of OX-42 immunostaining by one-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 6d; $F_{3,10}=28.32$, p <0.0001). *Post-hoc* analysis indicated that OX-42 immunostaining in rats treated with BBG and MDMA was similar to that observed in the saline group.

P2X₇R antagonists do not modify MDMA-induced hyperthermia

Given the importance of hyperthermia in the integrity of the BBB, we studied the effect of BBG and A-438079 on MDMA-induced hyperthermia (Supplementary Figure S2). Two-way ANOVA indicated that there was a significant effect of treatment (Figure S2A, $F_{3,14}=70.78$, p <0.0001; Figure S2B, $F_{3,16}=35.59$, p <0.0001). *Post-hoc* analysis revealed that MDMA increased rectal temperature peaking 30–60 min after injection (Figure S2A, $F_{1,7}=68.18$, p <0.0001; Figure S2B, $F_{1,8}=60.74$, p =0.0001). BBG (Figure S2A) or A-438079

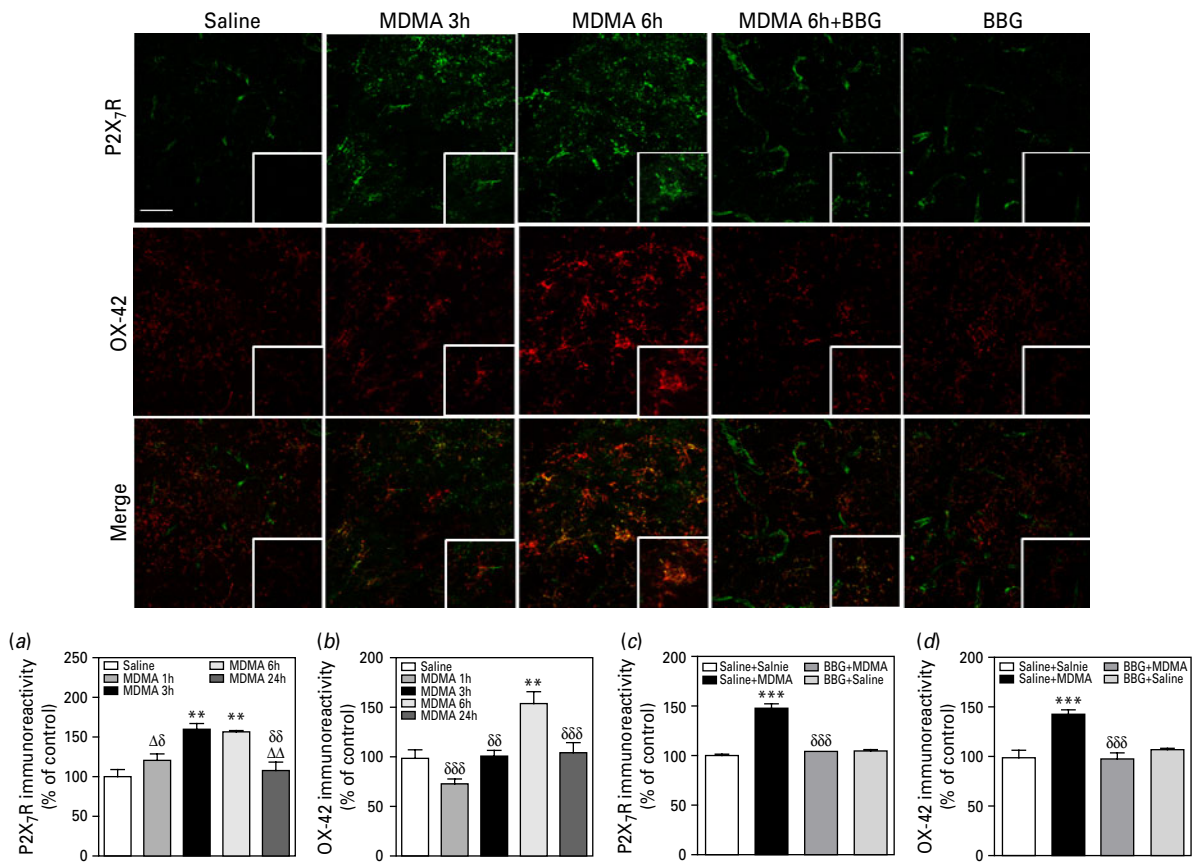


Fig. 6. Time-course of MDMA-induced changes on P2X₇R expression and microglial activation in dentate gyrus and effect of Brilliant Blue G (BBG). Rats received MDMA (10 mg/kg, i.p.) and were killed 1, 3, 6 or 24 h later. BBG (50 mg/kg, i.p.) was given 30 min before MDMA (10 mg/kg, i.p.) and rats killed 6 h after MDMA. Upper panel shows fluorescence images (40×) of representative sections of dentate gyrus stained for P2X₇R (green) and OX-42 (red). Following MDMA P2X₇R staining increased at 3 and 6 h and OX-42 staining increased at 6 h. Merged images show intense colocalization at 6 h. BBG reduced the increased P2X₇R and OX-42 staining induced by MDMA at 6 h. Merged images show a reduction in colocalized staining. Scale bar=100 μm. Insets show a stained amplified microglial cells. Quantitative analysis of intensity of P2X₇R (A) and OX-42 (B) immunostaining at different times after MDMA administration. Data expressed as per cent of control. Results shown as mean±s.e.m. ($n=3-8$). Different from saline: ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. Different from MDMA-treated group at 3 h: $\Delta p<0.05$, $\Delta\Delta p<0.01$. Different from MDMA-treated group at 6 h: $\delta p<0.05$, $\delta\delta p<0.01$, $\delta\delta\delta p<0.001$.

(Figure S2B) did not modify this hyperthermic response ($F_{1,8}=0.62$, $p=0.45$; $F_{1,8}=0.25$, $p=0.63$, respectively) and did not modify the temperature of saline-treated rats ($F_{1,6}=0.74$, $p=0.42$; $F_{1,8}=4.17$, $p=0.08$, respectively).

Discussion

The current study shows for the first time that: (i) administration of a single dose of MDMA produces a marked reduction in laminin and collagen-IV expression associated with a rapid and transient increase in MMP-9 and MMP-3 activity and a short-lived increase in IgG extravasation, (ii) the P2X₇R antagonist BBG prevents the changes induced by MDMA in basal lamina and BBB. A-438079 also attenuates the MDMA-induced reduction in laminin and collagen-IV immunoreactivity, (iii) P2X₇Rs are up-regulated shortly after MDMA administration and colocalize with microglia and (iv) BBG

reduces the microglial activation and increase in P2X₇R induced by MDMA. These results indicate that MDMA disrupts BBB integrity and strongly implicate P2X₇Rs in the regulation of MDMA-induced changes.

Immediately after MDMA administration there is an enhanced MMP-9 proteolytic activity in the hippocampus that is more pronounced and appears before the increased activity of MMP-3. Western blot analysis indicates that the increased MMP-9 proteolytic activity is probably due to increased total protein. The enhanced activity of these MMPs is associated with a greater degradation of the basement membrane proteins, collagen-IV and laminin and with a transient increase in BBB permeability. These observations are consistent with a recent study showing increased MMP-9 activity and expression in striatum following repeated methamphetamine administration (Urrutia et al., 2013). This effect is specifically involved in the disruption of BBB induced by

methamphetamine since administration of a broad spectrum MMP inhibitor, BB-94, is able to prevent laminin degradation and reduce the BBB damage induced by the drug (Urrutia et al., 2013). The cellular source of MMP-9 has not been firmly established but in the striatum of methamphetamine-treated mice the increase in IgG immunoreactivity was seen in the regions where gelatinase activity was most prominent (Urrutia et al., 2013).

The effect of MDMA on MMP-3 activity and expression is a novel finding in this study. Stromelysin-1, known also as MMP-3, likewise contributes to BBB disruption by attacking the components of basal lamina during neuro-inflammation. MMP-3 degrades various collagens, elastin, fibronectin and laminin but also activates latent forms of other matrix metalloproteinases (Ramos-De Simone et al., 1999). MMP-3 knockout mice show less disruption of the BBB after intracerebral LPS injection than that observed in wild-type mice (Gurney et al., 2006). MMP-3 has been reported to be involved in the conversion of pro-MMP9 to the active form (Kim and Hwang, 2011). However, following MDMA the participation of MMP-3 in MMP-9 activation appears unlikely since MMP-3 activity is increased at a later time-point to MMP-9 activity.

To our knowledge there are no previous data on the effect of MDMA on MMP activation and basal lamina degradation. In addition, the effect of MDMA on BBB integrity has scarcely been investigated. There is only a study examining the effects of acute MDMA on BBB dysfunction, brain oedema, and cell injury in rats and mice (Sharma and Ali, 2008). This investigation shows leakage of Evans Blue dye, particularly in the cerebellum, hippocampus, cortex, thalamus and hypothalamus shortly after MDMA. This effect was more pronounced in mice than in rats. A marked increase in brain water along with Na⁺, K⁺, and Cl⁻ content was also seen in the aforementioned brain regions. The presence of distorted neuronal and glial cells in brain regions associated with leakage of Evans Blue was quite common in MDMA-treated animals. Furthermore, increased albumin immunoreactivity, indicating breakdown of the BBB, and up-regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP), suggesting activation of astrocytes, were seen in most brain regions showing oedematous changes. These observations constitute the only evidence that MDMA has the capacity to disrupt BBB permeability to proteins and to induce the formation of oedema, probably by inducing hyperthermia and cellular stress.

In addition to the alterations in BBB permeability, MDMA induces signs of neuro-inflammation reflected as microglial activation. Microglial activation is regulated by various subtypes of nucleotide (P2X, P2Y) and adenosine (A1, A2A and A3) receptors, which control ionic conductances, membrane potential, gene transcription, the production of inflammatory mediators and cell survival. Among them, the role of P2X₇R is especially well established. The P2X₇R is found in various brain cell

populations, and in particular in microglia, whose expression is increased in response to certain experimental cues (Grygorowicz et al., 2010; Engel et al., 2012; Kimbler et al., 2012). Increased microglial activation and up-regulation of P2X₇R is seen in a wide variety of conditions including Alzheimer's disease (Lee et al., 2011), Parkinson's disease (Marcellino et al., 2010), multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis (Yiangou et al., 2006), Huntington's disease (Díaz-Hernández et al., 2009), in the penumbra following cerebral ischemia in rodents (Melani et al., 2006) and following LPS application to rat striatum (Choi et al., 2007). Therefore, we examined the effect of MDMA on the microglial expression of P2X₇R and the ability of a P2X₇R antagonist to reduce the MDMA-induced changes in microglial activation and BBB disruption. The current study shows that MDMA causes overexpression of P2X₇R which is evident 3 h post-injection although increased colocalization was not evident until 6 h, time at which microglial activation occurs. The fact that P2X₇R up-regulation appears before microglial activation indicates that enhanced P2X₇R expression may be driving microglial activation and proliferation (Monif et al., 2009) making their transition from resting to a reactive state.

Administration of the P2X₇R antagonist BBG prevents the increased expression of P2X₇R induced by MDMA in microglial cells and reduces microglial activation. To our knowledge there are no previous data on the effect of a P2X₇R antagonist on the density of P2X₇R in brain tissue and our results suggest that BBG inhibits microglial activation by a mechanism involving a reduction in P2X₇R expression.

Numerous stimuli have been reported to be involved in the increase in MMP activity and the subsequent basal laminin degradation. According to the data in the literature, cytokine release could be involved in the increase in MMP-9 activity (Gottschall and Deb, 1996; Vecil et al., 2000). Previous studies have shown an early increase in IL-1 β following MDMA (Orio et al., 2004), which may induce an increment in MMP expression through NF κ B as is observed in other conditions (Wang et al., 2011; Lee et al., 2012). In line with this, MDMA induces an early increase in p65/p50 heterodimer DNA binding in areas such as the frontal cortex and hypothalamus (Orio et al., 2010). The current study does not allow us to establish an accurate time-course. However, the results suggest that MDMA induces an early increase in IL-1 β release, which would in turn increment MMP activity leading to the degradation of laminin and collagen-IV with concomitant and subsequent IgG extravasation (3 h) and followed by microglia activation (6 h).

A relevant result from this study is that administration of the P2X₇R antagonist, BBG, prevents the changes induced by MDMA in MMP-9 and MMP-3 activities and consequently reduces extracellular matrix degradation and IgG leakage. Similar results were obtained

by using the more selective P2X₇R antagonist, A-438079. These data strongly indicate that early activation of P2X₇R is an initiating factor in this cascade of events. In fact, P2X₇R activation promotes neuro-inflammation by causing the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β and TNF- α (Lister et al., 2007; Tschopp and Schroder, 2010).

The main function of the BBB is to maintain homeostasis of the brain and protect the CNS from endogenous or exogenous toxins within the circulation (Abbott et al., 2010). Drugs inducing BBB disruption may increase the concentration of any CNS active drugs in the brain but also may favour the infiltration of pathological mediators from periphery making the CNS more vulnerable to damage. As mentioned earlier several studies indicate that administration of methamphetamine increases BBB permeability probably leading to the entry into the CNS parenchyma of several small viruses and neurotoxic products of viral metabolism that are retained in the periphery under normal conditions. Methamphetamine is also able to enhance HIV infection of human blood monocyte-derived macrophages, the primary target site for the virus (Liang et al., 2008) and could facilitate the transport of HIV-infected leukocytes into the brain. This effect could explain the high incidence of AIDS-related neurologic disease in methamphetamine users (Cisneros and Ghorpade, 2012; Weber et al., 2013). The interaction between MDMA and HIV remains to be characterized but there is good evidence showing that ecstasy users may be at a heightened risk for the transmission of HIV and other blood-borne viral infections (BBVI) through risky sexual behaviours (Dunn et al., 2010; Klein et al., 2010).

In conclusion, the current study indicates that MDMA increases BBB permeability through an early P2X₇R-mediated event, which enhances MMP-9 and MMP-3 activities and degrades laminin and type IV collagen.

Supplementary material

For supplementary material accompanying this paper, visit <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145714000145>

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, ISCIII and Universidad Complutense-Comunidad de Madrid: SAF2010-21529; PNSD PR47/10-17826, PR61/08-16410, RedRTA (RD06/0001/0006; RD12/0028/0002), FIS PI070892 and UCM-CAM 910258. ARA and AU are recipients of RedRTA post-doctoral contracts; MPH and FP are recipients of pre-doctoral fellowships from the Ministerio de Educación (Spain) and Regione Autonoma Della Sardegna (Italy), respectively. The authors are entirely responsible for the scientific content of this article.

Statement of Interest

None.

References

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13–25.
- Bianco F, Pravettoni E, Colombo A, Schenk U, Möller T, Matteoli M, Verderio C (2005) Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol* 174:7268–7277.
- Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659–797.
- Chakfé Y, Seguin R, Antel JP, Morissette C, Malo D, Henderson D, Séguéla P (2002) ADP and AMP induce interleukin-1beta release from microglial cells through activation of ATP-primed P2X7 receptor channels. *J Neurosci* 22:3061–3069.
- Choi HB, Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG (2007) Modulation of the purinergic P2X7 receptor attenuates lipopolysaccharide-mediated microglial activation and neuronal damage in inflamed brain. *J Neurosci* 27:4957–4968.
- Cisneros IE, Ghorpade A (2012) HIV-1, methamphetamine and astrocyte glutamate regulation: combined excitotoxic implications for Neuro-AIDS. *Current HIV Research* 10:392–406.
- Clark AK, Staniland AA, Marchand F, Kaan TK, McMahon SB, Maccangio M (2010) P2X7-dependent release of interleukin-1 beta and nociception in the spinal cord following lipopolysaccharide. *J Neurosci* 30:573–582.
- Colado MI, O'Shea E, Granados R, Murray TK, Green AR (1997a) *In vivo* evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br J Pharmacol* 121:889–900.
- Colado MI, O'Shea E, Granados R, Misra A, Murray TK, Green AR (1997b) A study of the neurotoxic effect of MDMA ('ecstasy') on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy. *Br J Pharmacol* 121:827–833.
- Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G (1997) Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36:1277–1283.
- Díaz-Hernández M, Díez-Zaera M, Sánchez-Nogueiro J, Gómez-Villafuertes R, Canals JM, Alberch J, Miras-Portugal MT, Lucas JJ (2009) Altered P2X7-receptor level and function in mouse models of Huntington's disease and therapeutic efficacy of antagonist administration. *FASEB J* 23:1893–1906.
- Dunn M, Day C, Bruno R, Degenhardt L, Campbell G (2010) Sexual and injecting risk behaviours among regular ecstasy users. *Addict Behav* 35:157–160.
- Engel T, Jimenez-Pacheco A, Miras-Portugal MT, Diaz-Hernandez M, Henshall DC (2012) P2X7 receptor in epilepsy; role in pathophysiology and potential targeting for seizure control. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4:174–187.
- Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH (2001) Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient

- focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1393–1400.
- Grygorowicz T, Struzyńska L, Sulkowski G, Chalimoniuk M, Sulejczak D (2010) Temporal expression of P2X7 purinergic receptor during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurochem Int* 57:823–829.
- Gottschall PE, Deb S (1996) Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* 3:69–75.
- Gurney KJ, Estrada EY, Rosenberg GA (2006) Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis* 23:87–96.
- Jiang LH, Mackenzie AB, North RA, Surprenant A (2000) Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol Pharmacol* 58:82–88.
- Jo S, Bean BP (2011) Inhibition of neuronal voltage-gated sodium channels by brilliant blue G. *Mol Pharmacol* 80:247–257.
- Katsu M, Niizuma K, Yoshioka H, Okami N, Sakata H, Chan PH (2010) Hemoglobin-induced oxidative stress contributes to matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier dysfunction *in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:1939–1950.
- Kim EM, Hwang O (2011) Role of matrix metalloproteinase-3 in neurodegeneration. *J Neurochem* 116:22–32.
- Kimble DE, Shields J, Yanasak N, Vender JR, Dhandapani KM (2012) Activation of P2X7 promotes cerebral edema and neurological injury after traumatic brain injury in mice. *PLoS ONE* 7:e41229.
- Klein H, Elifson KW, Sterk CE (2010) Self-esteem and HIV risk practices among young adult ecstasy users. *J Psychoactive Drugs* 42:447–456.
- Lee HG, Won SM, Gwag BJ, Lee YB (2011) Microglial P2X₇ receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Mol Med* 43:7–14.
- Lee JY, Kim HS, Choi HY, Oh TH, Yune TY (2012) Fluoxetine inhibits matrix metalloproteinase activation and prevents disruption of blood-spinal cord barrier after spinal cord injury. *Brain* 135:2375–2389.
- Liang H, Wang X, Chen H, Song L, Ye L, Wang SH, Wang YJ, Zhou L, Ho WZ (2008) Methamphetamine Enhances HIV Infection of macrophages. *Am J Pathol* 172:1617–1624.
- Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne L, Freitag P, van der Valk P, Kappos L, Leppert D (2001) The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 124:1743–1753.
- Lister MF, Sharkey J, Sawatzky DA, Hodgkiss JP, Davidson DJ, Rossi AG, Finlayson K (2007) The role of the purinergic P2X7 receptor in inflammation. *J Inflamm* 4:5.
- Liu KJ, Rosenberg GA (2005) Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 39:71–80.
- Marcellino D, Suárez-Boomgaard D, Sánchez-Reina MD, Aguirre JA, Yoshitake T, Yoshitake S, Hagman B, Kehr J, Agnati LF, Fuxe K, Rivera A (2010) On the role of P2X(7) receptors in dopamine nerve cell degeneration in a rat model of Parkinson's disease: studies with the P2X(7) receptor antagonist A-438079. *J Neural Transm* 117:681–687.
- Melani A, Amadio S, Gianfriddo M, Vannucchi MG, Volontè C, Bernardi G, Pedata F, Sancesario G (2006) P2X7 receptor modulation on microglial cells and reduction of brain infarct caused by middle cerebral artery occlusion in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:974–982.
- Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA (2009) The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *J Neurosci* 29:3781–3791.
- Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA, Monasterio J (2001) Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 32:1759–1766.
- Nelson DW, Gregg RJ, Kort ME, Perez-Medrano A, Voight EA, Wang Y, Grayson G, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Niforatos W, Honore P, Jarvis MF, Faltynek CR, Carroll WA (2006) Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J Med Chem* 49:3659–3666.
- Orio L, O'Shea E, Sanchez V, Pradillo JM, Escobedo I, Camarero J, Moro MA, Green AR, Colado MI (2004) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1 beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J Neurochem* 89:1445–1453.
- Orio L, Llopis N, Torres E, Izco M, O'Shea E, Colado MI (2010) A study on the mechanisms by which minocycline protects against MDMA ('ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT cortical neurons. *Neurotox Res* 18:187–199.
- Peng W, Cotrina ML, Han X, Yu H, Bekar L, Blum L, Takano T, Tian GF, Goldman SA, Nedergaard M (2009) Systemic administration of an antagonist of the ATP-sensitive receptor P2X7 improves recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:12489–12493.
- Ramos-De Simone N, Hahn-Dantona E, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP (1999) Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J Biol Chem* 274:13066–13076.
- Remy M, Thaler S, Schumann RG, May CA, Fiedorowicz M, Schuettauf F, Grüterich M, Priglinger SG, Nentwich MM, Kampik A, Haritoglou C (2008) An *in vivo* evaluation of Brilliant Blue G in animals and humans. *Br J Ophthalmol* 92:1142–1147.
- Rosenberg GA (2009) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 8:205–216.
- Shafiel SS, Carlson TJ, Olschowka JA, Kyrkanides S, Matousek SB, O'Banion MK (2007) Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood-brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J Neurosci* 27:9301–9309.
- Sharma HS, Ali SF (2008) Acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine induces profound hyperthermia, blood-brain barrier disruption, brain edema formation, and cell injury. *Ann N Y Acad Sci* 1139:242–258.
- Sim JA, Young MT, Sung HY, North RA, Surprenant A (2004) Reanalysis of P2X7 receptor expression in rodent brain. *J Neurosci* 24:6307–6314.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J Biol Chem* 276:125–132.
- Tian W, Kyriakides TR (2009) Matrix metalloproteinase-9 deficiency leads to prolonged foreign body response in the brain associated with increased IL-1 β levels and leakage of the blood brain barrier. *Matrix Biol* 28:148–159.

- Torres E, Gutierrez-Lopez MD, Borcel E, Peraile I, Mayado A, O'Shea E, Colado MI (2010) Evidence that MDMA ('ecstasy') increases cannabinoid CB2 receptor expression in microglial cells: role in the neuroinflammatory response in rat brain. *J Neurochem* 113:67–78.
- Torres E, Gutierrez-Lopez MD, Mayado A, Rubio A, O'Shea E, Colado MI (2011) Changes in interleukin-1 signal modulators induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): regulation by CB2 receptors and implications for neurotoxicity. *J Neuroinflammation* 8:53.
- Tschopp J, Schroder K (2010) NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* 10:210–215.
- Urrutia A, Rubio-Araiz A, Gutierrez-Lopez MD, ELAli A, Hermann DM, O'Shea E, Colado MI (2013) A study on the effect of JNK inhibitor, SP600125, on the disruption of blood-brain barrier induced by methamphetamine. *Neurobiol Dis* 50:49–58.
- Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, Yong VW (2000) Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma *in vivo*. *J Neurosci Res* 61:212–224.
- Wang Z, Leng Y, Tsai LK, Leeds P, Chuang DM (2011) Valproic acid attenuates blood-brain barrier disruption in a rat model of transient focal cerebral ischemia: the roles of HDAC and MMP-9 inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:52–57.
- Weber E, Morgan EE, Iudicello JE, Blackstone K, Grant I, Ellis RJ, Letendre SL, Little S, Morris S, Smith DM, Moore DJ, Woods SP; TMARC Group (2013) Substance use is a risk factor for neurocognitive deficits and neuropsychiatric distress in acute and early HIV infection. *J Neurovirol* 19:65–74.
- Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P (2006) COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6:12.
- Zhou J, Li J, Rosenbaum DM, Barone FC (2011) Thrombopoietin protects the brain and improves sensorimotor functions: reduction of stroke-induced MMP-9 upregulation and blood-brain barrier injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:924–933.

