

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

Implicación de la vía kinurenina en los efectos inmediatos y a largo plazo inducidos por 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA, éxtasis) en cerebro de rata

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Abuin Martínez

Directoras

**María Isabel Colado Megía
Maria Esther O'Shea Gaya
Rebeca Vidal Casado**

Madrid

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina



**IMPLICACIÓN DE LA VÍA KINURENINA EN LOS
EFECTOS INMEDIATOS Y A LARGO PLAZO
INDUCIDOS POR
3,4-METILENDIOXIMETANFETAMINA
(MDMA, ÉXTASIS) EN CEREBRO DE RATA**

Tesis Doctoral

Cristina Abuin Martínez

Directores:

María Isabel Colado Megía

María Esther O'Shea Gaya

Rebeca Vidal Casado

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Cristina Abuin Martínez,
estudiante en el Programa de Doctorado Investigación Biomédica,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

IMPLICACIÓN DE LA VÍA KINURENINA EN LOS EFECTOS INMEDIATOS Y A LARGO PLAZO
INDUCIDOS POR 3,4-METILENDIOXIMETANFETAMINA (MDMA, ÉXTASIS) EN CEREBRO DE RATA

y dirigida por: María Isabel Colado Megia, Esther O'Shea Gaya, Rebeca Vidal Casado

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 4 de junio de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina



**IMPLICACIÓN DE LA VÍA KINURENINA EN
LOS EFECTOS INMEDIATOS Y A LARGO
PLAZO INDUCIDOS POR
3,4-METILEN-DIOXIMETANFETAMINA
(MDMA, ÉXTASIS) EN CEREBRO DE RATA**

Tesis Doctoral presentada por

Cristina Abuin Martínez

Directores:

María Isabel Colado Megía

María Esther O'Shea Gaya

Rebeca Vidal Casado

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar la gracias a todas aquellas personas que, de una u otra forma, han hecho posible la elaboración de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento a mis directoras de tesis por la confianza y el apoyo que me han dado para llevar a cabo este proyecto. A Maribel Colado, por darme la oportunidad de hacer la tesis doctoral en este laboratorio permitiéndome alcanzar mi sueño de comenzar una carrera investigadora y por su guía durante todos estos años. A Esther O'Shea, por su seguimiento y rigurosidad, por estar disponible siempre, y por todas las cosas que he aprendido de ella a lo largo de este tiempo. A Rebeca Vidal, por su orientación y dedicación, por estar siempre a mi lado para sacar el trabajo adelante, por todos los buenos consejos y las cosas que me ha enseñado, gracias por estar siempre ahí.

También, quisiera dar las gracias al resto de compañeros del laboratorio. A Lola, por toda la ayuda prestada y por su simpatía. A Merce, por los buenos momentos, por su apoyo y sus consejos. A Pablo, por sus ganas de dinamizar el laboratorio. A las nuevas generaciones, Nuria y Leticia por su alegría y sus ánimos. Y a todas las personas que han pasado por el laboratorio estos años, Elena, Álvaro, Sandra, Carlos... por su entusiasmo y sus ganas de aprender cosas nuevas.

Al director del departamento Juan Carlos Leza y a la secretaria del departamento M^a Elena Vicente por su labor y colaboración en la gestión de los trámites burocráticos. A los compañeros del departamento, por toda la ayuda prestada y los buenos ratos vividos. A los técnicos del departamento, al personal del animalario y de limpieza por su asistencia y buena disposición. Al personal de cafetería por darnos cada mañana el sustento de café que todo buen investigador necesita con una sonrisa.

Al laboratorio de Ángel Pazos, en Santander. A Fuen, Álvaro, Elena, Emilio, Eva y al resto de compañeros, por su maravillosa acogida y por permitirme aprender nuevas técnicas en su laboratorio. Al Parque Científico de Madrid por su trabajo y buena disposición durante la realización de los análisis de qPCR.

A mis amigos y mi familia, por su apoyo y comprensión durante estos años y por entender y disculpar mis ausencias. A Marco, mi compañero de viaje, por estar siempre, por sostenerme cuando lo he necesitado y por ayudarme a mejorar cada día. Gracias por compartir tu vida conmigo.

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al apoyo económico procedente de las siguientes entidades: MINECO (SAF2013-40592-R), Red de Trastornos Adictivos del Instituto de Salud Carlos III (RD16/0017/0021), Universidad Complutense de Madrid para el grupo de investigación Neurobiología de anfetaminas y etanol (Grupo de Investigación de la UCM: 910258).

ABREVIATURAS

1-MT: 1-Metil-triptófano

3-OHKYN: 3-Hidroxikinurenina

5-HIAA: Ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT: 5-hidroxitriptamina; serotonina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AhR: Receptor de hidrocarburos de arilo

AhRR: Proteína represora de AhR

ARE: Elementos de respuesta antioxidante

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ARNT: Factor traslocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo

Bax: Proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2: Proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B

BHE: Barrera hematoencefálica

Bmax: Número máximo de sitios de unión

BSA: Albúmina de suero bovino

COMT: Catecol O-metiltransferasa

Cu: Ciclo umbral; número de ciclos de amplificación necesarios para la detección del fluoróforo

CYP450: Citocromo P450

CYP1A1: Citocromo P450 1A1

CYP1A2: Citocromo P450 1A2

CYP1B1: Citocromo P450 1B1

CYP2D: Citocromo P450 2D

DEA: Agencia estadounidense para el Control de Estupefacientes

DIM: 3,3'-Diindolilmetano

DMSO: Dimetilsulfóxido

DRE: Elementos de respuesta a dioxinas

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EEM: Error estándar de la media

ER- α : Receptor de estrógenos alfa

FAD: Flavín adenín dinucleótido

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato
deshidrogenasa

GSH: Glutación

GST-Ya: Subunidad Ya de la
glutación-S-transferasa

[^3H]: Tritio

HDAC-1: Histona deacetilasa 1

HEPES: Ácido 4- (2-hidroxietyl) -1-
piperazineetanosulfónico

HO-1: Hemoxigenasa-1

HPLC: Cromatografía líquida de alta
resolución

HSP90: Proteína de choque térmico 90

I3C: Indol-3-carbinol

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN- γ : Interferón gamma

IgG: Inmunoglobulina G

IL-1 β : Interleuquina 1beta

i.p.: Vía intraperitoneal

i.v.: Vía intravenosa

KAT: Kinurenina aminotransferasa

KMO: Kinurenina monooxigenasa

KYN: Kinurenina

KYNA: Ácido kinurénico

LAT: Transportador de aminoácidos
neutros

LPS: Lipopolisacárido

MAO: Monoaminoxidasa

MAPK: Proteínas quinasas activadas
por mitógeno

MDA: 3,4-Metilendioxianfetamina

MDMA: 3,4-Metilendioximetanfetamina

NAD $^+$: Nicotin adenin dinucleótido

NAD(P)H: Nicotinamida adenina
dinucleótido fosfato

nCi/g: Nanocurios por gramo

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de
las cadenas ligeras kappa de las
células B activadas

N-formilKYN: N'-formilkinurenina	SERT: Transportador de serotonina
NMDA: Receptores N-metil-d-aspartato	SNC: Sistema nervioso central
NQO1: NADPH/Quinona oxidorreductasa	SOCS2: Supresor de la señalización de citoquinas 2
NRF-2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2	SPECT: Tomografía computarizada de emisión monofotónica
OAT: Transportador de ácidos orgánicos	TCDD: 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
PBN: α -Fenil-N-terbutilnitrona	TDO: Triptófano 2,3-dioxigenasa
PET: Tomografía de emisión de positrones	TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta
p/v: Proporción Peso/Volumen	TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa
PVDF: Fluoruro de polivinilideno	TPH: Triptófano hidroxilasa
qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	TRP: Triptófano
QUINA: Ácido quinolínico	UGT: Uridinadifosfato glucuronil transferasa
RNS: Especies reactivas de nitrógeno	UV/VIS: Ultravioleta/Visible
ROS: Especies reactivas de oxígeno	VMAT: Transportador vesicular de monoaminas
RT: Retrotranscripción de ARN	v.o.: Vía oral
SDS: Dodecilsulfato sódico	Vs: <i>versus</i>

v/v: Proporción Volumen/Volumen

XAP2: Proteína asociada al virus de la hepatitis B

XRE: Elementos de respuesta a xenobióticos

ÍNDICE

RESUMEN	15
ABSTRACT	21
INTRODUCCIÓN	27
1. MDMA	27
1.1 Química y síntesis de la molécula de MDMA	28
1.2 Farmacocinética de MDMA.....	29
1.3 Consumo y dependencia de MDMA.....	30
1.4 Efectos de la administración de MDMA en humanos y primates no humanos	33
1.4.1 Efectos a corto plazo de la administración de MDMA en humanos y primates no humanos.....	34
1.4.2 Efectos a largo plazo de la administración de MDMA en humanos y primates no humanos.....	34
1.4.3 Efectos comportamentales y fisiológicos en consumidores de MDMA .	36
1.4.4 Toxicidad de MDMA en humanos.....	37
1.5 Efectos de la administración de MDMA en rata.....	38
1.5.1 Efectos a corto plazo de la administración de MDMA en rata	39
1.5.2 Efectos a largo plazo de la administración de MDMA en rata	42
2. La vía de kinurenina	46
2.1 Distribución de las enzimas de la vía de kinurenina	47
2.2 Regulación de la expresión y la actividad de las enzimas de la vía de kinurenina.....	49
2.2.1 TDO.....	49
2.2.2 IDO.....	50
2.2.3 KMO.....	50
2.2.4 KAT.....	51
2.3 Funciones del precursor y de los principales metabolitos de la vía de kinurenina.....	52
2.3.1 Triptófano.....	52
2.3.2 Kinurenina	53
2.3.3 Otros metabolitos neuroactivos	54
2.4 Enfermedades relacionadas con la vía de kinurenina	57

3. Los receptores de hidrocarburos de arilo	58
3.1 Estructura y distribución de AhR.....	58
3.2 Regulación de la actividad de AhR.....	59
3.3 Ligandos con afinidad por AhR.....	61
3.4 Funciones de AhR e interacción con otras vías de señalización.....	63
3.5 Enfermedades relacionadas con la función de AhR	66
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS	75
1. Animales de experimentación.....	75
2. Compuestos administrados.....	75
3. Diseño experimental	77
3.1 Estudio del efecto de la administración de MDMA sobre la vía de kinurenina	78
3.2 Estudio de los efectos a corto plazo de la administración de MDMA tras la inhibición de las principales enzimas de la vía de kinurenina	79
3.3 Efecto de la administración de MDMA sobre los AhR.....	81
3.4 Estudio de los efectos a corto plazo de la administración de MDMA tras la modulación de los receptores AhR	82
3.5 Estudio de la implicación de la vía de kinurenina sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA	84
3.6 Estudio de la modulación de los receptores AhR sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA	84
4. Obtención y procesamiento de muestras.....	87
4.1 Obtención de muestras biológicas	87
4.2 Procesamiento de tejidos	87
4.2.1 Procesamiento de muestras para el análisis de la concentración de TRP, KYN y 5-HT mediante la técnica de HPLC	87
4.2.2 Preparación de las secciones tisulares para la técnica de autorradiografía	88
4.2.3 Preparación del extracto proteico total.....	89
4.2.3.1 Procesamiento de los distintos tejidos para determinar la expresión de las enzimas implicadas en la vía de kinurenina y en fenómenos antioxidantes.....	89
4.2.3.2 Procesamiento del tejido para determinar la expresión de las proteínas AhR y ARNT	89

4.2.4 Separación de los extractos citosólicos y nucleares	90
4.2.5 Procesamiento para la extracción de ARN.....	90
5. Técnicas experimentales.....	91
5.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	91
5.1.1 Cuantificación de la concentración de TRP y de 5-HT.....	92
5.1.2 Cuantificación de la concentración de KYN.....	92
5.2 Marcaje autorradiográfico del transportador de 5-HT [³ H]citalopram	93
5.3 Cuantificación de la concentración de proteínas.....	94
5.4 Ensayo de la actividad enzimática de TDO	95
5.5 Western blot	97
5.6 Análisis de la expresión génica. RT-PCR cuantitativa	99
5.6.1 Retrotranscripción de ARN (RT)	100
5.6.2 qPCR	100
6. Medición de la temperatura rectal.....	102
7. Análisis estadístico	103
RESULTADOS	107
1. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la vía de kinurenina.....	107
1.1 Efecto de MDMA sobre la concentración de 5-HT, TRP y KYN en cerebro y plasma	107
1.2 Efecto de MDMA sobre la actividad y la expresión de las principales enzimas que participan en la vía de kinurenina	110
1.2.1 Efecto de MDMA sobre la expresión y la actividad enzimática de TDO	111
1.2.2 Efecto de MDMA sobre la expresión de la enzima IDO-1	114
1.2.3 Efecto de MDMA sobre la expresión de las enzimas KMO y KAT II ..	115
2. Papel de las principales enzimas de la vía de kinurenina en la neurotoxicidad inducida por MDMA	117
2.1 Efecto de la inhibición de la enzima TDO sobre los cambios inducidos por MDMA.....	118
2.1.1 Efecto de la inhibición de TDO sobre los niveles de TRP y KYN observados tras la administración de MDMA.....	118
2.1.2 Efecto de la inhibición de TDO sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA.....	119
2.1.3 Efecto de la inhibición de TDO sobre la hipertermia producida por MDMA.....	122

2.2 Efecto de la administración de una dosis de L-kinurenina sobre los cambios inducidos por MDMA.....	122
2.2.1 Efecto de la administración de una dosis de L-kinurenina sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA.....	123
2.2.2 Efecto de la administración de L-kinurenina y probenecid sobre la hipertermia producida por MDMA.....	124
2.3 Efecto de la inhibición de IDO-1 en los cambios inducidos por MDMA.....	126
2.3.1 Efecto de la inhibición de IDO-1 sobre los niveles de TRP y KYN observados tras la administración de MDMA.....	126
2.3.2 Efecto de la inhibición de IDO-1 sobre la hipertermia producida por MDMA.....	129
2.4 Efecto de la inhibición de KMO y KAT II en los cambios inducidos por MDMA.....	130
2.4.1 Efecto de la inhibición de KMO y KAT II sobre la concentración de KYN observada tras la administración de MDMA.....	130
2.4.2 Efecto de la inhibición de KMO y KAT II sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA.....	131
2.4.3 Efecto de los inhibidores de KMO y KAT II sobre la hipertermia producida por MDMA.....	133
3. Papel de los receptores de hidrocarburos de arilo (AhR) en los cambios producidos por la administración de MDMA.....	135
3.1 Efecto de MDMA sobre la actividad y expresión de AhR.....	135
3.2 Efecto del antagonismo de AhR sobre los cambios inducidos por MDMA..	138
3.2.1 Efecto del antagonismo de AhR sobre la actividad del receptor inducida por MDMA.....	139
3.2.2 Efecto del antagonismo de AhR en la neurotoxicidad producida por MDMA.....	139
3.2.3 Efecto del antagonismo de AhR sobre la hipertermia que produce MDMA.....	141
4. Efecto de la administración del DIM sobre los cambios inducidos por MDMA.....	143
4.1 Efecto de la administración de DIM sobre la neurotoxicidad producida por MDMA.....	143
4.2 Efecto de la administración de DIM sobre el estrés oxidativo producido por MDMA a corto plazo.....	144
4.3 Efecto de la administración de DIM sobre la hipertermia producida por MDMA.....	146

DISCUSIÓN	151
1. Implicación de la vía de kinurenina en la neurotoxicidad inducida por MDMA	152
2. Implicación de los receptores AhR en la neurotoxicidad inducida por MDMA	165
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	179

RESUMEN

RESUMEN

MDMA es un derivado anfetamínico con actividad psicotropa que afecta principalmente al sistema serotoninérgico [1]. Numerosos trabajos han descrito que la administración de dosis neurotóxicas de MDMA disminuye la concentración de serotonina (5-HT) y la densidad de los transportadores de 5-HT (SERT) en el hipocampo y la corteza frontal [2-5]. Este efecto neurotóxico está estrechamente relacionado con el estrés oxidativo generado de forma inmediata tras la administración de la droga, ya que se ha observado una disminución del daño serotoninérgico inducido por MDMA tras la administración de atrapadores de radicales libres y otras sustancias antioxidantes [6-8].

El triptófano (TRP) es un aminoácido esencial que actúa como precursor de la síntesis de 5-HT y de la principal ruta metabólica que regula su concentración, la vía de kinurenina [9]. Esta vía metabólica es responsable de la producción de numerosos metabolitos biológicamente activos, y su desregulación ha sido asociada a varias enfermedades neurológicas [10, 11]. La primera reacción de esta ruta está mediada por las enzimas triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) e indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), las cuales transforman el TRP en kinurenina (KYN), metabolito mayoritario de la vía [12]. La KYN actúa como precursor del resto de metabolitos que componen esta ruta metabólica pero, además, es un agonista endógeno del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) [13-15], un factor de transcripción ubicado en el citoplasma cuya actividad está relacionada con diversos mecanismos celulares como la plasticidad y la supervivencia neuronal, la modulación de la respuesta inmune, y la activación de defensas antioxidantes [16-18].

El objetivo de este estudio fue determinar si la administración de una dosis

neurotóxica de MDMA conduce a la activación de la vía de kinurenina, promoviendo mecanismos neuroprotectores que limiten el daño serotoninérgico inducido por la propia droga mediante la activación de los AhR.

La administración de una dosis neurotóxica de MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) produjo un aumento de la concentración de KYN en hipocampo, corteza y plasma 1, 3 y 6 h después de la inyección de MDMA. Los niveles de TRP también se encontraron aumentados en hipocampo y corteza a corto plazo, sin embargo, no se observaron cambios en la concentración plasmática del aminoácido tras la inyección de la droga.

En base a esto, se determinó la contribución de las enzimas TDO e IDO, las cuales median en la síntesis de KYN. El análisis de la actividad de TDO *ex vivo* en homogenados de tejido hepático mostró que MDMA induce un aumento de su actividad enzimática a corto plazo. Este resultado se confirmó mediante la administración del inhibidor específico de TDO 680C91 (10 mg/kg, i.p.), el cual previno el aumento de la concentración de KYN a nivel central y periférico inducido por MDMA. Sin embargo, la inhibición de la IDO mediante el pretratamiento con INCB-024360 (50 mg/kg, i.p.) no indujo cambios en los niveles de KYN, evidenciando así que el incremento observado de la concentración de KYN a corto plazo tras la administración de MDMA es debido, en parte, a un aumento de la actividad de la enzima TDO hepática.

Para determinar si los cambios observados en la vía de kinurenina estaban relacionados con el efecto neurotóxico producido por MDMA a largo plazo, se empleó nuevamente el inhibidor de TDO, o una dosis exógena de L-kinurenina (100 mg/kg, i.p.) junto con probenecid (50 mg/kg, i.p.), y se analizó la densidad de los SERT en hipocampo y corteza mediante su marcaje con [³H]citalopram 7 días

después de la administración de los compuestos. La inhibición de TDO potenció el efecto neurotóxico a largo plazo inducido por la droga, mientras que la administración de kinurenina junto con probenecid lo atenuó. Estos resultados indican que el incremento de los niveles de KYN inducidos por MDMA podría limitar el daño serotoninérgico derivado de su administración.

Considerando los resultados comentados previamente, donde se observó un aumento de la concentración de KYN a nivel central inducido por MDMA, y debido a que este metabolito actúa como agonista de los AhR, se analizó el estado del receptor en el hipocampo tras la inyección de la droga. Los datos mostraron un aumento de la actividad transcripcional de los AhR 1 y 3 h después del tratamiento con MDMA, coincidiendo con el incremento de la concentración de KYN previamente observado. Para determinar si la activación de AhR podría estar participando en un mecanismo neuroprotector frente al daño serotoninérgico a largo plazo producido por la droga, se moduló la actividad de estos receptores mediante la administración del antagonista específico CH-223191 (10 mg/kg, i.p.) y el agonista 3,3'-diindolilmetano (DIM; 250 mg/kg, v.o.). La inhibición del receptor mediante su antagonista potenció la neurotoxicidad producida por MDMA en hipocampo y corteza frontal, mientras que la administración de DIM previno parcialmente el daño serotoninérgico en estas áreas cerebrales, indicando que la activación de AhR observada en las primeras horas tras la inyección de MDMA limita el daño serotoninérgico a largo plazo inducido por la droga.

Con el fin de estudiar el mecanismo neuroprotector desencadenado por DIM se determinó el efecto de su administración sobre el estrés oxidativo generado por MDMA a corto plazo en tejido hipocampal mediante el análisis de la expresión de las enzimas hemoxigenasa-1 y catalasa, las cuales pueden verse incrementadas en

respuesta a la producción de radicales libres [19-23]. MDMA indujo un aumento de la expresión de ambas enzimas que fue prevenido en las ratas que recibieron el pretratamiento con DIM, sugiriendo que DIM podría estar disminuyendo el estrés oxidativo inducido por la droga mediante su función como atrapador de radicales libres [24-27], induciendo así un efecto neuroprotector frente a la toxicidad de MDMA.

En conjunto, los resultados de la presente Tesis Doctoral revelan que la administración de una dosis neurotóxica de MDMA produce un aumento de la actividad de TDO y, como consecuencia, un incremento a corto plazo de la concentración de KYN en el cerebro el cual podría activar a los AhR, limitando así la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

ABSTRACT

ABSTRACT

MDMA is an amphetamine derivative, which exhibits psychotropic activity with the serotonergic system as its primary target [1]. Previous studies have revealed that MDMA administration causes a marked decrease in serotonin (5-HT) concentration and density of 5-HT transporters (SERT) in hippocampus and frontal cortex, constituting experimental evidence for serotonergic toxicity induced by the drug [2-5]. The neurotoxic effect is closely related to MDMA-induced oxidative stress since free radical scavengers and other antioxidant substances protect against the serotonergic damage produced by the drug [6-8].

Tryptophan (TRP) is an essential amino acid that acts as a precursor of 5-HT synthesis and is mainly degraded by the kynurenine pathway [9], a cascade of enzymatic steps containing several biologically active metabolites whose alteration may cause diverse neurological diseases [10, 11]. The first and rate-limiting step in this pathway is the conversion of TRP to kynurenine (KYN), the major metabolite of the pathway, which is mediated by either of two enzymes, tryptophan 2,3-dioxygenase enzyme (TDO) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [12]. KYN acts as a common precursor for its downstream metabolites in this pathway, but it is also an endogenous agonist of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) [13-15], a transcription factor located in the cytoplasm whose activity is related to various cellular processes such as neuronal plasticity and survival, modulation of the immune response, and activation of antioxidant defenses [16-18].

The aim of this study was to assess whether the administration of a neurotoxic dose of MDMA leads to the activation of the kynurenine pathway, promoting an AhR-mediated neuroprotective response that limits the serotonergic damage induced by the drug.

The administration of a neurotoxic dose of MDMA (12.5 mg/kg, i.p.) increased KYN concentration in hippocampus, frontal cortex and plasma 1, 3 and 6 h after MDMA injection. In line with the observed KYN concentrations, hippocampal and frontal cortex TRP levels were also increased during the first few hours following drug administration, however; no differences were observed in plasma TRP concentration between groups at any time point measured. Next, the contribution of TDO and IDO enzymes to KYN synthesis was analyzed. The functional state of TDO was evaluated by an *ex vivo* assay in homogenates of liver tissue. TDO activity was markedly raised in the liver of MDMA-treated rats during the first few hours after drug administration. To further confirm the involvement of TDO in the activation of the kynurenine pathway after a single dose of MDMA, we used the specific TDO inhibitor 680C91 (10 mg/kg, i.p.). In line with the previous results, MDMA-induced peripheral and central KYN production was partially inhibited by 680C91. Inhibition of IDO by INCB-024360 (50 mg/kg, i.p.) did not induce any changes in hippocampal and plasma KYN levels. Taken together, these results may indicate that the short-term increase of KYN concentration after administration of MDMA is due, in part, to an increased TDO activity in the liver.

We evaluated the effect of activation of the KYN pathway on long-term MDMA neurotoxicity. For this purpose we used a quantitative autoradiographic assay where SERT were labelled with [³H]citalopram. We first analyzed the effect of TDO inhibition on MDMA toxicity by using the TDO inhibitor 680C91 and we also examined the effect of an exogenous dose of L-kynurenine (100 mg/kg, i.p.) co-administered with probenecid (50 mg/kg, i.p.) in hippocampus and cortex 7 days after drug administration. We found that while inhibition of TDO potentiated the long-term neurotoxic effect induced by the drug, measured as a decrease in SERT

density, co-administration of L-kynurenine with probenecid attenuated MDMA-induced serotonergic damage. Together, these results indicate that the increased KYN levels induced by MDMA may actually contribute to limiting the neurotoxicity produced by the drug.

Based on our previous results, which showed an increase of KYN concentration induced by MDMA in brain, and since KYN is an AhR agonist, we analyzed the activation state of the receptor in the hippocampus after an injection of MDMA. We observed that MDMA increased AhR transcriptional activity 1 and 3 h after its injection, coinciding with the times at which KYN concentration was increased. In order to determine whether the activation of AhR may be contributing to a neuroprotective mechanism against the long-term MDMA-induced serotonergic damage, the receptor activity was modulated by the administration of the specific antagonist CH-223191 (10 mg/kg, i.p.) or the agonist 3,3'-diindolylmethane (DIM; 250 mg/kg, orally). Inhibition of AhR by CH-223191 potentiated MDMA neurotoxicity in hippocampus and frontal cortex, whereas DIM administration partially prevented serotonergic damage in these brain regions, indicating that the activation of AhR observed in the early hours after MDMA injection limits the long-term serotonergic damage induced by the drug.

In order to study the neuroprotective mechanism of DIM, we determined the effect of DIM on the short-term MDMA-mediated oxidative stress in hippocampal tissue through analysis of the expression of the antioxidant enzymes hemoxygenase-1 and catalase, which increase as a response to free radical overproduction [19-23]. MDMA induced an increase in the expression of both enzymes that was prevented in rats pretreated with DIM, suggesting that DIM could be decreasing the oxidative stress induced by the drug through its free radical scavenger activity [24-27] and

therefore inducing a neuroprotective effect against the toxicity of MDMA.

In conclusion, the results shown in this Doctoral Thesis reveal that the administration of a neurotoxic dose of MDMA produces an increase of TDO activity and, consequently, a short-term increase in KYN concentration in brain, which may activate AhR and thus limit the long-term MDMA-induced neurotoxicity.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. MDMA

La 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) es una sustancia sintética con actividad psicotrópica derivada de la anfetamina. Se ha empleado principalmente como droga de abuso en ambientes relacionados con la cultura *rave* por sus efectos entactógenos y estimulantes [28]. Sin embargo, en los últimos años, se han realizado varios ensayos clínicos que pueden llegar a redefinir la MDMA como posible tratamiento coadyuvante en psicoterapia para trastornos mentales como el síndrome de estrés postraumático [29]. Estos trabajos se basan en la capacidad de MDMA para promover la comunicación emocional y constituyen una gran evidencia para impulsar una nueva regularización que permita su uso a nivel terapéutico [30-34].

MDMA fue sintetizada por primera vez en 1912 por la farmacéutica Merck KGaA como un producto intermedio en el desarrollo de la metilhidrastinina, un compuesto con actividad hemostática derivado de la hidrastinina; sin embargo, no fue hasta 1927 cuando se realizaron los primeros ensayos en animales para determinar sus posibles efectos. A mediados del siglo XX, se recuperó el interés por esta sustancia como parte de la búsqueda de estimulantes, siendo resintetizada nuevamente por la misma compañía [35, 36]. En esta misma época, el ejército de EE.UU. realizó estudios para evaluar la toxicidad de MDMA y otros análogos de la mescalina, empleando cobayas, ratas, ratones, monos y perros, donde se concluyó que MDMA producía menos toxicidad que otros compuestos relacionados [35]. Pocas décadas después, MDMA comenzó a distribuirse como droga recreativa en distintas ciudades de EE.UU. y, por primera vez, se describieron algunos de sus efectos en humanos. Coincidiendo con este hecho, distintos psicoterapeutas comenzaron a emplear esta

sustancia durante algunas de sus sesiones debido a su capacidad para facilitar la comunicación con los pacientes [37, 38]. Sin embargo, en 1985, a pesar de los informes elaborados por diferentes psicoterapeutas, MDMA fue clasificada en la Lista I de Sustancias Controladas por la Agencia Estadounidense para el Control de Estupefacientes (US Drug Enforcement Administration, DEA), prohibiendo el uso de esta sustancia por su elevado potencial de abuso y en base al trabajo publicado por Ricaurte et al. [39], donde se observaron efectos neurotóxicos derivados de la 3,4-metilendioxfanfetamina (MDA), uno de los metabolitos activos procedentes de la degradación de MDMA en el organismo.

1.1 Química y síntesis de la molécula de MDMA

MDMA o (RS) N-metil-1-(3,4-metilendioxfenil) propan-2-amina o 3,4-metilendioximetanfetamina ($C_{11}H_{15}NO_2$) pertenece al grupo de las feniletilaminas. Posee una estructura derivada de la anfetamina con un grupo metilendioxi (-O-CH₂-O-) en las posiciones 3 y 4 del anillo aromático. Además, a diferencia de la anfetamina, MDMA posee una amina secundaria formada a partir de su unión con un grupo metilo, lo que posiblemente provoca que presente una menor actividad alucinógena en comparación con otras sustancias de la familia de las feniletilaminas como la MDA o la mescalina, las cuales poseen una amina primaria en su estructura (figura 1) [40, 41].

La síntesis de MDMA genera una mezcla racémica debido a que su estructura contiene un carbono quiral. El isómero "S" es el más psicoactivo, produciendo un efecto mayor sobre la liberación de 5-HT (5-hidroxitriptamina, serotonina) y de otros neurotransmisores, así como una mayor reducción de las concentraciones de 5-HT a largo plazo [37, 42, 43]. Uno de los precursores más usados actualmente en la

síntesis de MDMA es la piperonilmetilcetona (PMK), pero además puede ser producida a partir del safrol, un compuesto de origen natural [44]. MDMA se sintetiza en forma de base libre, sin embargo, debido a que es un aceite espeso, inestable y altamente cáustico no es adecuado para el consumo. La manipulación de MDMA en forma de sal es más común, principalmente como clorhidrato, ya que proporciona solubilidad al compuesto para su posterior formulación [28].

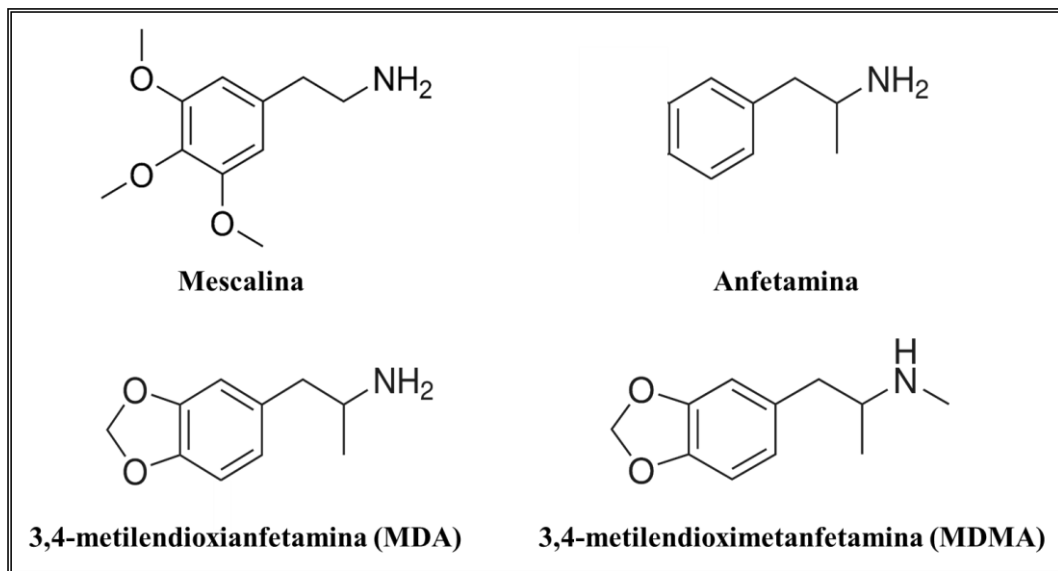


Figura 1: Estructura química de algunas feniletilaminas, entre ellas la MDMA.

1.2 Farmacocinética de MDMA

MDMA es activa en humanos a partir de dosis comprendidas entre 75 y 100 mg (1-1,5 mg/kg; v.o.). Establecer una equivalencia entre modelos animales y humanos resulta complicado debido principalmente a las diferencias metabólicas entre especies [45, 46]. En el caso de la rata, uno de los modelos más usados en investigación para el estudio de los efectos de MDMA, los niveles plasmáticos se correlacionan con los de humanos únicamente a dosis bajas (p. ej. 2 mg/kg en humanos frente a 7 mg/kg en la rata). Cuando estas son más elevadas, las diferencias metabólicas requieren incrementar la dosis en rata para alcanzar concentraciones

plasmáticas de la droga similares a las observadas en humanos [46-48].

La metabolización de MDMA se produce principalmente en el hígado, aunque una parte también puede ser metabolizada por otros órganos como el cerebro. El primer paso de su transformación consiste en la N-desmetilación y la O-desmetilación mediada por varias proteínas de la familia del citocromo P450 (CYP450), dando lugar a metabolitos derivados del catecol. Algunos de estos productos pueden ser metabolizados por la catecol O-metiltransferasa (COMT) o sufrir reacciones de oxidación generando radicales libres, además de formar conjugados con glutatión (GSH) reduciendo así las defensas antioxidantes [1, 41, 49]. La eliminación de MDMA y sus metabolitos se produce principalmente a través de la orina pero también puede detectarse en saliva, sudor o pelo, siendo de unas 40 h el tiempo que tarda en desaparecer del organismo [46, 47].

1.3 Consumo y dependencia de MDMA

La vía de administración más utilizada en el consumo de MDMA es la vía oral, aunque también existen algunas menos habituales como la intranasal o la intravenosa. Puede encontrarse en forma de cristal, polvo o comprimido, siendo esta última la más habitual debido a que permite presentaciones más atractivas con diferentes formas, colores y troquelados con fines de mercado [28, 46, 50]. El rango de dosis por comprimido es muy variable y se ha ido incrementando desde los últimos 10 años. En la actualidad se han detectado cantidades desde 125 mg llegando hasta un máximo de 270-340 mg en cada uno [44, 51, 52], sin embargo, algunos consumidores de esta sustancia pueden llegar a ingerir más de cuatro pastillas en cada sesión. Debido a esto, la concentración de MDMA que puede encontrarse en sangre es muy variable. Además, los comprimidos suelen estar adulterados con otras

sustancias como cafeína o paracetamol e incluso con otras drogas como MDEA o metanfetamina [44], y la mayoría de los consumidores combinan MDMA con otras sustancias psicoactivas legales e ilegales como alcohol, tabaco, cannabis o cocaína lo que dificulta la interpretación de los resultados obtenidos en estudios de consumidores sobre los efectos inducidos por esta droga [50, 53].

Actualmente, en España, el éxtasis es considerado una sustancia ilegal, siguiendo el convenio de Viena que incluye a MDMA en la lista I de Psicotrópicos desde el 21 de febrero de 1971. El consumo de MDMA tanto en España como en el resto del mundo suele darse entre la población joven adulta y su uso se ha asociado históricamente a un ambiente nocturno, concretamente en discotecas y clubes. Es una de las sustancias psicoestimulantes más consumidas de Europa, siendo muy popular en las décadas de los 90-00', aunque en años posteriores se observó una tendencia a la baja tanto en Europa como a nivel mundial. Sin embargo, en la actualidad algunos trabajos indican que se está produciendo un repunte del consumo de MDMA, observado mediante la detección de la droga en las aguas residuales de las principales ciudades Europeas y en el número de incautaciones realizadas (figura 2). Este hecho parece estar relacionado con distintas causas, como el desarrollo de nuevas vías de síntesis que emplean precursores legales más sencillos de adquirir, la aparición de un mercado global en Internet que facilita la adquisición de estas sustancias y de la propia droga en su forma final, y un incremento de los niveles de pureza en los comprimidos de MDMA incautados [44, 51, 54].

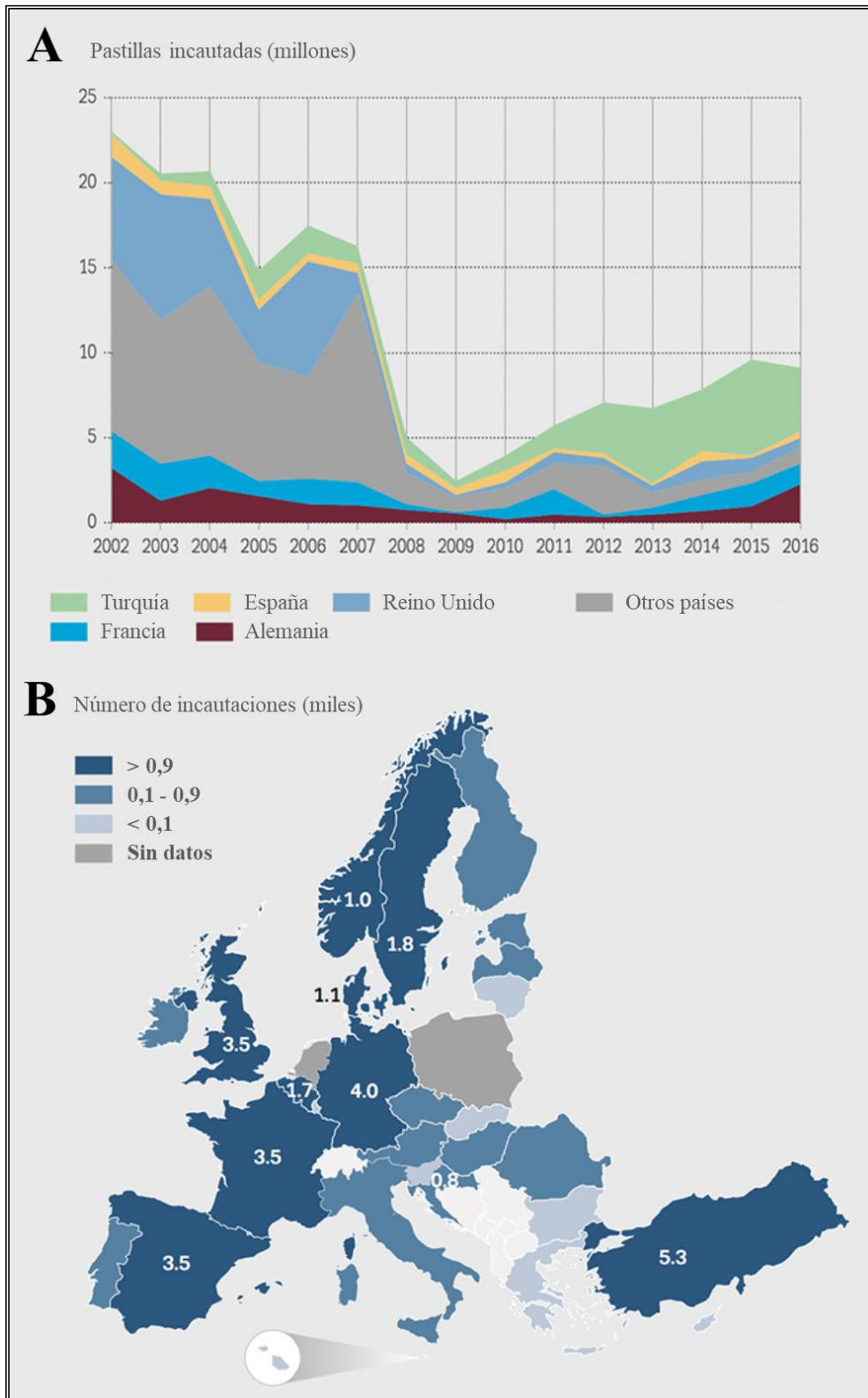


Figura 2: Incautaciones realizadas de MDMA en la Unión Europea. (A) La gráfica muestra la cantidad de pastillas incautadas entre los años 2002-2016 en distintos países de la Unión Europea. (B) Número de incautaciones realizadas en los distintos países de la Unión Europea en el año 2016. Datos procedentes del “European Drug Report 2018: Trends and Developments” [51].

Los consumidores de MDMA manifiestan algunos síntomas de dependencia clásicos como tolerancia o cierta dificultad para dejar de consumir la droga, de hecho, varios estudios en animales muestran una conducta de autoadministración lo que hace que sea catalogada como una potencial droga de abuso [28, 55-58]. No obstante, parece improbable que MDMA induzca una dependencia grave ya que menos del 1% de las personas que iniciaron un tratamiento por drogodependencia mencionaron el consumo de MDMA [51]. Esto se ha justificado por la disminución de los efectos positivos que produce y un aumento de la aparición de efectos desagradables según se incrementa la frecuencia de administración que frenaría su consumo a largo plazo [28, 50, 55].

1.4 Efectos de la administración de MDMA en humanos y primates no humanos

Los estudios clínicos de carácter prospectivo y retrospectivo han permitido conocer los efectos de MDMA en humanos, sin embargo, ambos tipos de estudios poseen limitaciones que se deben tener en consideración.

Los ensayos de carácter prospectivo realizados en humanos están sujetos a estrictas consideraciones éticas que establecen el uso de dosis más bajas respecto a las utilizadas por los consumidores. Incluso la dosis de MDMA de 125 mg, empleada en la actualidad en ensayos clínicos y en anteriores estudios, ha sido cuestionada por diferentes autores [59, 60]. No obstante, es considerada una dosis segura y por ello ha sido utilizada durante los ensayos clínicos de fase 2 y 3 para evaluar a MDMA como posible tratamiento coadyuvante en el síndrome de estrés postraumático [30, 61, 62].

Los estudios de tipo retrospectivo están caracterizados por la alta variabilidad de las

dosís consumidas por los sujetos que participan, la adulteración de la droga y el habitual policonsumo de otras sustancias, introduciendo múltiples variables que no están presentes en otros estudios [63, 64].

1.4.1 Efectos a corto plazo de la administración de MDMA en humanos y primates no humanos

El consumo de MDMA induce, inicialmente, un incremento de la liberación de serotonina. Este efecto ha sido determinado de forma indirecta en los consumidores mediante la detección en el líquido cefalorraquídeo de una disminución de la concentración de uno de sus principales metabolitos, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Paralelamente, la droga desencadena una respuesta hipertérmica que puede conducir a la muerte si esta se agrava [1, 65-67]. En primates no humanos, MDMA también induce una respuesta análoga respecto a la liberación de monoaminas y el incremento de la temperatura [67]. Existen, además, respuestas similares entre ambas especies tras la administración de MDMA como la disminución del apetito, los temblores, el bruxismo, la distonía, el aumento de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca, las cuales están relacionadas con el síndrome serotoninérgico; sin embargo, la manifestación de estas alteraciones no se correlaciona con las concentraciones plasmáticas de la droga [68].

1.4.2 Efectos a largo plazo de la administración de MDMA en humanos y primates no humanos

Varios trabajos han evidenciado el efecto neurotóxico a largo plazo producido sobre el sistema serotoninérgico en el cerebro humano tras el consumo de MDMA [69, 70]. Un estudio *post mortem* realizado sobre un consumidor crónico de MDMA reveló

que las concentraciones de 5-HT y de sus metabolitos estaban disminuidas entre un 50-80% en varias regiones cerebrales, mientras que los niveles de dopamina no se encontraban alterados [71]. Además, las técnicas de PET (tomografía por emisión de positrones) y SPECT (tomografía computerizada de emisión monofotónica) han permitido realizar estudios *in vivo* en humanos empleando como marcador de daño cerebral la cuantificación de la densidad de los transportadores de serotonina (SERT), reflejando la neurotoxicidad serotoninérgica derivada del consumo de MDMA en regiones corticales [70, 72, 73]. Estos estudios han observado una disminución de los SERT que es dependiente de la dosis y puede mantenerse durante periodos de abstinencia, sin embargo, se determinó una recuperación parcial de estos transportadores a largo plazo [73-75]. Igualmente, se ha observado que el consumo de MDMA deriva en un incremento compensatorio de la densidad de receptores 5-HT_{2A} postsinápticos en varias áreas corticales debido a la disminución de la señal serotoninérgica inducida por la droga [75, 76]. La disminución del efecto inhibitorio de la señalización serotoninérgica cortical derivada de la neurotoxicidad conduce a un aumento de la excitabilidad neuronal, confirmado mediante estudios de resonancia magnética funcional en consumidores [74, 75]. El efecto de MDMA sobre el sistema serotoninérgico parece ser mayor en mujeres que en hombres, tanto a corto como a largo plazo [41, 74], siendo estas más susceptibles a la neurotoxicidad de la droga. Estas alteraciones observadas a largo plazo sobre el sistema serotoninérgico inducidas por MDMA pueden suponer cambios funcionales que contribuyan a la aparición de patologías psiquiátricas y a cambios en el comportamiento del individuo [41, 74].

En primates no humanos, la administración de una dosis de MDMA induce igualmente efectos neurotóxicos a concentraciones plasmáticas equivalentes a las

encontradas en consumidores [70, 77, 78]. Además, 2 semanas después de la administración de MDMA se observa una marcada reducción de axones serotoninérgicos en el neocórtex y en el hipocampo que puede llegar a mantenerse incluso 7 años después [79]. Tras 18 meses desde la administración de MDMA se observa, además, una reorganización de las proyecciones neuronales con patrones de inervación alterados [79, 80].

1.4.3 Efectos comportamentales y fisiológicos en consumidores de MDMA

Los efectos de la droga aparecen a partir de los primeros 20 minutos desde su toma y se mantienen de 3 a 6 horas. Inicialmente, el consumo de MDMA induce sensaciones de euforia, percepción sensorial agudizada y alteraciones perceptivas visuales, temporales y táctiles [50]. Además, debido a que es una droga entactógena, algunos de los efectos asociados a su consumo son sensación de bienestar, y mayor sociabilidad y cercanía emocional lo que fomenta una mayor comunicación y facilita el acceso al interior de la conciencia del individuo [41, 47, 50, 81]. Estos efectos emocionales y sociales producidos por la droga podrían estar causados directa o indirectamente por la liberación de 5-HT, prolactina y oxitocina [28, 81]. Como droga psicoestimulante, el consumo de MDMA también es capaz de incrementar el estado de vigilia, la resistencia física y la excitación sexual, reduciendo la sensación de fatiga y somnolencia, efectos que han sido asociados al incremento de la liberación de dopamina que produce la droga [41, 47, 50, 81]. Además de estos efectos, MDMA también puede producir alucinaciones visuales, paranoia, ansiedad y crisis de angustia en consumidores habituales [28, 81].

Los efectos fisiológicos que puede producir la droga de forma aguda son trismo, bruxismo, náuseas, falta de apetito, dolor de cabeza, midriasis, visión borrosa,

sequedad de boca e incremento de la frecuencia cardíaca y de la presión sanguínea, manteniéndose, algunos de ellos, días después del consumo de la droga. Estos cambios parecen estar asociados a la liberación de noradrenalina y al incremento agudo de las concentraciones plasmáticas de las hormonas adrenocorticotropa, cortisol, hormona del crecimiento y vasopresina [41, 66, 74, 81].

A largo plazo, el individuo puede presentar trastornos del sueño y síntomas de depresión como consecuencia del agotamiento de 5-HT y de la disminución de las señales serotoninérgicas [28]. También, la neurotoxicidad inducida por MDMA se ha relacionado con la pérdida de funciones cognitivas como la memoria y el aprendizaje, y la disminución de la concentración y del procesamiento lógico, efectos evidenciados tras la realización de estudios retrospectivos en consumidores de la droga [41, 82]. Además, el consumo abusivo de MDMA mantenido en el tiempo podría aumentar el riesgo de desarrollar trastornos psicóticos [74, 82, 83].

1.4.4 Toxicidad de MDMA en humanos

MDMA puede dar lugar a efectos dañinos debido a su toxicidad que pueden terminar en muerte para el consumidor [50], de hecho esta droga es una de las 6 sustancias que más presentan los consumidores en urgencias cuando acuden por una toxicidad aguda [51]. En estos casos, los niveles plasmáticos de MDMA pueden llegar a ser 40 veces superiores a los detectados en consumidores habituales, sin embargo, se han observado casos a dosis más bajas debido a que los efectos de la droga también dependen de factores ambientales [28, 47]. Uno de los efectos más importantes que se producen en casos de toxicidad en las primeras horas tras el consumo es la respuesta hipertérmica. La hipertermia se produce por la acción de MDMA sobre el hipotálamo, además de por el aumento del metabolismo cerebral y de la

vasoconstricción de la piel. Cuando la temperatura supera los 42°C se desencadena la hipertermia fulminante que conlleva un fallo multiorgánico que termina en muerte [28, 65, 66]. El tratamiento para la hipertermia consiste en enfriar el cuerpo, hacer un lavado de estómago, administrar suero salino y, en determinados casos, también puede administrarse fármacos α y β -bloqueantes y relajantes musculares [28, 66]. A nivel cerebral, pueden presentar convulsiones y ataques epilépticos que es el problema neurológico más frecuentemente asociado.

Además, pueden presentar hipertensión, rotura de vasos sanguíneos y taquicardia, pudiendo llegar a producir fallo cardíaco y edema pulmonar debido al efecto de la MDMA sobre la liberación de la noradrenalina [28, 84]. Otros de los efectos tóxicos más importantes que pueden presentar los consumidores son la ictericia, el fallo hepático y la necrosis, que ocurren como consecuencia de la metabolización hepática de la droga debido a la formación de metabolitos reactivos y a la generación de estrés oxidativo [41, 50].

1.5 Efectos de la administración de MDMA en rata

La administración de MDMA en rata induce una respuesta hipertérmica y una disfunción preferente del sistema serotoninérgico, equivalentes a las descritas previamente en primates, sin embargo, los modelos de rata requieren mayores dosis para inducir un efecto neurotóxico [1, 41, 46, 67]. Además, en función de la cepa de rata empleada, existen diferencias en la frecuencia de administración y las dosis de MDMA necesarias para inducir un daño serotoninérgico debido a la distinta capacidad de metabolización de la droga. En concreto, la cepa Dark Agouti presenta una particular deficiencia en determinadas isoformas del CYP450 pertenecientes a la subfamilia CYP2D [4, 85, 86] que provoca una mayor sensibilidad a los efectos

neurotóxicos inducidos por MDMA, a diferencia de lo que ocurre con otras cepas más corrientes con mayor resistencia al daño causado por la droga [2, 5].

Otro de los roedores más utilizados en el estudio de esta droga es el ratón, sin embargo, los efectos sobre el sistema serotoninérgico producidos en ratón no son tan marcados como en la rata, siendo necesarias dosis muy elevadas y repetidas para inducir los mismos efectos a corto plazo sobre el contenido de 5-HT y de sus metabolitos; de hecho, el efecto más importante relacionado con la administración de MDMA en este modelo murino involucra al sistema dopaminérgico [1, 87]. Además, algunos estudios de nuestro grupo de investigación han observado que la disminución del contenido de 5-HT en el hipocampo y la corteza de ratones tras la administración de la droga no es dosis-dependiente, a diferencia del efecto observado en la rata [88, 89].

1.5.1 Efectos a corto plazo de la administración de MDMA en rata

➤ Efectos sobre el sistema serotoninérgico

La administración de MDMA produce un incremento inmediato de la liberación de 5-HT en hipocampo, corteza e hipotálamo [1, 41, 90, 91]. Este efecto es debido a la interacción de MDMA y de sus metabolitos con los SERT que induce una reversión del sentido del transporte de 5-HT, favoreciendo su liberación al espacio sináptico e impidiendo su recaptación [1, 41]. Además, MDMA puede introducirse en los terminales nerviosos a través de los SERT e interaccionar, igualmente, con el transportador vesicular de monoaminas (VMAT), alterando la entrada de 5-HT en las vesículas sinápticas y potenciando aún más la salida de este neurotransmisor [92]. Otro de los efectos desencadenados por la droga es el bloqueo del catabolismo de las

monoaminas mediante la inhibición parcial de la enzima monoamino oxidasa (MAO), lo que promueve el incremento citoplasmático de la 5-HT disponible para su liberación [93, 94].

Tras la liberación inicial de 5-HT, se produce una disminución del contenido del neurotransmisor en las neuronas serotoninérgicas mediante la inhibición inmediata e irreversible de la actividad de la triptófano hidroxilasa (TPH), enzima limitante en la síntesis de 5-HT a partir de triptófano (TRP) [41, 95]. Otros neurotransmisores como dopamina y noradrenalina también son liberados de forma aguda tras la administración de MDMA, participando en los efectos fisiológicos que produce esta droga a corto plazo [1, 41, 90, 96].

➤ **Neuroinflamación y estrés oxidativo**

La administración de MDMA desencadena una respuesta neuroinflamatoria como consecuencia de los efectos que induce sobre los terminales serotoninérgicos. Esta respuesta ha sido manifestada por un aumento de la activación microglial y de los niveles de la citoquina proinflamatoria IL-1 β en hipocampo, corteza frontal e hipotálamo [83, 97-99]. Además, algunas publicaciones han observado la aparición de astrogliosis tras la administración de una dosis neurotóxica de MDMA [41, 100, 101].

MDMA induce la generación inmediata de radicales libres, reflejada por un aumento de la concentración de ácido 2,3-dihidroxibenzoico en el dializado de corteza, hipocampo y estriado [7, 102, 103], además de por un incremento de las especies nitrosativas [104, 105] y del índice de peroxidación lipídica en estas mismas áreas cerebrales [106, 107]. Esta producción de radicales libres se da mayormente como resultado de la metabolización de la droga y de las monoaminas liberadas [41].

Además, el estrés oxidativo generado está relacionado con la respuesta hipertérmica inducida por la droga dado que la disminución de la hipertermia es capaz de prevenir la formación de radicales libres [108].

MDMA también induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), junto con la disminución de las defensas antioxidantes, en otros tipos celulares, concretamente en cardiomiocitos y hepatocitos, participando en la toxicidad cardiovascular y hepática observada tras la administración de la droga [109-111].

➤ **Hipertermia**

Como se ha comentado previamente, MDMA induce una respuesta hipertérmica en las primeras horas tras el tratamiento con la droga [65]. Este efecto está mediado por diferentes mecanismos que involucran a los sistemas de serotonina, dopamina y más directamente noradrenalina [41, 67]. De hecho, la vasoconstricción periférica producida por la activación de receptores α y β adrenérgicos centrales y periféricos tras la administración de MDMA altera la correcta termorregulación de la rata, limitando la disipación de calor mediante el bloqueo de la capacidad de vasodilatación de los vasos de la cola, su principal mecanismo regulador de la temperatura corporal [65, 67].

Las condiciones ambientales también pueden influir de forma pronunciada en el efecto hipertérmico inducido por MDMA. Así, una temperatura ambiental de entre 4-15°C es capaz de prevenir la hipertermia [65, 97, 112, 113], mientras que una temperatura elevada superior a 28°C la potencia, llegando a comprometer la supervivencia del animal [41, 112, 113]. La toxicidad por agregación es otro de los factores externos que pueden potenciar la hipertermia producida tras el tratamiento

con MDMA, induciéndose una mayor neurotoxicidad cuando varios animales son dispuestos en una misma jaula [65].

➤ **Otros efectos fisiológicos y comportamentales**

La administración de MDMA en rata tiene efectos sobre el sistema cardiovascular produciendo taquicardias, arritmias, un incremento en la presión arterial y vasoconstricción [1, 41, 114], y sobre el sistema endocrino incrementando la secreción de corticosterona y prolactina entre otras [1]. El síndrome serotoninérgico generado tras la administración de MDMA es responsable del incremento de la salivación, defecación, piloerección, proptosis, erección penénea y eyaculación [1].

Por otro lado, a nivel comportamental, se ha observado que la administración de MDMA en ratas induce un incremento de su actividad locomotora y una respuesta ansiogénica a corto plazo [41, 115]. En cambio, varias semanas después, el efecto que muestran es ansiolítico [116], además de un comportamiento depresivo, déficits en el aprendizaje, alteración de la memoria espacial y del reconocimiento no espacial y disminución de las interacciones sociales [41, 117, 118].

1.5.2 Efectos a largo plazo de la administración de MDMA en rata

La neurotoxicidad inducida a largo plazo tras la administración de MDMA se produce específicamente en el sistema serotoninérgico y se manifiesta como una disminución de la densidad de los SERT [2, 4, 5, 119, 120] y una reducción del contenido de 5-HT y de 5-HIAA [2, 5], esta última como consecuencia de la disminución mantenida del contenido de VMAT [121] y de la inhibición irreversible de la enzima TPH [41, 95]. En concreto, la disminución de la concentración de 5-HT, y del marcaje de la TPH y de los SERT se ha observado principalmente en el

hipocampo, la corteza y, en menor proporción, en el estriado, debido al elevado número de terminaciones nerviosas serotoninérgicas que poseen estas regiones cerebrales [122-125]. Paralelamente, se produce un aumento de la expresión de receptores 5-HT_{2A} en la corteza como mecanismo de adaptación a la menor transmisión serotoninérgica [41]. Estos efectos pueden observarse incluso meses después de la administración de MDMA dependiendo de la dosis administrada y de la región analizada [1, 41]. Además, empleando la técnica de FluoroJade (un fluorocromo que proporciona un marcaje específico de muerte neuronal), se han observado signos de degeneración neuronal en la corteza parietal y perirrinal y en el tálamo tras el tratamiento con dosis elevadas de MDMA o con dosis neurotóxicas más bajas pero con un efecto hipertérmico muy elevado [126]. De hecho, se ha descrito un incremento de las proteínas Bax (proteína X asociada a Bcl-2) y Bcl-2 (proteína 2 de la leucemia/linfoma de células B), ambas implicadas en mecanismos apoptóticos, en el hipocampo de rata 7 días después de la administración de la droga [127]. La neurotoxicidad serotoninérgica inducida por MDMA parece ser consecuencia de la acción de metabolitos activos de la droga generados periféricamente y no de la propia molécula, ya que su infusión directa a nivel central no es capaz de producir un daño serotoninérgico a largo plazo, aunque sí de inducir la liberación inmediata de 5-HT [128]. En la figura 3 se muestra un esquema representativo de los efectos inducidos por MDMA a corto y largo plazo sobre el sistema serotoninérgico.

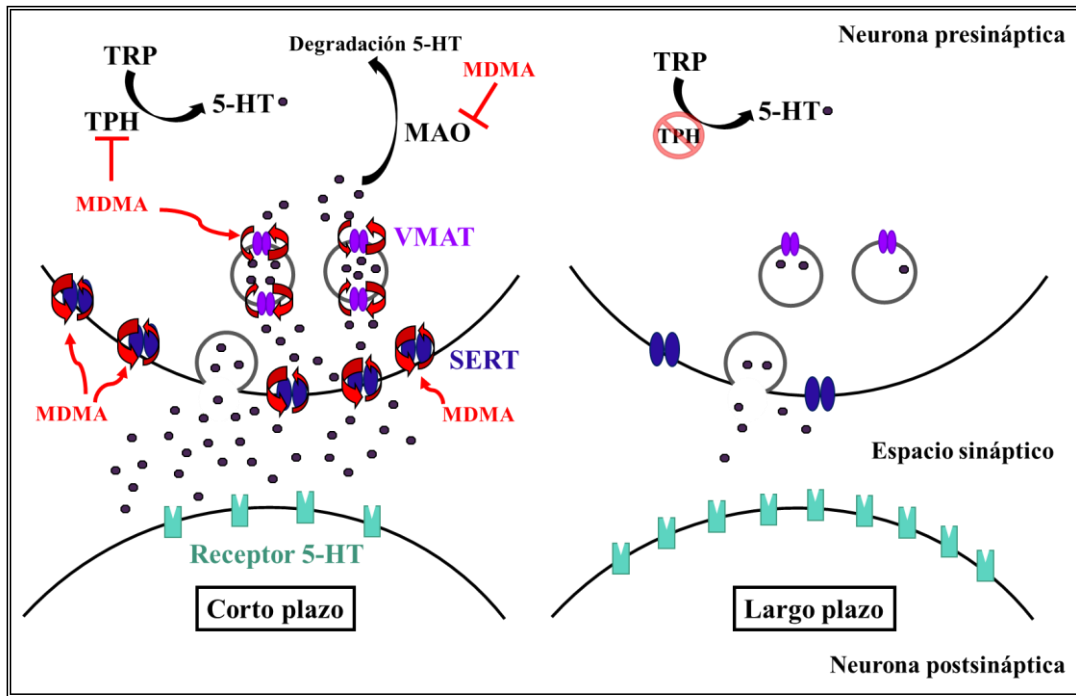


Figura 3: Efecto de MDMA sobre el sistema serotoninérgico a corto y largo plazo. A corto plazo, MDMA interacciona con los transportadores de serotonina (SERT) revirtiendo el sentido del transporte de serotonina (5-HT) y con el transportador vesicular de monoaminas (VMAT), alterando la entrada de 5-HT en las vesículas sinápticas; todo ello potencia la salida de este neurotransmisor al espacio sináptico. Además, MDMA bloquea el catabolismo de 5-HT mediante la inhibición de la monoamino oxidasa (MAO), lo que promueve el incremento de 5-HT disponible para su liberación. A largo plazo, MDMA disminuye la densidad de los SERT y la concentración de 5-HT esta última como consecuencia de la disminución del contenido de VMAT y de la inhibición irreversible de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) encargada de la síntesis de 5-HT a partir del triptófano (TRP). Paralelamente se produce un incremento de los receptores de 5-HT postsinápticos.

La regeneración del sistema serotoninérgico tras el daño producido por MDMA depende del área cerebral. La recuperación de la densidad de los SERT se produce a las 32 semanas en la corteza y el estriado, mientras que en el hipocampo permanece disminuida hasta 52 semanas después. No obstante, un año después de la administración de MDMA, todas las regiones cerebrales estudiadas mostraron una recuperación de los niveles de 5-HT [41]. Además, se ha observado que la reinervación neuronal en el estriado es más rápida que en la corteza y el hipocampo

[95, 129]. Sin embargo esta regeneración muestra un patrón anormal, observándose una hiperinervación en la amígdala e hipotálamo, y una denervación en zonas más distales, como la corteza [130].

Existen varios mecanismos involucrados en el daño serotoninérgico inducido por MDMA a largo plazo. Se ha observado una estrecha relación entre el estrés oxidativo inducido a corto plazo y el efecto neurotóxico que produce MDMA. La administración del agente atrapador de radicales libres α -fenil-N-terbutilnitrona (PBN) [6] y de otros compuestos antioxidantes como L-cisteína [7, 8] induce una disminución del estrés oxidativo que es capaz de atenuar el daño serotoninérgico asociado a la droga. El incremento de la temperatura es otro de los factores asociados al daño serotoninérgico, dado que la disminución de la respuesta hipertérmica es capaz de reducir la neurotoxicidad inducida por la droga [65, 95]. En concreto, se ha observado que varios compuestos neuroprotectores ejercen su efecto sobre el daño serotoninérgico mediante la prevención del efecto hipertérmico [108, 131]. Sin embargo, los animales de experimentación tratados con MDMA pueden presentar neurotoxicidad en ausencia de hipertermia [41, 65]. A parte del estrés oxidativo y la hipertermia, se ha observado que la neuroinflamación producida a corto plazo puede formar parte del mecanismo neurotóxico inducido por MDMA, ya que la inhibición de la activación microglial disminuye el daño serotoninérgico en la corteza frontal, aunque no se observó el mismo efecto en el hipotálamo [132, 133]. Por último, el tratamiento con fluoxetina, inhibidor de la recaptación de los SERT, protege frente a la neurotoxicidad inducida por MDMA de forma independiente al efecto hipertérmico producido por la droga, evidenciando el papel de estos transportadores en el daño serotoninérgico [134].

2. La vía de kinurenina

La vía de kinurenina ha cobrado una mayor relevancia en los últimos años debido a que algunos trabajos la han relacionado con diferentes trastornos del sistema nervioso central (SNC) y otras patologías, lo que ha permitido, en determinados casos, el descubrimiento de nuevas dianas farmacológicas [135, 136]. Su estudio comenzó a mediados del siglo XX con el fin de entender la contribución de la vía en la síntesis del cofactor nicotin adenin dinucleótido (NAD^+) [137, 138], una coenzima involucrada en multitud de mecanismos celulares [139, 140]. Pero además, esta vía metabólica es responsable de la producción de numerosos metabolitos biológicamente activos que derivan del TRP, un aminoácido esencial que actúa como precursor en esta ruta metabólica y en otras como la síntesis de 5-HT [9, 141].

La vía de kinurenina es la principal ruta de degradación del TRP, siendo responsable de la metabolización de aproximadamente un 95% del aminoácido disponible. En primer lugar, el TRP es metabolizado mediante la acción de las enzimas triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) o indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) formando N'-formilkinurenina (N-formilKYN), la cual se hidroliza a kinurenina (KYN) mediante la N'-formilkinurenina formamidasa. Seguidamente, la KYN puede metabolizarse a través de dos rutas enzimáticas. La enzima kinurenina monooxigenasa (KMO) media en su hidroxilación a 3-hidroxikinurenina (3-OHKYN) a partir de la cual, y mediante sucesivas transformaciones, dará lugar al ácido quinolínico (QUINA), precursor a su vez de la síntesis del cofactor NAD^+ . Otra de las enzimas capaces de metabolizar KYN es la kinurenina aminotransferasa (KAT) encargada de la transaminación de este metabolito en ácido kinurénico (KYNA) (figura 4) [12].

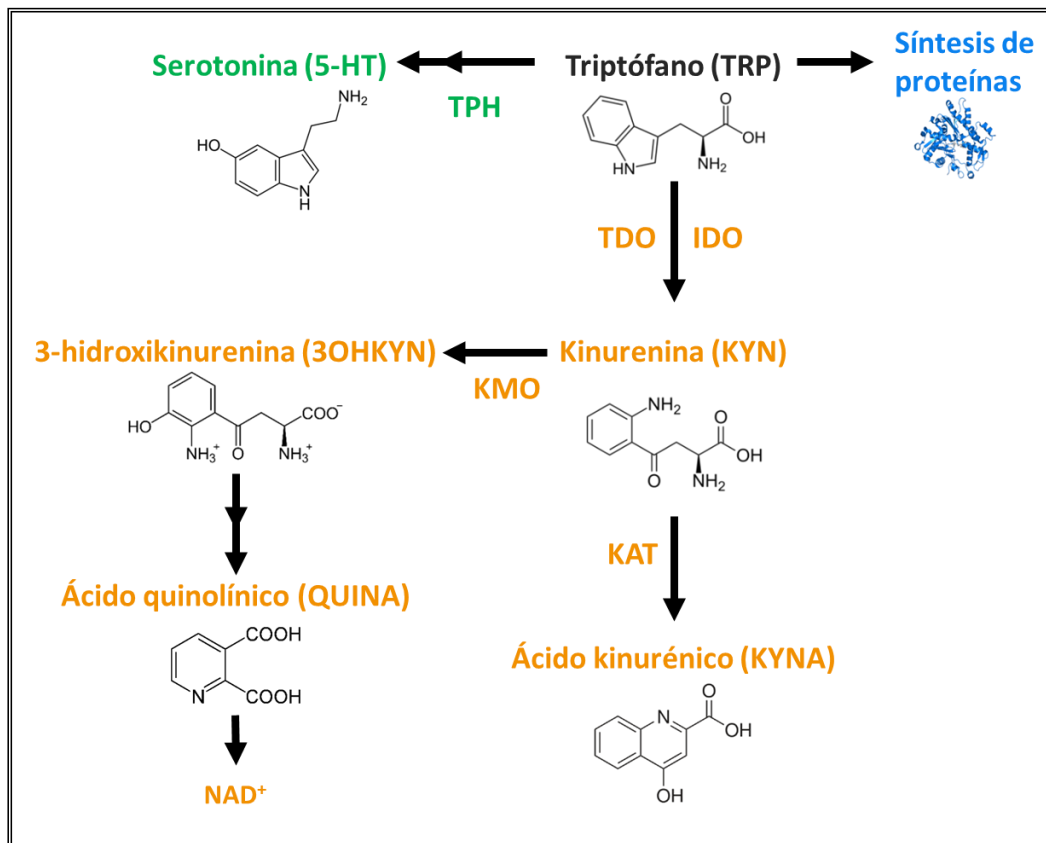


Figura 4: Vía de kinurenila y principales vías metabólicas del triptófano. La principal ruta de degradación del triptófano (TRP) es la vía de kinurenila. Las enzimas triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) o indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) dan lugar a kinurenila (KYN) a partir de este aminoácido. KYN se metaboliza por la enzima kinurenila monooxigenasa (KMO) formando 3-hidroxikinurenila (3-OHKYN) a partir de la cual, se sintetiza el ácido quinolínico (QUINA). La kinurenila aminotransferasa (KAT) se encarga de la transaminación de KYN en ácido kinurénico (KYNA). Otras vías metabólicas en las que participa este aminoácido en menor proporción son la síntesis de serotonina (5-HT) mediante la triptófano hidroxilasa (TPH) y el anabolismo de proteínas.

2.1 Distribución de las enzimas de la vía de kinurenila

El hígado constituye el principal órgano regulador de las concentraciones de TRP, en concreto, es capaz de metabolizar entre un 90-95% de las cantidades disponibles del aminoácido a través de la vía de kinurenila. Debido a esto, el hígado presenta todas las enzimas que participan en esta ruta metabólica [9, 12]. En condiciones fisiológicas, el 5-10% del TRP restante es degradado a nivel extrahepático a través

de esta vía [9, 12], sin embargo, este porcentaje puede verse incrementado en determinados estados patológicos [11, 142, 143]. El cerebro es uno de los órganos extrahepáticos más estudiados en relación a la vía de kinurenina debido a la relevancia que posee la regulación de algunos de sus metabolitos en trastornos neurológicos y neurodegenerativos [11, 144]. Distintas regiones cerebrales como el hipocampo y la corteza de humanos y roedores expresan las principales enzimas de la vía de kinurenina [145-149], sin embargo, no todos los tipos celulares localizados a nivel central las presentan en igual proporción. Se ha descrito que la enzima KMO, encargada de la síntesis de QUINA, está presente mayoritariamente en microglía mientras que los astrocitos presentan mayor actividad de KAT, la enzima responsable de la producción de KYNA [11, 146]. En la tabla 1 se recoge la localización de las principales enzimas de la vía de kinurenina estudiadas en este trabajo, así como, los sustratos y productos propios de cada una.

Enzima	Sustrato	Producto	Tejido
TDO	L-TRP, O ₂	N-formilKYN	Hígado y SNC
IDO	L/D-TRP, O ₂ y otros	N-formilKYN	Placenta, pulmón, intestino, SNC y otros
KMO	KYN, O ₂	3-OHKYN	Hígado, riñón, placenta, SNC
KAT	KYN	KYNA	Hígado, riñón, corazón, SNC

Tabla 1: Características de las principales enzimas de la vía kinurenina. En la tabla se muestra los sustratos necesarios para realizar su actividad enzimática, el producto formado y la principal localización para cada una de las enzimas. *3-Hidroxikinurenina (3-OHKYN)*, *ácido kinurénico (KYNA)*, *indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO)*, *kinurenina (KYN)*, *kinurenina aminotransferasa (KAT)*, *kinurenina monooxigenasa (KMO)*, *N-formilkinurenina (N-formilKYN)*, *sistema nervioso central (SNC)*, *triptófano (TRP)*, *triptófano-2.3-dioxigenasa (TDO)*.

2.2 Regulación de la expresión y la actividad de las enzimas de la vía de kinurenina

2.2.1 TDO

TDO es una enzima tetrámera con una estructura hemo-dependiente encargada de producir la oxidación de TRP en N-formil-KYN, metabolito intermedio en la formación de KYN [150]. Esta enzima puede ser regulada por diferentes mecanismos que implican tanto la modulación de su actividad como de su expresión. La regulación de TDO mediada por la concentración de su sustrato constituye uno de los principales mecanismos de modulación de esta enzima, siendo clave para el correcto mantenimiento de los niveles de TRP en un rango homeostático [9]. Así, un aumento de TRP induce un incremento tanto de la actividad enzimática de TDO como de su vida media. Además, esta actividad puede verse potenciada por la presencia de su cofactor hemo, capaz de duplicar la velocidad enzimática de TDO. Sin embargo, este efecto sólo es posible si, además del cofactor, existe en el medio la presencia de su sustrato. El TRP es el responsable de estabilizar el cambio de conformación de la enzima inducido por el cofactor desde su estado de apoenzima a holoenzima, aumentando así su actividad [151]. Un incremento de las concentraciones plasmáticas de glucocorticoides también puede inducir un aumento de la actividad de la enzima [152, 153], sin embargo, se ha observado que este efecto es derivado de la regulación transcripcional que ejercen estas hormonas sobre TDO [154, 155]. Por otro lado, la inhibición de esta enzima a través de mecanismos de retroalimentación no depende de KYN o N-formilKYN, sus productos más inmediatos, sino de las concentraciones de NAD(P)H [156, 157].

2.2.2 IDO

IDO es una proteína monomérica cuya estructura es hemo-dependiente. Al igual que TDO, esta enzima media en la oxidación del TRP en KYN [158], sin embargo, la actividad de IDO es menos específica ya que es capaz de abrir el anillo indol de todas las indolaminas como 5-HT, triptamina, melatonina o L-TRP [159], siendo esta última la única que puede ser degradada por TDO [150]. Por otro lado, la enzima IDO es menos susceptible de ser activada por sustrato [160], pudiendo incluso ser inhibida por altas concentraciones de TRP [161]. Además, la actividad de IDO requiere de la presencia del radical anión superóxido como sustrato [162], pero no actúa como una enzima antioxidante ya que, a su vez, su propia actividad enzimática libera este mismo radical [150, 159]. Existen dos isoformas de esta proteína, pero la isoforma IDO-2, descubierta recientemente, tiene menor afinidad por el TRP respecto a IDO-1 [163, 164]. Además, los modelos *knock-out* de IDO-2 no presentan diferencias en los niveles plasmáticos de KYN respecto a los ratones control lo que sugiere que su papel en el metabolismo del TRP es mínimo [165]. Aunque TDO es la enzima principal encargada de la degradación del TRP, IDO-1 puede adquirir un papel relevante en la producción de KYN en presencia de estímulos inflamatorios. Se ha descrito que diferentes citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , IL-1 β y TNF- α inducen un incremento de la expresión de IDO-1 [166-169], a diferencia de otras citoquinas antiinflamatorias, las cuales son capaces de bloquear su actividad [167].

2.2.3 KMO

KMO cataliza la formación de 3-OHKYN a partir de KYN utilizando como cofactor la molécula de NADPH [170]. Esta reacción es limitante para la formación de QUINA, metabolito precursor en la síntesis de NAD⁺ [139, 140, 171]. A nivel

fisiológico, KMO presenta una gran afinidad por KYN, respecto a otras enzimas capaces de mediar en la degradación de este metabolito, lo que la convierte en la principal reguladora de las concentraciones de KYN [157, 172]. De manera similar a laIDO, la expresión de KMO también puede ser inducida por estímulos proinflamatorios, como la administración de lipopolisacárido (LPS) [173, 174] y la presencia de IL-1 β [175]. Por otro lado, la deficiencia de riboflavina (vitamina B₂) disminuye la actividad de KMO debido a que esta enzima forma parte del grupo de flavoproteínas y es dependiente de la coenzima flavín adenín dinucleótido (FAD) [176].

2.2.4 KAT

KAT es otra de las enzimas capaces de regular la metabolización de KYN, dando lugar a su transaminación irreversible para formar KYNA. En condiciones fisiológicas, la capacidad metabólica de esta enzima es minoritaria, sin embargo, en presencia de altas concentraciones de KYN o en determinados contextos que supongan la inhibición de KMO, la cantidad de KYNA sintetizada puede verse aumentada [177]. Existen 4 isoformas de esta enzima (KAT I, II, III, IV) siendo KAT II, la isoforma mayoritaria en el cerebro [178, 179]. Sin embargo, se ha observado que otras isoformas de KAT pueden compensar los niveles de KYNA en ausencia de KAT II [180]. La actividad enzimática de esta enzima está sujeta no solo a su regulación por el sustrato sino también a la deficiencia de piridoxina (vitamina B₆) que produce una disminución de su actividad [181]. A nivel transcripcional, se ha observado un incremento de la expresión de KAT II tras la exposición a estímulos inflamatorios como la administración de LPS o la presencia de IFN- γ [146, 182, 183].

2.3 Funciones del precursor y de los principales metabolitos de la vía de kinurenina

2.3.1 Triptófano

El TRP es un aminoácido esencial que participa como precursor en diferentes rutas metabólicas como el anabolismo de proteínas, la síntesis de 5-HT y la formación de diferentes derivados indólicos, sin embargo, la mayor parte del TRP disponible es utilizado por la vía de kinurenina [9, 135]. Las concentraciones disponibles de TRP constituyen un factor limitante en la actividad de las distintas rutas metabólicas en las que participa. Por ello, debido a que la vía de kinurenina regula de forma mayoritaria las concentraciones de este aminoácido, un incremento de la actividad de esta ruta metabólica puede disminuir la disponibilidad del TRP, limitando así la síntesis de 5-HT [9, 141, 184].

El TRP está presente en alimentos como el huevo, la leche, el chocolate, diferentes frutos secos o carnes, entre otros. Una vez asimilado a través de la dieta, este aminoácido puede distribuirse por el torrente sanguíneo unido principalmente a la albúmina (90%), sin embargo, un pequeño porcentaje puede estar en forma libre lo que permite su captación por distintos tipos celulares con el fin de incorporarlo tanto a la vía de kinurenina como al resto de las rutas metabólicas en las que participa [185-187]. El hígado es el órgano encargado del almacenamiento de los depósitos de TRP y de la regulación de sus niveles a través de la vía de kinurenina ya que es el principal tejido que expresa la enzima TDO [9, 188]. Existen determinados mecanismos capaces de incrementar las concentraciones de TRP disponibles permitiendo así su captación por los distintos tejidos. El incremento de la concentración de los ácidos grasos libres en sangre es capaz de desplazar al TRP

unido a la albúmina, aumentando la disponibilidad del aminoácido y facilitando así su captación por tejidos como el hígado o el cerebro [185-187]. El aumento de los niveles de TRP disponibles mediado por el incremento de los ácidos grasos libres en sangre puede ser inducido por una activación del sistema nervioso simpático. No obstante, varios estudios han demostrado que la estimulación simpática también podría actuar induciendo un incremento de la expresión del transportador de aminoácidos neutro (LAT), el cual media en la captación del TRP a los distintos tejidos, incluido el paso del aminoácido a través de la barrera hematoencefálica (BHE), aumentando así la concentración del aminoácido en el SNC [189-191].

2.3.2 Kinurenina

La KYN es el metabolito mayoritario de la vía de kinurenina y precursor del resto de metabolitos que componen la vía. Es sintetizada a partir del TRP por las enzimas TDO e IDO [12], por lo que un aumento de la disponibilidad del TRP incrementa la concentración de KYN formada [157]. No obstante, el equilibrio de las concentraciones de KYN entre los distintos tejidos y la sangre constituye un factor clave en la regulación de este metabolito y, como consecuencia, de sus distintas funciones. Uno de los transportadores que participan en esta regulación es el transportador de ácidos orgánicos (OAT) [192-194]. Aunque, inicialmente, los OAT fueron descritos como mediadores de la excreción de la KYN por vía renal [9, 195-197], los OAT también participan en el transporte de este metabolito entre la sangre y muchos otros tejidos como el hígado y el cerebro. En particular, los subtipos OAT1 y OAT3 median en el intercambio de KYN y de sus productos KYNA y QUINA a través de la BHE [193, 194, 198], participando en el mantenimiento de las concentraciones cerebrales de estas moléculas en un rango

homeostático [192]. De hecho, se ha observado que el tratamiento con probenecid, un inhibidor de estos transportadores OAT, tiene como consecuencia un incremento de la concentración de estos metabolitos en el SNC [198, 199]. Otro de los transportadores que participan en la regulación de las concentraciones de KYN es el LAT. Tanto la KYN como el TRP son capaces de atravesar la BHE hacia el interior del SNC mediante estos transportadores [200], siendo LAT-1 el subtipo mayoritario presente en la BHE [201, 202]. Debido a que los LAT son capaces de transportar otros aminoácidos, éstos pueden competir con TRP y KYN, lo que podría dar lugar a una menor captación de ambos [203]. Por todo ello, y dado que un 60% de la concentración de KYN presente en el SNC proviene de la periferia [204], la intercomunicación entre ambos compartimentos es clave en el mantenimiento de las concentraciones de los metabolitos de la vía de kinurenina a nivel central (figura 5) [203].

La función de KYN ha sido asociada comúnmente a su papel como precursor del resto de metabolitos de la vía de kinurenina, por ello la determinación de sus concentraciones se ha empleado para detectar el estado de activación de la vía [10, 135]. Sin embargo, la KYN también es capaz de actuar como secuestrante de radicales libres [205] y como agonista endógeno del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) [14, 15], el cual está implicado en la síntesis de diferentes moléculas relacionadas con el metabolismo de sustancias, la proliferación y diferenciación celular, la modulación del sistema inmune y la respuesta antioxidante [16-18, 206].

2.3.3 Otros metabolitos neuroactivos

Dos de los metabolitos derivados de la vía de kinurenina más estudiados en el SNC son QUINA y KYNA, cuyas concentraciones son reguladas por dos enzimas

diferentes que median en su formación, KMO y KAT respectivamente [207]. Ambos metabolitos atraviesan la BHE con dificultad, por lo que su síntesis tiene principalmente un origen local [200]. No obstante, las concentraciones de QUINA y KYNA a nivel central pueden ser potenciadas mediante un incremento de la concentración de su precursor KYN, aunque proceda de la periferia, ya que KYN si es capaz de atravesar la BHE [157, 199, 204].

QUINA es uno de los principales productos derivados de la ruta mayoritaria de metabolización de la KYN en condiciones fisiológicas y precursor de la síntesis de NAD^+ [172, 208, 209]. Se ha descrito que QUINA puede actuar como agonista de los receptores N-metil-d-aspartato (NMDA), aumentando la excitabilidad neuronal y elevando las concentraciones de calcio intracelular dando lugar a un daño neuronal [207]. Además, QUINA está implicado en la generación de estrés oxidativo y en el aumento de la producción de óxido nítrico, entre otros [10, 210]. A diferencia de QUINA, KYNA actúa como un antagonista endógeno de los receptores NMDA [207], además de modular la señal glutamatérgica mediante su función como modulador alostérico negativo del receptor nicotínico α -7 [211], lo que le confiere un papel protector en la excitotoxicidad neuronal [212, 213]. También se ha demostrado que KYNA posee propiedades antioxidantes actuando como un secuestrante de radicales libres [214]. Por todo ello, este metabolito ha sido comúnmente asociado a mecanismos neuroprotectores [144, 215]. Sin embargo, se ha observado una concentración elevada de KYNA en el líquido cefalorraquídeo y en los cerebros extraídos *post mortem* de pacientes adultos con esquizofrenia [216, 217], lo que ha permitido relacionar el desequilibrio en los niveles de KYNA con la etiología de esta enfermedad [218]. Recientemente se ha descrito que este metabolito podría actuar como agonista sobre los AhR [219] y sobre el receptor acoplado a

proteína G GPR35 [215], este último relacionado con fenómenos nociceptivos y de neurotransmisión en el hipocampo [220].

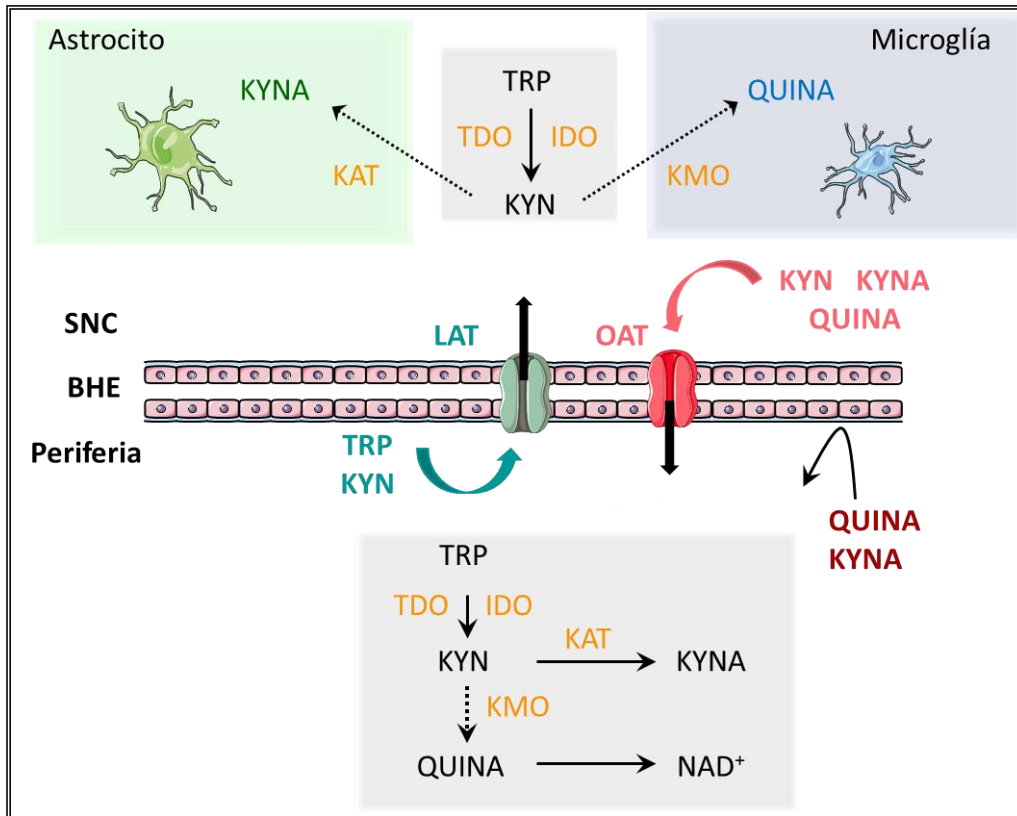


Figura 5: Esquema representativo de la intercomunicación de los metabolitos de la vía de kinurenina entre el compartimento central y periférico. Se muestra un esquema de la vía de kinurenina en ambos compartimentos, periferia y sistema nervioso central (SNC). Tanto el triptófano (TRP) como la kinurenina (KYN) son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) a través de los transportadores de aminoácidos neutros (LAT), contribuyendo a los niveles del SNC. Sin embargo, el ácido kinurénico (KYNA) y el ácido quinolínico (QUINA) no atraviesan la BHE con facilidad por lo que el aporte desde la periferia es mucho menor. Las concentraciones de los metabolitos sintetizados en el SNC son reguladas por los transportadores de ácidos orgánicos (OAT) los cuales median en su salida al compartimento periférico. *Indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO)*, *kinurenina aminotransferasa (KAT)*, *kinurenina monooxigenasa (KMO)*, *nicotin adenin dinucleótido (NAD⁺)*, *triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO)*.

2.4 Enfermedades relacionadas con la vía de kinurenina

El metabolismo de la vía de kinurenina se ha relacionado con la etiología de una gran variedad de enfermedades, asociando un incremento de la actividad de la vía a un estado patológico, como en el caso de la diabetes, la isquemia cerebral, el Alzheimer o la depresión [10, 135, 144]. Por ello, uno de los enfoques terapéuticos frente a estas enfermedades ha estado orientado a la manipulación de la vía de kinurenina mediante su inhibición o el incremento de la concentración de metabolitos protectores derivados de ella, destacando KYNA; en este último caso empleando principalmente inhibidores enzimáticos específicos para KMO [136, 221]. Sin embargo, algunos trabajos han empleado como tratamiento la administración de KYN, el cual es capaz de inducir un efecto neuroprotector asociado a un incremento de la síntesis de KYNA en la isquemia cerebral o el dolor neuropático. Este efecto se potencia mediante la coadministración de KYN junto con probenecid, lo que produce, además de un aumento de la síntesis de KYNA, un bloqueo de la salida de este metabolito del SNC, obteniendo así un efecto sinérgico protector [199, 222, 223]. Por otro lado, algunos de los metabolitos de la vía han sido señalados como potenciales biomarcadores plasmáticos de inflamación asociándose con la aparición de cáncer, diabetes o Alzheimer [224-227].

En la actualidad, el abordaje de las enfermedades neurológicas ha adquirido un nuevo punto de vista debido al estudio de la intercomunicación entre el compartimento central y el periférico, que ha puesto de manifiesto la influencia de las alteraciones periféricas sobre el correcto funcionamiento del SNC y que está permitiendo diseñar nuevas estrategias farmacológicas dirigidas al tratamiento de estas patologías.

3. Los receptores de hidrocarburos de arilo

El receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) es un factor de transcripción cuya función ha sido tradicionalmente asociada a la detoxificación de xenobióticos, sin embargo, este receptor puede participar en diversos mecanismos celulares como la plasticidad y la supervivencia neuronal, la modulación de la respuesta inmune, y la activación de defensas antioxidantes [17, 18, 228, 229]. Este hecho ha propiciado su estudio en diferentes patologías como la depresión, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, el cáncer o la diabetes, donde se ha observado que la activación o la inhibición de AhR puede tener efectos opuestos en distintos contextos patológicos [13, 15, 230]. Esto es debido a que la regulación de AhR depende de numerosos factores como la unión de determinados ligandos, posibles modificaciones postranscripcionales o, incluso, la interacción con otros factores de transcripción, los cuales modulan la función del receptor con el fin de mantener la homeostasis del organismo [231-233].

3.1 Estructura y distribución de AhR

AhR es una proteína que pertenece a la familia bHLH/PAS (dominio básico hélice bucle hélice/Per-ARNT-Sim). El dominio bHLH ubicado en la zona amino terminal está formado por una región básica, adyacente a otra región con estructura de hélice-bucle-hélice. A través de este dominio, AhR se une a las regiones promotoras de sus genes diana y participa en la interacción con otras proteínas de la misma familia. El dominio PAS contiene secuencias involucradas en la formación de una bolsa hidrófoba capaces de interactuar con los ligandos del receptor y en la dimerización con el factor Traslocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburos de Arilo (ARNT). Por último, en la región C-terminal, se sitúan los dominios de transactivación o de

represión [234, 235].

Su expresión es constitutiva tanto en humanos como en ratas en casi todos los tejidos incluyendo el SNC [236, 237]. En concreto, a nivel central, se ha detectado una elevada expresión de AhR en la región hipocámpal y en el cerebelo de ratas [238]. Sin embargo, los niveles de expresión del receptor pueden variar en función de la presencia de determinados estímulos internos y de la exposición a xenobióticos [239-241]. La expresión del cofactor ARNT también puede depender de factores ambientales, no obstante, su regulación puede ser independiente de AhR [239, 242, 243].

3.2 Regulación de la actividad de AhR

En el citosol, AhR forma parte de un complejo inactivo compuesto por varias proteínas, entre ellas la proteína de choque térmico 90 (HSP90), la co-chaperona p23, y la proteína asociada al virus de la hepatitis B (XAP2) [244]. El mecanismo clásico de activación implica la unión de AhR con uno de sus ligandos. Esto induce un cambio conformacional que permite al complejo trasladarse al núcleo celular. Una vez en su interior, AhR interacciona con ARNT formando un heterodímero transcripcionalmente activo capaz de unirse a secuencias específicas del ADN denominadas XRE o DRE (Elementos de Respuesta a Xenobióticos o Elementos de Respuesta a Dioxinas, respectivamente) [234, 235]. La unión del heterodímero con las secuencias XRE/DRE induce la expresión de un conjunto de enzimas cuya función está relacionada con el metabolismo de xenobióticos. Algunas de estas enzimas pertenecen a la familia del CYP450 como CYP1A1, CYP1A2 y CYP1B1, no obstante, también puede regular otras proteínas con actividad enzimática como la subunidad Ya de la glutatión-S-transferasa (GST-Ya), la NADPH/Quinona

oxidorreductasa (NQO-1) y la uridinadifosfato glucuronil transferasa (UGT) (figura 6) [228, 245].

AhR también puede regular la expresión de proteínas mediando en su degradación debido a su actividad como ubiquitin ligasa. Así, la activación de AhR tras la unión con su ligando permite que este se asocie al heterómero cullin4B-ubiquitin ligasa formando un complejo que interacciona con distintas proteínas para su degradación por el proteosoma [246]. La función de AhR como ubiquitin ligasa está regulada por ARNT, de tal forma que AhR posee mayor capacidad de ubiquitinización cuanto menor es la expresión o la actividad de ARNT [247].

Existen varios mecanismos implicados en la regulación negativa de AhR. Estos mecanismos juegan un papel importante en el control de la señalización del receptor limitando una respuesta exacerbada del mismo que induzca un efecto tóxico para la célula [17, 248, 249]. La mayoría de las enzimas relacionadas con el metabolismo de sustancias, como la familia del CYP450, son capaces de producir la degradación del ligando que activa AhR, limitando así la función del receptor [250]. Otro de los mecanismos que puede regular al AhR es dependiente de la proteína represora de AhR (AhRR), cuya expresión puede inducirse por la propia actividad transcripcional del receptor. AhRR impide la función del receptor al formar un dímero transcripcionalmente inactivo con ARNT, capaz de bloquear a las secuencias XRE/DRE contenidas en el promotor de los genes regulados por el receptor [251, 252].

La regulación de AhR también puede depender de modificaciones postraduccionales como la fosforilación/desfosforilación de AhR, las cuales pueden modular la señal de localización nuclear, la afinidad del dímero AhR/ARNT para unirse a las secuencias

XRE [253] e incluso inducir la propia degradación del receptor vía proteosoma [254, 255].

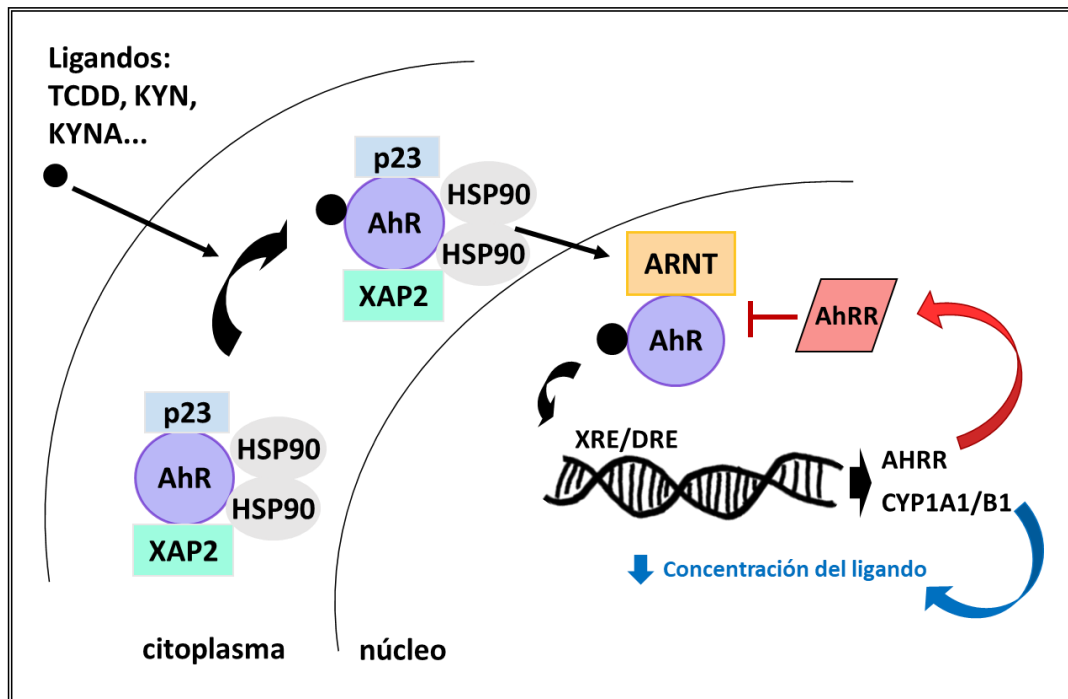


Figura 6: Mecanismo de traslocación de AhR mediada por la unión de un agonista. Diferentes ligandos agonistas como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y otras moléculas derivadas del metabolismo del triptófano como kinurenina (KYN) o ácido kinurénico (KYNA) son capaces de unirse al complejo citosólico de AhR, compuesto por la proteína de choque térmico 90 (HSP90), la co-chaperona p23 (p23), y la proteína asociada al virus de la hepatitis B (XAP2), activando al receptor y produciendo su traslocación al núcleo celular. Una vez allí, el complejo se une al Traslocador Nuclear del Receptor de Hidrocarburos de Arilo (ARNT) formando un heterodímero transcripcionalmente activo que interacciona con las secuencias XRE/DRE (elementos de respuesta a xenobióticos y dioxinas) con el fin de promover la expresión de diferentes genes, entre ellos el represor de AhR (AhRR) encargado de inhibir la actividad del receptor y los citocromos CYP1A1/B1 capaces de metabolizar al ligando agonista de AhR limitando la activación del receptor.

3.3 Ligandos con afinidad por AhR

Existen multitud de ligandos capaces de regular la activación de AhR. Los xenobióticos de naturaleza lipófila representan uno de los grupos de sustancias con

gran afinidad por el receptor, sin embargo, otras moléculas presentes en alimentos o sintetizadas de manera endógena en el organismo también han sido descritas como ligandos de AhR (figura 7) [233, 256].

Algunos de los principales ligandos endógenos de AhR son derivados del metabolismo del TRP o del grupo hemo [15, 219, 257, 258]. En concreto, varios trabajos han evidenciado la capacidad de KYN, metabolito derivado de la vía de kinurenina, para actuar como agonista de AhR en diferentes contextos patológicos [14, 15, 259, 260], incluyendo el ictus isquémico cerebral [13] y enfermedades autoinmunes [261]. Además, recientemente se ha descrito que KYN es capaz de transformarse en distintos productos derivados de su condensación aromática con una naturaleza más lipófila, incrementando considerablemente su capacidad como agonista del receptor [262].

Algunos compuestos procedentes de la dieta también son ligandos de AhR como la curcumina, los flavonoides, el indol-3-carbinol (I3C) o el 3,3'-diindolilmetano (DIM), los cuales pueden unirse a AhR modulando su actividad dependiendo de su capacidad agonista o antagonista [233, 256]. En concreto, DIM es un derivado de la condensación ácida del I3C contenido en plantas crucíferas como el brócoli. Este compuesto ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades anticancerígenas, algunas de las cuales están relacionadas con un efecto agonista de AhR, aumentando la detoxificación de sustancias cancerosas, disminuyendo la señalización inflamatoria y reduciendo el estrés oxidativo [24, 26, 263, 264]. Se han realizado varios ensayos clínicos en relación al futuro uso terapéutico de DIM en determinados tipo de cánceres [265-267], pero, además, recientemente se ha descrito que DIM puede tener un uso terapéutico potencial en otras patologías como la colitis, la isquemia cerebral o el Parkinson [268-272].

Por otro lado, y evidenciando la diversidad de ligandos capaces de regular la actividad del receptor, fármacos como el omeprazol o el ketoconazol también son capaces de inducir la activación de AhR promoviendo la expresión de CYP1A1 [273, 274].

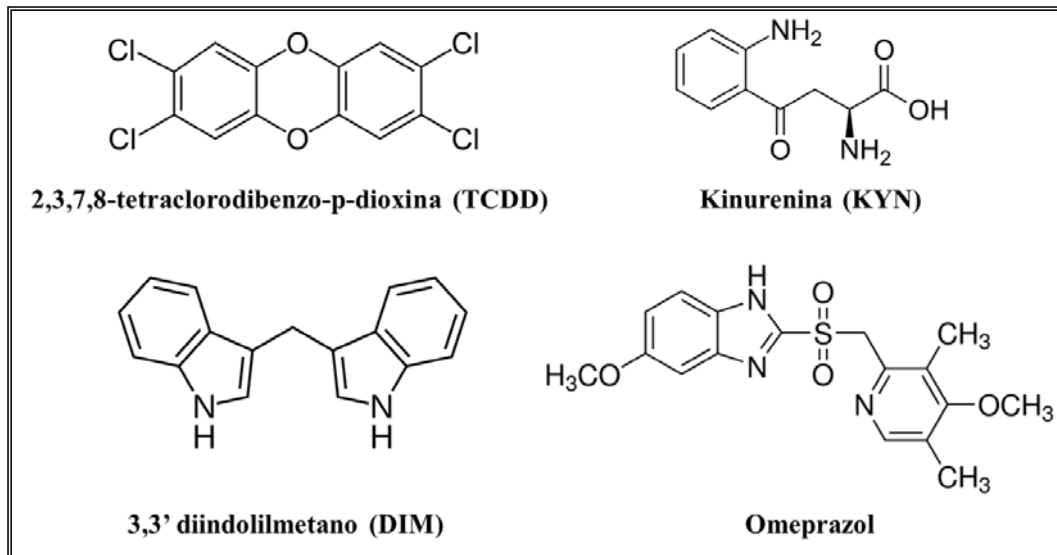


Figura 7: Estructura molecular de algunos de los ligandos que actúan como agonistas de AhR.

3.4 Funciones de AhR e interacción con otras vías de señalización

La primera función que fue descrita sobre los AhR está relacionada con su capacidad de activar mecanismos adaptativos frente a estímulos ambientales potencialmente tóxicos derivados de la metabolización de xenobióticos [275]. Sin embargo, en la actualidad, se han observado multitud de mecanismos celulares donde participa este receptor como la plasticidad y la supervivencia neuronal [18, 231], la modulación del sistema inmune [229] o la regulación de la respuesta inflamatoria y oxidativa [206, 228].

La función detoxificadora de AhR se desencadena tras la unión de este con determinados ligandos agonistas. Este hecho promueve el incremento de la actividad

transcripcional del receptor, dando lugar a un aumento de la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de fase I y fase II como CYP1B1, NQO1 o GST entre otras [276-278].

La función de AhR como promotor de la respuesta antioxidante está, en parte, relacionada con su capacidad de interacción con el factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF-2) [16, 279], el cual coordina la expresión de una amplia gama de genes con función antioxidante, incluyendo NQO1 o hemoxigenasa-1 (HO-1), tras ser activado por la presencia de radicales libres o como resultado de su fosforilación por las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) [280]. Curiosamente, existen determinados genes como NQO1, GST y UGT que pueden ser regulados por ambos factores de transcripción debido a que contienen en su promotor secuencias XRE (región reguladora específica de AhR) y secuencias ARE (elementos de respuesta antioxidante; región reguladora específica de NRF-2) [281, 282].

AhR puede interactuar con NRF-2 de forma directa o indirecta. En primer lugar, se ha descrito que el receptor es capaz de regular la expresión de NRF-2 de manera directa debido a que este último posee secuencias XRE en su promotor [283]. No obstante, NRF-2 también es capaz de incrementar la expresión de AhR ya que este contiene en su promotor secuencias ARE [284]. Por otro lado, AhR puede regular indirectamente la actividad de NRF-2. En este sentido, se ha observado que el incremento de la actividad del receptor conduce a un aumento de la expresión de los CYP1A1/B1 que deriva en una mayor producción de ROS, induciendo así la actividad de NRF-2 [285-287]. Esta relación entre ambos factores conforma una vía de regulación que es clave en el mantenimiento del equilibrio del potencial redox celular y de gran interés para la caracterización de agonistas de AhR, como en el

caso de DIM, el cual es capaz de promover activación de la vía AhR-NRF-2 [288-290].

Diferentes trabajos han evidenciado la participación de AhR en la modulación del sistema inmune y la respuesta inflamatoria en distintos modelos [291]. En concreto, se ha observado que la activación del receptor mediada por KYN, el metabolito mayoritario de la vía de kinurenina, induce la modulación de la respuesta inmune, en parte, a través de la formación de células T reguladoras. Además, la activación de AhR mediada por KYN regula la expresión de las proteínas CYP1A1/B1, TFG β y deIDO-1 y TDO, siendo estas dos últimas las enzimas responsables de la formación de KYN [14, 15, 292]. Por otro lado, se ha descrito que AhR regula la actividad del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). El receptor es capaz de inhibir a este factor de transcripción indirectamente mediante la inducción de la expresión de SOCS2 (supresor de la señalización de citoquinas-2), una proteína que participa en la regulación de diversos procesos mediados por citoquinas, o, directamente, mediante su interacción con RELA, RELB y otros miembros del complejo de señalización NF- κ B [206, 261, 293]. Este mecanismo inducido por AhR desencadena una respuesta antiinflamatoria observada en presencia de distintos estímulos, como la administración de LPS, y en enfermedades autoinmunes [294-296]. A su vez, RELB también es capaz de regular la actividad y la expresión de AhR, participando en un mecanismo de protección mediante la inhibición de señales de apoptosis desencadenadas tras un daño celular [296].

Otros factores de transcripción adicionales con los que AhR interactúa son Wnt/ β -catenina o ER- α , los cuales son capaces de modular a su vez la actividad del receptor, constituyendo una vía de regulación implicada en la proliferación,

diferenciación y migración celular [297].

3.5 Enfermedades relacionadas con la función de AhR

El AhR fue descrito inicialmente como un mediador de los efectos tóxicos inducidos por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y otros compuestos aromáticos. Sin embargo, durante los últimos años, los estudios con xenobióticos agonistas [239, 278], modelos *knockout* [298, 299] y el descubrimiento de ligandos endógenos, que incluyen derivados de indol o del metabolismo del TRP [13, 269, 300, 301], han identificado múltiples funciones fisiológicas del receptor incluyendo entre ellas la proliferación y diferenciación celular, o la respuesta inmunológica [17, 18, 206, 229]. En concreto, este receptor puede actuar como un sensor que permite la adaptación de las células inmunes a las condiciones ambientales y la activación de mecanismos de defensa y reparación celular. De hecho, recientemente se ha descrito el papel de AhR como un mediador clave en la activación de astrocitos y microglía en modelos experimentales de encefalomiелitis autoinmune y de esclerosis múltiple [261, 302]. La activación de este receptor en ambos subtipos celulares limita la respuesta inflamatoria producida por un daño celular. Se ha sugerido que esta activación podría estar desencadenada por la producción de ligandos endógenos derivados del metabolismo del TRP provenientes de la periferia [17], evidenciando una conexión clave entre ambos compartimentos. Además, se ha observado que el uso de ligandos naturales procedentes de la dieta como el compuesto DIM induce un efecto protector en enfermedades que desencadenan un efecto inflamatorio y un estrés oxidativo [269, 271, 303]. Por todo ello, se ha considerado el uso de estos ligandos naturales de AhR como una futura terapia para enfermedades inflamatorias y degenerativas que afectan al SNC [17].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La administración de una dosis neurotóxica de MDMA produce un daño serotoninérgico a largo plazo, que se manifiesta por una disminución de las concentraciones de serotonina (5-HT) en diferentes áreas cerebrales y de la densidad de los transportadores de 5-HT (SERT). Numerosos estudios han evidenciado la relación entre este efecto neurotóxico y el estrés oxidativo generado de forma inmediata tras la administración de la droga, mediante el uso de atrapadores de radicales libres y otras sustancias antioxidantes capaces de reducir el daño serotoninérgico derivado de MDMA.

El triptófano (TRP) es un aminoácido esencial que actúa como precursor en la síntesis de 5-HT. Las concentraciones de TRP disponibles están reguladas principalmente por la vía de kinurenina, una ruta metabólica que genera moléculas neuroactivas y cuya alteración se asocia a distintas enfermedades neurológicas. La kinurenina (KYN) es el metabolito principal de esta vía y es, además, un agonista de los receptores de hidrocarburos de arilo (AhR), los cuales participan en múltiples funciones celulares incluyendo el metabolismo de sustancias y la modulación de la respuesta inflamatoria y antioxidante.

Teniendo esto en consideración se estableció la siguiente hipótesis: La administración de una dosis neurotóxica de MDMA altera la vía de kinurenina induciendo un incremento en la concentración de KYN que activa los AhR promoviendo mecanismos neuroprotectores a corto plazo que limitan el daño serotoninérgico producido por la droga.

Para comprobar esta hipótesis se establecieron los siguientes objetivos:

➤ **Estudiar el efecto de MDMA sobre la vía de kinurenina y su implicación en la neurotoxicidad inducida por la droga**

1. Determinar el efecto de MDMA sobre las concentraciones de TRP y su principal metabolito KYN a nivel central y periférico.
2. Analizar el efecto de MDMA a corto plazo sobre la expresión de las principales enzimas de la vía de kinurenina a nivel central y periférico y sobre la actividad enzimática de TDO en hígado.
3. Evaluar, mediante el tratamiento con los inhibidores específicos, la contribución de las principales enzimas de la vía de kinurenina en las concentraciones de TRP y KYN a nivel central y periférico tras la administración de MDMA
4. Determinar, mediante la administración de inhibidores específicos y de L-kinurenina exógena, la implicación de la vía de kinurenina en el daño serotoninérgico inducido por MDMA a largo plazo.

➤ **Estudiar el efecto de MDMA sobre la actividad de los AhR y la implicación de estos receptores en la neurotoxicidad inducida por la droga.**

5. Determinar el efecto de la administración de MDMA sobre la actividad y la expresión de los AhR a corto plazo.
6. Determinar la implicación de los AhR sobre el daño serotoninérgico inducido por MDMA a largo plazo mediante la administración del CH-223191, un antagonista específico de AhR.

7. Estudiar el efecto de la administración de DIM, un agonista de los AhR, sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA a largo plazo.
8. Analizar el efecto de la administración de DIM sobre el estrés oxidativo generado a corto plazo por la inyección de MDMA.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo en ratas macho adultas de la cepa Dark Agouti con un peso comprendido entre 175 - 200 g (8 semanas de edad) (Harlan Laboratories Models, Indianapolis, IN, EE.UU.). La elección de esta cepa es debida a su particular deficiencia en determinadas isoformas del CYP450, más concretamente a aquellas pertenecientes a la subfamilia CYP2D [4, 85, 86]. La disminución de la expresión de estas enzimas provoca una mayor sensibilidad a los efectos neurotóxicos inducidos por MDMA, contrariamente a lo que ocurre con otras cepas más corrientes, que muestran mayor resistencia al daño causado por la droga.

Los animales se mantuvieron en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid en condiciones de temperatura (21 ± 2 °C) y humedad (50 - 55%) controladas, sometidos a ciclos de luz/oscuridad de 12 h y con libre acceso a comida y agua. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo a la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense y de la Comunidad de Madrid siguiendo la Regulación Española y Europea (Directiva Europea 2010/63/UE).

2. Compuestos administrados

- **680C91**: Administrado por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 10 mg/kg. El compuesto se disolvió en una solución acuosa compuesta por DMSO al 12% y Tween® 80 al 12%. El volumen de administración fue de 1 ml/kg. Suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

- **CH-223191:** Administrado en 3 dosis de 10 mg/kg (i.p.) cada una. El compuesto se disolvió en una solución acuosa compuesta por DMSO al 12% y Tween® 80 al 12%. El volumen de administración fue de 1 ml/kg. Suministrado por Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).
- **DIM, 3,3'-Diindolilmetano:** Administrado por vía oral a una dosis de 250 mg/kg. El compuesto se suspendió en aceite de maíz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). El volumen de administración fue de 5 ml/kg. Suministrado por Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, EE.UU.).
- **INCB-024360:** Administrado a una dosis de 50 mg/kg (i.p.). El compuesto se disolvió en una solución acuosa compuesta por DMSO al 12% y Tween® 80 al 12%. El volumen de administración fue de 1 ml/kg. Suministrado por Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).
- **L-Kinurenina sulfato:** Administrado a una dosis de 100 mg/kg (i.p.). El compuesto se disolvió en una solución acuosa de NaOH 0,1 M que fue ajustada posteriormente a pH 7,4 con HCl. El volumen de administración fue de 4 ml/kg. Suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).
- **LPS, Lipopolisacárido de Escherichia coli O111:B4:** Administrado a una dosis de 2 mg/kg (i.p.). El compuesto se disolvió en una solución salina (NaCl 0,9%). El volumen de administración fue de 1 ml/kg. Suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).
- **MDMA, (\pm) 3,4-metilendioximetanfetamina clorhidrato:** Administrada a una dosis de 12,5 mg/kg (i.p.). El compuesto se disolvió en una solución salina (NaCl 0,9%). El volumen de administración fue de 1 ml/kg. Suministrado por el Servicio de Estupefacientes y Psicótrpos de la Agencia Española del Medicamento (Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social).

- **PF-04859989:** Administrado a una dosis de 32 mg/kg (i.p.). El compuesto se disolvió en una solución salina (NaCl 0,9%). El volumen de administración fue de 1 ml/kg. Suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).
- **Probenecid:** Administrado a una dosis de 50 mg/kg (i.p.). El compuesto se disolvió en una solución acuosa de NaOH 0,1 M que fue ajustada posteriormente a pH 7,4 con HCl. El volumen de administración fue de 4 ml/kg. Suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).
- **Ro 61-8048:** Administrado a una dosis de 100 mg/kg (i.p.). El compuesto se disolvió en una solución acuosa de NaOH 60 mM que fue ajustada posteriormente a pH 7,4 con HCl. El volumen de administración fue de 2 ml/kg. Suministrado por Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido).

3. Diseño experimental

Para determinar los efectos de MDMA sobre la vía de kinurenina a nivel central se obtuvieron el hipocampo y la corteza frontal, áreas cerebrales con gran cantidad de aferencias serotoninérgicas las cuales son diana de la droga de estudio. Para conocer sus efectos a nivel periférico se empleó el hígado, principal tejido responsable de la metabolización de MDMA y de la transformación del TRP en los metabolitos de la vía de kinurenina; y el plasma, donde se analizaron las concentraciones de los principales metabolitos de esta vía.

Para la realización de los experimentos se utilizó una única dosis de MDMA de 12,5mg/kg (i.p.), la cual induce neurotoxicidad serotoninérgica en esta cepa de rata sin comprometer la supervivencia del grupo experimental [2-5, 39].

3.1 Estudio del efecto de la administración de MDMA sobre la vía de kinurenina

Los animales fueron tratados con MDMA o vehículo (solución salina) y sacrificados 1, 3, 6, 24 h y 7 días después de su administración. De esta forma se obtuvo una curva temporal del efecto de la droga sobre algunos de los principales metabolitos derivados del TRP (figura 8). En concreto, las muestras procedentes del hipocampo, la corteza frontal y el plasma fueron destinadas a la determinación, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), de los niveles de TRP y dos de los productos de su metabolismo, KYN y 5-HT (apartado 5.1). En los tejidos de hipocampo, corteza frontal e hígado se determinó la expresión y actividad de las principales enzimas de la vía de kinurenina mediante la técnica de western blot y ensayo enzimático (apartados 5.5 y 5.4).

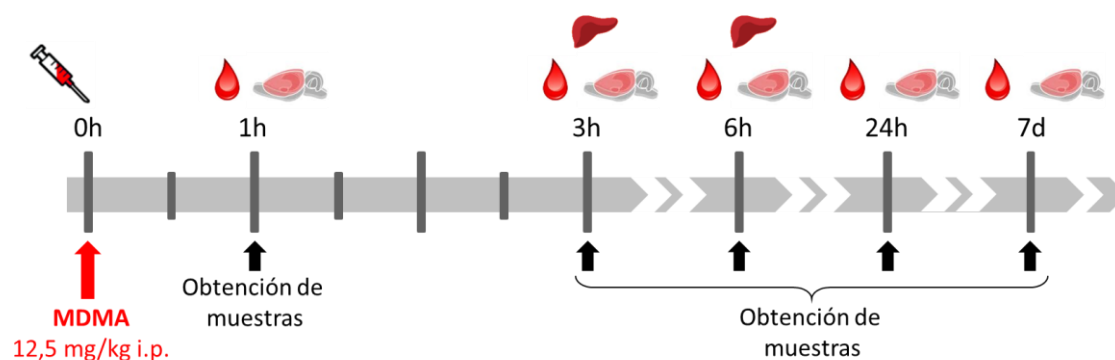


Figura 8: Esquema del protocolo utilizado para el estudio de la vía de kinurenina a diferentes tiempos tras la administración de MDMA.

3.2 Estudio de los efectos a corto plazo de la administración de MDMA tras la inhibición de las principales enzimas de la vía de kinurenina

Previamente a la administración de la droga, los animales fueron tratados con diferentes inhibidores para cada una de las enzimas implicadas en la síntesis de los metabolitos de la vía de kinurenina siguiendo varios protocolos temporales.

El compuesto 680C91 [304] es un inhibidor específico de la proteína TDO, enzima encargada de la síntesis de KYN a partir del TRP en condiciones fisiológicas. Este compuesto o su vehículo (DMSO 12%, Tween[®] 80 12% en solución acuosa; i.p.) fueron administrados 30 min antes de la inyección de MDMA o vehículo (solución salina). Posteriormente, los animales fueron sacrificados 3 h después de la administración de la droga. Las muestras de hipocampo, corteza frontal y plasma obtenidas se emplearon en la determinación de los niveles de TRP, KYN y 5-HT mediante la técnica de HPLC (apartado 5.1).

El compuesto INCB-024360 [305] es un inhibidor de la enzima IDO, encargada de la síntesis de KYN a partir de TRP en presencia de distintos estímulos. INCB-024360 o su vehículo (DMSO 12%, Tween[®] 80 12% en solución acuosa; i.p.) fueron administrados 1 h antes de la inyección de MDMA o vehículo (solución salina) y sacrificados 6 h después de la administración de la droga. Las muestras de hipocampo y plasma obtenidas se emplearon en la determinación de los niveles de TRP, 5-HT y KYN mediante la técnica de HPLC (apartado 5.1).

En la figura 9 se muestra el protocolo de administración empleado para cada uno de los inhibidores.

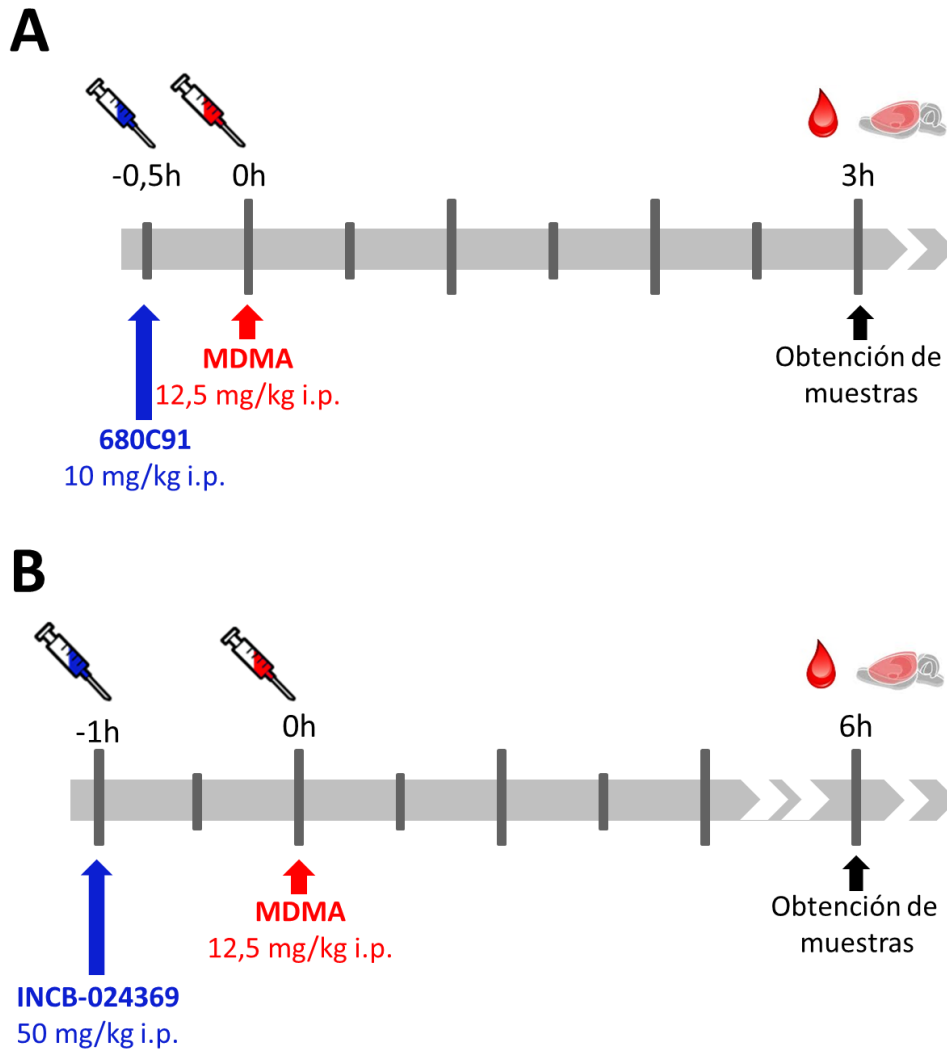


Figura 9: Esquema del protocolo utilizado para el estudio del papel de las enzimas (A) TDO e (B) IDO-1 en el efecto a corto plazo de una dosis neurotóxica de MDMA mediante el uso del antagonista específico 680C91 y INCB-024369, respectivamente.

El compuesto Ro 61-8048 [306] es un inhibidor específico de la enzima KMO responsable de la síntesis de 3-KOH a partir de KYN. El compuesto PF-04859989 [307] es un inhibidor específico de KAT II, una de las isoformas de la enzima KAT con mayor expresión en el SNC en rata y humano y responsable de la síntesis de KYNA a partir de KYN. Ambos tratamientos o sus vehículos (solución acuosa de NaOH 60 mM ajustada a pH 7,4 o solución salina respectivamente; i.p.) fueron administrados 1 h antes de la inyección de MDMA o vehículo (solución salina) en

experimentos independientes. En ambos casos, los animales fueron sacrificados 3 h después de la inyección de la droga (figura 10). Las muestras de hipocampo y plasma obtenidas se emplearon en la determinación de los niveles de TRP, 5-HT y KYN mediante la técnica de HPLC (apartado 5.1).

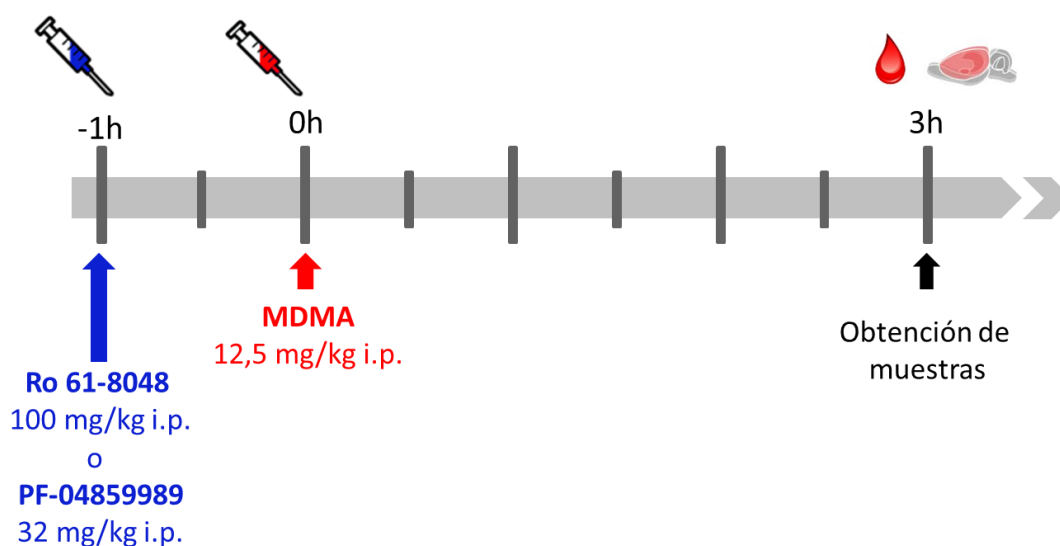


Figura 10: Esquema del protocolo utilizado para el estudio del papel de las enzimas KMO y KAT II en el efecto a corto plazo de una dosis neurotóxica de MDMA mediante el uso de los inhibidores específicos Ro 61-8048 y PF-04859989, respectivamente.

3.3 Efecto de la administración de MDMA sobre los AhR

Los animales fueron tratados con MDMA o vehículo (solución salina) y sacrificados 1 y 3 h después de su administración (figura 11). Las muestras de hipocampo extraídas fueron procesadas inmediatamente después para el estudio de la expresión de AhR y ARNT, y de la traslocación de AhR, como se detalla más adelante en las secciones 4.2.3.2 y 4.2.4 respectivamente, a través de la técnica de western blot (apartado 5.5).

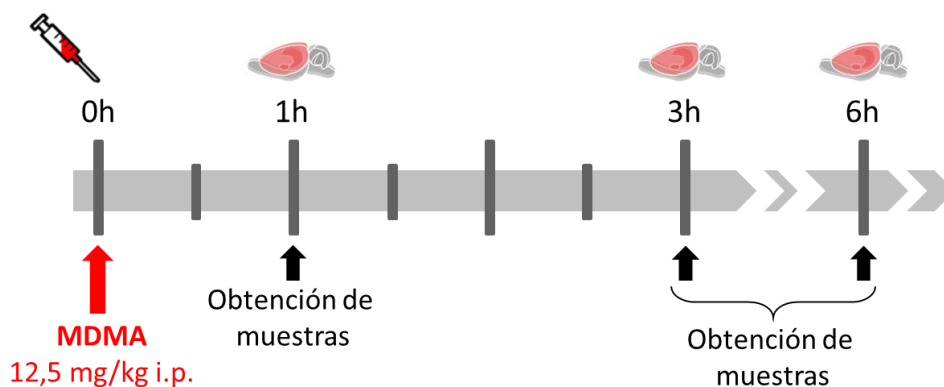


Figura 11: Esquema del protocolo utilizado para el estudio de la actividad y expresión de AhR a diferentes tiempos tras la administración de MDMA.

3.4 Estudio de los efectos a corto plazo de la administración de MDMA tras la modulación de los receptores AhR

Con el fin de estudiar el papel de AhR en los cambios observados tras la administración de MDMA, se emplearon distintas herramientas farmacológicas capaces de regular la actividad de estos receptores utilizando para ello varios protocolos temporales.

El compuesto CH-223191 [308] es un antagonista específico de AhR que bloquea la traslocación de este receptor al núcleo celular y por lo tanto su actividad como factor de transcripción. Los animales fueron tratados con tres dosis de CH-223191 o su vehículo (DMSO 12%, Tween[®] 80 12% en solución acuosa; i.p.), en concreto, las dos primeras dosis fueron administradas 12 h y 30 min antes de la inyección de MDMA o vehículo (solución salina), y la tercera 30 min después de la administración de la droga (figura 12). Los animales fueron sacrificados 3 h después de la inyección de MDMA y los hipocampos obtenidos fueron procesados inmediatamente después para el estudio de la traslocación de AhR, como se detalla más adelante en la sección 4.2.4, mediante la técnica de western blot (apartado 5.5).

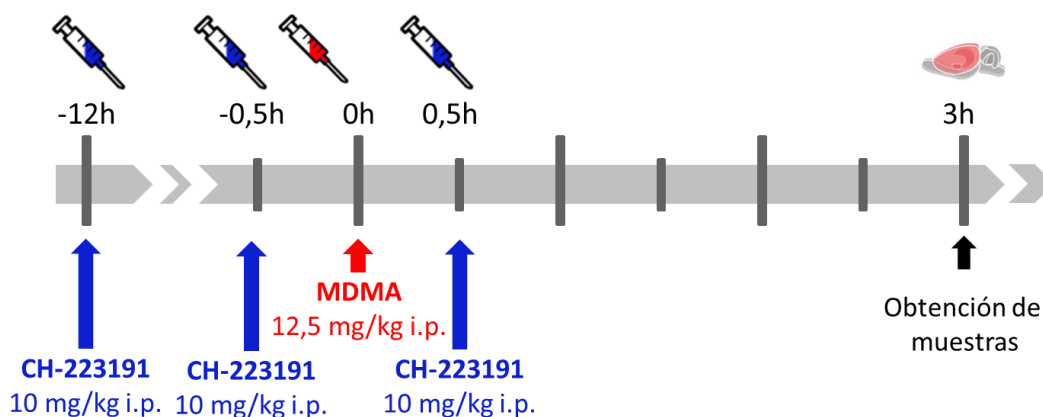


Figura 12: Esquema del protocolo utilizado para el estudio del papel de AhR en los efectos a corto plazo de la administración de una dosis neurotóxica de MDMA mediante el uso del antagonista específico del receptor CH-223191.

Por otro lado, se administró el compuesto DIM [309], conocido por su papel como modulador positivo de los AhR, o su vehículo (aceite de maíz; vía oral) 1 h antes del tratamiento con MDMA o vehículo (solución salina). Los animales fueron sacrificados 3 y 6 h después del tratamiento con la droga (figura 13). Las muestras de hipocampo fueron destinadas al estudio del estrés oxidativo mediante la determinación de la expresión de las proteínas hemoxygenasa-1 y catalasa a través de la técnica de western blot (apartado 5.5).

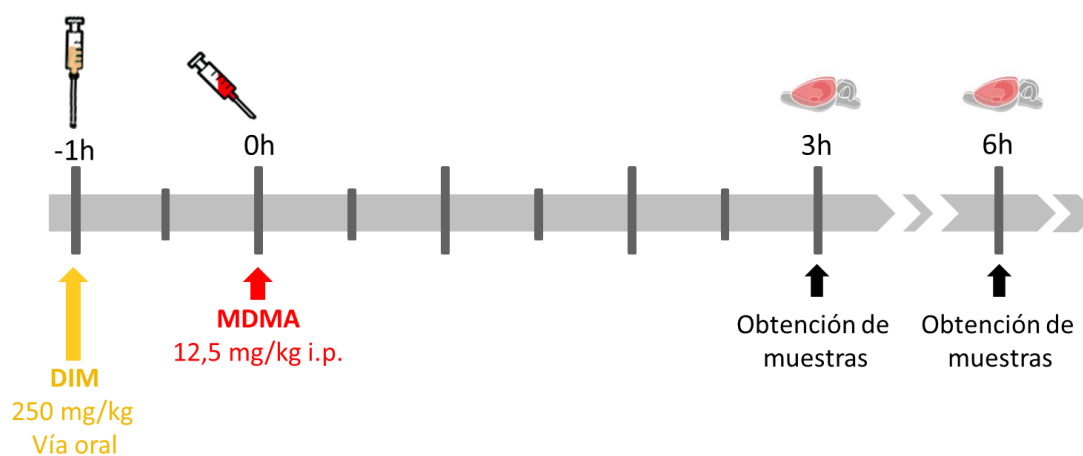


Figura 13: Esquema del protocolo utilizado para el estudio del papel de AhR en los efectos a corto plazo de la administración de una dosis neurotóxica de MDMA mediante el uso del compuesto DIM como modulador positivo de AhR.

3.5 Estudio de la implicación de la vía de kinurenina sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA

Con el fin de estudiar el posible papel de la vía de kinurenina en la neurotoxicidad serotoninérgica a largo plazo inducida por MDMA, los animales fueron tratados con distintos inhibidores para cada una de las enzimas implicadas en la síntesis de los metabolitos de la vía de kinurenina o con L-kinurenina sulfato siguiendo varios protocolos temporales.

El efecto de los compuestos 680C91 (inhibidor de TDO), Ro 61-8048 (inhibidor de KMO), PF-04859989 (inhibidor de KAT II) y L-kinurenina sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA se evaluó 7 días después de la administración de la droga a través del marcaje radiactivo de los SERT [4, 5, 130, 134] mediante la técnica de autorradiografía descrita más adelante en el apartado 5.2. Los protocolos de administración de los distintos inhibidores empleados se encuentran descritos en el apartado 3.2. Por otro lado, L-kinurenina sulfato fue administrada conjuntamente con probenecid [213], un compuesto que promueve el acúmulo de los metabolitos derivados de la vía de kinurenina en el SNC mediante la inhibición de los OAT encargados del transporte de distintos metabolitos de la vía de kinurenina fuera del SNC [192]. La inyección de ambos compuestos o de su vehículo (NaOH 0,1 M ajustado a pH 7,4; i.p.) fue realizada 1 h antes de la administración de MDMA (figura 14).

3.6 Estudio de la modulación de los receptores AhR sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA

Con el fin de estudiar el posible papel de AhR en la neurotoxicidad serotoninérgica a largo plazo producida por MDMA, los animales fueron tratados con distintos

compuestos reguladores de la actividad del receptor siguiendo varios protocolos temporales.

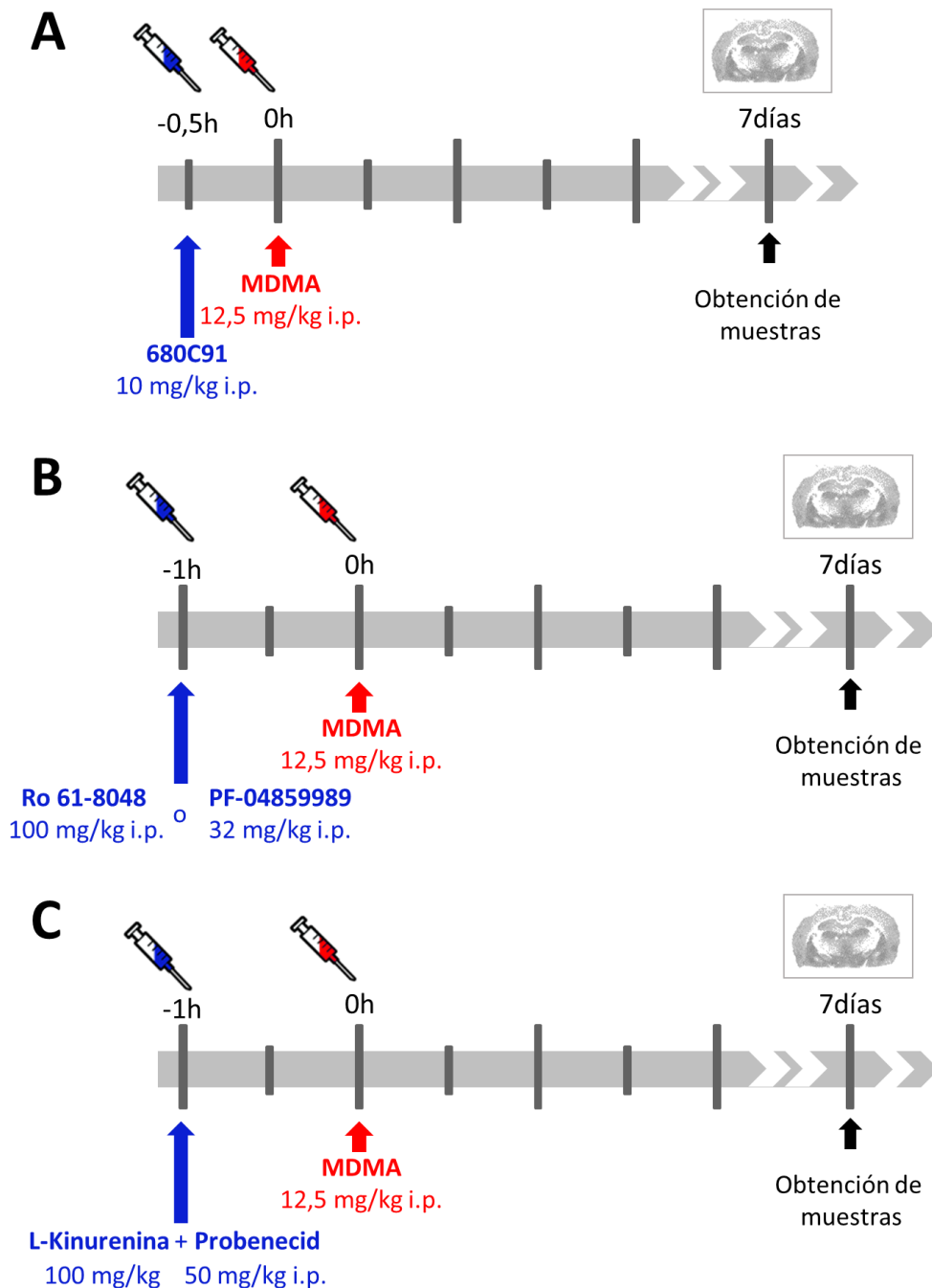


Figura 14: Esquemas de los protocolos utilizados para el estudio del papel de las enzimas (A) TDO, (B) KMO y KAT II y del metabolito (C) kinurenina en el efecto a largo plazo de una dosis neurotóxica de MDMA mediante el uso de los compuestos (A) 680C91, (B) Ro 61-8048 y PF-04859989, y (C) L-kinurenina sulfato junto con probenecid.

El efecto de los compuestos CH-223191 y DIM sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA se evaluó 7 días después de la administración de la droga (figura 15). Para ello se utilizó el protocolo de administración comentado en el apartado 3.3. En ambos casos, el estudio de la neurotoxicidad se realizó a través del marcaje radiactivo de los SERT mediante la técnica de autorradiografía descrita más adelante en el apartado 5.2.

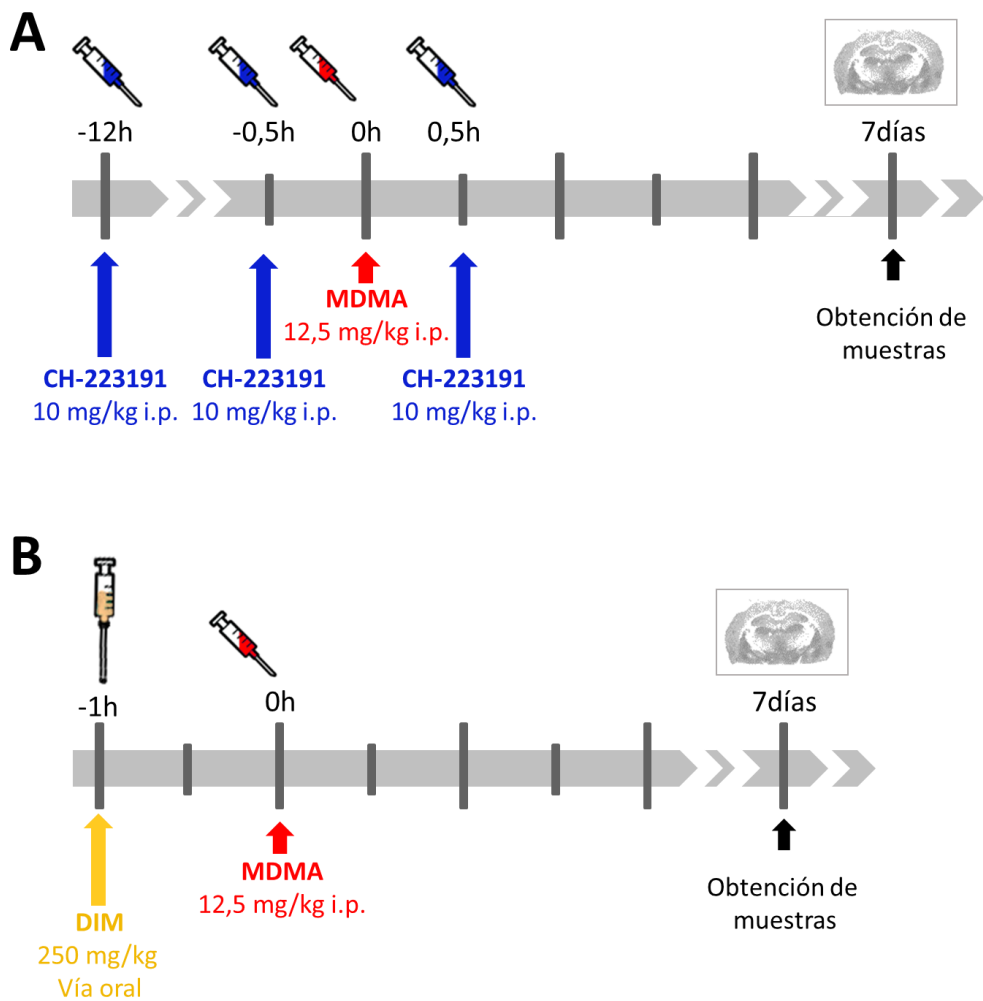


Figura 15: Esquema del protocolo utilizado para el estudio del papel de AhR en el efecto a corto plazo de una dosis neurotóxica de MDMA mediante el uso de diferentes compuestos que modulan la actividad de AhR: (A) Antagonista de AhR, CH-223191; (B) modulador positivo de AhR, DIM.

4. Obtención y procesamiento de muestras

4.1 Obtención de muestras biológicas

Los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente después se obtuvo el hígado y el cerebro completo, los cuales fueron almacenados directamente a -80°C . El cerebro congelado se empleó posteriormente en la técnica de autorradiografía. Para el resto de las determinaciones, el cerebro fue diseccionado obteniéndose los hipocampos y las cortezas frontales que, posteriormente, fueron procesadas o almacenadas a -80°C en función de las diferentes técnicas experimentales a realizar. También, se obtuvo la sangre troncal que fue recogida en tubos de EDTA comerciales (Deltalab, Barcelona, España) y centrifugada a $3.250 \times g$ (Hermle Z 400 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania) durante 10 min a 4°C . Una vez recogido el sobrenadante (plasma) se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización.

4.2 Procesamiento de tejidos

4.2.1 Procesamiento de muestras para el análisis de la concentración de TRP, KYN y 5-HT mediante la técnica de HPLC

Los hipocampos y las cortezas frontales diseccionadas se pesaron en una balanza de precisión. A partir de este momento, las muestras permanecieron siempre en hielo. Cada estructura se homogeneizó en agua Milli-Q en proporción 1:5 (p/v) mediante la sonicación de la muestra por ultrasonidos (250 Digital Sonifier, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, CT, EE.UU.) durante 15 segundos a una amplitud del 30%. Seguidamente, se acidificaron con ácido perclórico al 6% en proporción 1:4 (v/v) y se agitaron vigorosamente con el fin de producir la precipitación de proteínas y otros

componentes que pudiesen interferir en el análisis. Las muestras se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue recogido y congelado a -80°C para su posterior análisis por HPLC.

Las muestras de plasma sanguíneo obtenidas de los mismos animales fueron procesadas de manera similar a lo descrito para el tejido cerebral con ligeras modificaciones. La dilución del plasma se realizó con agua Milli-Q en proporción 1:5 (p/v). Seguidamente, se acidificó con ácido perclórico al 6% en proporción 1:4 (v/v) y se agitó vigorosamente con el fin de producir la precipitación de proteínas y otros componentes que pudiesen interferir en el análisis. Las muestras se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se recogieron y se filtraron utilizando una jeringa acoplada a un filtro de celulosa con un tamaño de poro de 0,2 µm (Sartorius™, Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) con el fin de eliminar el componente lipídico de las muestras. Los sobrenadantes filtrados fueron almacenados a -80°C hasta su posterior utilización para el análisis por HPLC.

4.2.2 Preparación de las secciones tisulares para la técnica de autorradiografía

Los cerebros extraídos se adhirieron en un soporte metálico utilizando el pegamento Tissue-tek® (Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Países Bajos) y se obtuvieron cortes coronales seriados de hipocampo y corteza frontal de 20 µm de grosor en un criostato (Leica CM1950, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania). Los cortes se fijaron a portaobjetos cargados positivamente (SuperFrost®plus, Menzel-Gläser, Alemania) y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

4.2.3 Preparación del extracto proteico total

4.2.3.1 Procesamiento de los distintos tejidos para determinar la expresión de las enzimas implicadas en la vía de kinurenina y en fenómenos antioxidantes.

Para analizar la expresión de las diferentes enzimas se obtuvo el extracto proteico total del tejido siguiendo el protocolo descrito a continuación.

El hipocampo, corteza o una muestra de tejido hepático fue pesado en una balanza de precisión y homogeneizado en proporción 1:5 (p/v) en tampón de lisis (Tris base 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM, NP-40 1%, pH 7,4) con inhibidores de proteasas al 5% y de fosfatasas al 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) manteniendo el tejido en hielo durante todo el proceso. La disgregación del tejido se realizó en un homogeneizador de ultrasonidos durante 15 segundos a una amplitud de 30%. Posteriormente, se centrifugaron a 16.200 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue recogido y congelado a -80°C hasta el momento de su utilización en los ensayos correspondientes.

4.2.3.2 Procesamiento del tejido para determinar la expresión de las proteínas AhR y ARNT

Para el estudio de la expresión de AhR y ARNT se obtuvo el extracto proteico total del tejido siguiendo el protocolo descrito a continuación. El hipocampo fue homogeneizado en un volumen fijo de 600 µl en tampón de lisis (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NP-40 1%, deoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1%, pH 7,4) con inhibidores de proteasas al 5% y fosfatasas al 1% manteniendo el tejido en hielo durante todo el proceso. La homogeneización del tejido se realizó de forma manual con un homogeneizador de vidrio esmerilado y seguidamente se centrifugó a

16.200 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue recogido y congelado a -80°C hasta el momento de su utilización.

4.2.4 Separación de los extractos citosólicos y nucleares

Para analizar la traslocación nuclear de AhR se llevó a cabo la separación de las fracciones citoplasmática y nuclear en el tejido hipocampal de rata. Para ello se siguió el método descrito por Schreiber y col. [310] con algunas modificaciones. Ambos hipocampos se diseccionaron e inmediatamente después fueron homogeneizados de forma manual en un volumen fijo de 600 µl de tampón hipotónico (HEPES 10 mM a pH 7,9, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, KCl 10 mM) con inhibidores de proteasas al 5% y fosfatasa al 1%. Tras 10 min en hielo, se incorporó el detergente NP-40 al 0,5% y se agitó vigorosamente en un vórtex durante 5 segundos. Las muestras se centrifugaron a 13.000 x g durante 5 min a 4°C y se recogió el sobrenadante que constituye el extracto citosólico. Al *pellet* resultante se le añadió 200 µl de tampón hipotónico y se centrifugó de nuevo durante 5 min a 13.000 x g para retirar cualquier resto de extracto citosólico. Posteriormente, al precipitado se le añadió 90 µl de tampón hipertónico (HEPES 20 mM a pH 8,0, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 400 mM) con inhibidores de proteasas al 5% y fosfatasa al 1% y se agitó suavemente a 4°C durante 30 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 13.000 x g durante 5 min a 4°C y se recogió el sobrenadante correspondiente al extracto nuclear. Ambas fracciones se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

4.2.5 Procesamiento para la extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó en tejido hipocampal siguiendo las instrucciones del

kit comercial RNeasy[®] Mini Kit (Quiagen, Venlo, Países Bajos). Brevemente, las muestras se homogeneizaron en un buffer de lisis. A continuación el lisado obtenido fue incorporado en las minicolumnas de sílice, las cuales fueron centrifugadas para eliminar todas las impurezas. El ADN genómico remanente se eliminó mediante un tratamiento con ADNasas que fue incorporado a la columna. El ARN purificado adherido a la columna se eluyó con agua Milli-Q. La cantidad y pureza del ARN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría UV/VIS. La obtención de ARNm fue realizado en la Unidad de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid, España.

5. Técnicas experimentales

5.1 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cuantificación de la concentración de los diferentes metabolitos se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sistema utilizado para todos los análisis se compone de una bomba (Waters 510) conectada a un inyector automático con refrigeración (Waters 2707 Autosampler, Waters 712 WISP), una columna de fase reversa (Spherisorb ODS2; 5 μ m; 150 x 4.6mm) con precolumna (Nova-Pak C18) y un detector que varía en función de la naturaleza del compuesto a analizar. Todos los componentes utilizados pertenecen a la casa comercial Waters (Milford, MA, EE.UU.).

La fase móvil empleada en cada caso fue filtrada con filtros de poliamida de 47 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,45 μ m (Sartorius, Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) para eliminar posibles impurezas sólidas y, posteriormente, fue desgasificada con helio para desplazar las moléculas de oxígeno presentes en la

disolución antes de incorporarla al sistema. El flujo programado para todas las determinaciones fue de 1,0 ml/min.

Para el análisis de la concentración de los metabolitos se utilizaron estándares de concentración conocida preparados en el mismo tampón de homogenización que las muestras procesadas.

Las áreas bajo la curva de los diferentes picos obtenidos tanto de los estándares como de las muestras se recogieron y cuantificaron utilizando los programas informáticos UniPoint™ System Software (Gilson, Middleton, WI, EE.UU.) o Clarity™ (Data Apex, Praga, República Checa).

5.1.1 Cuantificación de la concentración de TRP y de 5-HT

La cuantificación de la concentración de TRP y 5-HT se realizó, mediante el sistema HPLC descrito anteriormente, a través de un detector fluorométrico (Waters 2475) programado para la detección de TRP en las longitudes de onda de 270 nm de excitación y 360 nm de emisión, y la detección de 5-HT en las longitudes de onda de 290 nm de excitación y 398 nm de emisión.

La fase móvil empleada estaba compuesta de acetato de amonio 0,1 M y metanol al 8% en agua MilliQ ajustada a pH 3,7 con ácido acético.

El tiempo de retención obtenido para el TRP fue de 6,9 min y para la 5-HT de 4,7 min en las condiciones descritas.

5.1.2 Cuantificación de la concentración de KYN

La cuantificación de la concentración de KYN se realizó, mediante el sistema HPLC

descrito anteriormente, a través de un detector de absorbancia ultravioleta (Waters 2487) programado a una longitud de onda de 365 nm.

La fase móvil empleada estaba compuesta de acetato de sodio 0,1 M y acetonitrilo al 4% en agua MilliQ ajustada a pH 3,7 con ácido acético.

El tiempo de retención obtenido para KYN fue de 5,1 min en las condiciones descritas.

5.2 Marcaje autorradiográfico del transportador de 5-HT [³H]citalopram

Para el estudio de la neurotoxicidad inducida por MDMA se analizó la densidad de los SERT a través de su unión con la molécula [³H]citalopram siguiendo el protocolo descrito por Thomsen y Helboe [311] con ligeras modificaciones. Antes del ensayo, los portaobjetos con las secciones tisulares se atemperaron durante 30 min. A continuación, los cortes se incubaron durante 15 min a 25°C en un tampón de preincubación (Tris-HCl 50 mM, NaCl 120 mM y KCl 5 mM, pH 7,4) y, seguidamente, se incubaron durante 2 h a 25°C en el tampón de preincubación con [³H]citalopram 2 nM. Ambas incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. La fijación no específica fue realizada en una sección consecutiva a las anteriores, incubada en las mismas condiciones descritas anteriormente, pero en presencia de fluoxetina 20 µM. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados de dos min cada uno en un tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) a 4°C, seguidos de una inmersión breve en agua destilada a 4°C. Una vez secas las secciones se expusieron a películas sensibles a tritio (Biomax MR Kodak, Madrid, España) junto con un estándar formado de un polímero sintético que posee bandas que contienen distintas concentraciones conocidas de isótopo (nCi/g de tejido). Éstos fueron almacenados en

chasis (Amersham Hypercassette™, (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU) protegidos de la luz a 4 °C durante un período de 6-8 semanas antes de llevar a cabo el revelado en una cámara oscura.

Una vez reveladas las películas, los autorradiogramas de los cortes correspondientes y del estándar de tritio se cuantificaron mediante densitometría óptica, utilizando un sistema informático de análisis de imagen (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MD, USA), previa captación de las películas a través de un escáner. La cuantificación densitométrica de las impresiones del estándar junto con los valores correspondientes de las concentraciones del isótopo dio lugar a una curva de calibración que posibilita la extrapolación posterior de los niveles obtenidos en las muestras experimentales.

Para el tratamiento de los datos obtenidos por el programa, a cada medición de las diferentes secciones se le sustrajo el ruido de fondo de la película obtenido y la medida que corresponda a cada corte de los valores de fijación no específica, y se calculó la densidad de sitios de unión (Bmax) expresada en fmol/mg de tejido.

5.3 Cuantificación de la concentración de proteínas

La determinación de la concentración de proteína de las muestras se realizó siguiendo el ensayo colorimétrico comercial DC Assay Protein (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La reacción en la que se basa la técnica es similar al ensayo publicado por Lowry et al. [312] pero con ligeras modificaciones que reducen el tiempo y la cantidad de muestra empleada.

Para ello, se utilizaron 5 µl de la muestra homogeneizada a los cuales se les añadió 25 µl de una mezcla en proporción 50:1 de solución alcalina de tartrato de cobre

(reactivo A) y solución surfactante (reactivo S). La solución resultante generó un medio alcalino donde los iones de cobre (Cu^{2+}) se unieron a los grupos nitrogenados presentes en las proteínas formando complejos que dieron lugar al desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína. Posteriormente se incorporó a cada pocillo 200 μl del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (reactivo B) el cual sufrió una reducción principalmente por los residuos fenólicos de tirosina utilizando la presencia del cobre como catalizador de la reacción. Al añadir el reactivo de Folin, la muestra contenida en los pocillos desarrolló un color azul cuya intensidad fue proporcional a la cantidad de proteína que había en la muestra. Tras 5 min, se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 750 nm (ELX808 IU, Ultra Microplate Reader; Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.) y se interpoló este valor en una recta estándar realizada a partir de concentraciones conocidas de albúmina de suero bovino (BSA), ensayadas en el mismo momento y en las mismas condiciones que las muestras. Cada muestra y concentración de la curva estándar fue analizada por triplicado.

5.4 Ensayo de la actividad enzimática de TDO

La actividad enzimática de TDO se analizó siguiendo el protocolo descrito por Badawy y Evans [151] con ligeras modificaciones. El hígado fue diseccionado y seguidamente pesado en una balanza de precisión. A partir de este momento, las muestras permanecieron siempre en hielo. Cada porción de tejido se homogeneizó en proporción 1:5 (p/v) en tampón fosfato mediante la sonicación de la muestra por ultrasonidos durante 60 segundos a una amplitud del 30% y, seguidamente, el volumen obtenido se dividió en diferentes alícuotas. En todas ellas el homogenado se ensayó a una proporción de tejido 1:20 (p/v) y en presencia de una concentración de

7,5 mM de TRP, sustrato de TDO. En paralelo, a la mitad de las alícuotas correspondientes de cada muestra se les añadió además hematina, cofactor de TDO, a una concentración final de 2 μ M. Las muestras se incubaron en una atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37°C en agitación durante 60 min y, seguidamente, se detuvo la reacción con tricloroacético 0,09 M. Las muestras se centrifugaron a 16.000 x g durante 20 min a 4°C y el sobrenadante fue congelado a -80°C para su posterior análisis por HPLC siguiendo el mismo protocolo de detección y análisis de KYN descrito en el apartado 5.1.3. El ensayo fue realizado por triplicado para cada condición y muestra. Una vez realizado, se cuantificó la concentración de producto formado en cada muestra y se normalizó con la concentración de proteína presente en el homogenado medida con el protocolo descrito en el apartado 5.3.

En la figura 16 se muestra el esquema de la reacción enzimática producida durante la técnica.

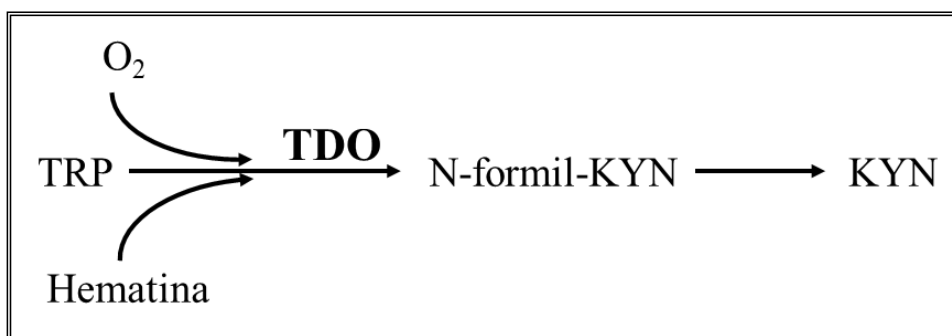


Figura 16: Reacción enzimática mediada por TDO en condiciones *ex vivo*. Kinurenina (KYN); N-formilkinurenina (N-formil-KYN); triptófano (TRP); triptófano 2,3 dioxigenasa (TDO).

5.5 Western blot

La determinación de la expresión de proteínas se llevó a cabo sobre las muestras procesadas de tejido hipocámpal y de tejido hepático.

Con el fin de desnaturalizar y provocar la pérdida de la estructura tridimensional de las proteínas, los extractos se diluyeron 3:1 en tampón de carga reductor (Tris-HCl 25 mM a pH 6,8; SDS 20%; glicerol 10%; β -mercaptoetanol 4% y azul de bromofenol) para el estudio de la expresión de las enzimas de la vía de kinurenina o en tampón de carga comercial (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) en proporción 1:1 para el estudio de la expresión de ARNT y de AhR tanto en extracto total como en extracto citosólico y nuclear y, posteriormente, se calentaron durante 5 min a 95°C. Se cargaron 20-30 μ g de proteínas procedentes del extracto total y 50 μ g de proteínas de los extractos citosólicos y nucleares en geles de SDS-poliacrilamida al 10%.

Tras la electroforesis, las proteínas del gel fueron transferidas con dos procedimientos diferentes en función de la proteína a analizar. Para el análisis de las enzimas de la vía de kinurenina se utilizaron membranas de PVDF y se transfirieron mediante transferencia semi-seca (Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System, Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). En el caso del estudio de la expresión de AhR y ARNT se emplearon membranas de nitrocelulosa y la transferencia de las proteínas fue llevada a cabo mediante transferencia húmeda, debido a su alto peso molecular (90-130 kDa), utilizando para ello un tampón compuesto de Tris-HCL 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% durante 2 h a 4 °C .

Para minimizar las uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon en TBST (Tris 0,5 M a pH 7,5; NaCl 1,5 M; Tween[®] 20 0,1%) con un 5% de leche desnatada o BSA, durante 1 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, para el reconocimiento de la proteína de interés, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios (tabla 2) diluidos en TBST durante 16 h a 4°C, en agitación suave. Tras los lavados en TBST, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa o conjugado con un marcador fluorescente (tabla 3). Para el estudio de la expresión total de las distintas proteínas o de su presencia en la fracción citoplasmática se utilizó la proteína β -actina como control de carga. Como control de carga y de pureza de los extractos nucleares se analizaron los niveles de expresión de HDAC-1.

La detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (ECL Western Blotting Detection Kit, o bien, ECL Plus™ Western blotting detection kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) que permite la oxidación catalizada del luminol por acción de la peroxidasa de rábano acoplada a los anticuerpos secundarios. La detección de la quimioluminiscencia emitida se realizó con el equipo de imagen Odyssey® (LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska, EEUU). Para la detección de la señal fluorescente se utilizó el mismo equipo en el rango infrarrojo cercano a una longitud de onda de 700 nm.

La cuantificación de la densidad de las bandas se realizó utilizando el programa Image J Software versión 1.42q (NIH, Bethesda, MD, EE.UU.). El valor de cada muestra se normalizó en referencia a la inmunorreactividad del control de carga correspondiente revelado en la misma membrana. Las siguientes tablas describen las principales características y condiciones de uso de los anticuerpos empleados:

Anticuerpo frente a	Especie	Dilución	Casa comercial	Bloqueo	
AhR	Receptor de hidrocarburos de arilo	Conejo	1:1.000	Novus Biologicals	Leche
ARNT	Traslocador nuclear del receptor de hidrocarburos de arilo	Conejo	1:1.000	Novus Biologicals	Leche
β-ACTINA	Subunidad β -actina	Ratón	1:10.000	Sigma-Aldrich	Leche
Catalasa	Catalasa	Conejo	1:5000	Abcam	Leche
HDAC-1	Histona deacetilasa-1	Conejo	1:1.000	Santa-Cruz	BSA
HO-1	Hemoxigenasa-1	Conejo	1:1000	Abcam	BSA
KAT II	Kinurenina aminotransferasa II	Ratón	1:500	Abcam	BSA
KMO	Kinurenina monooxigenasa	Conejo	1:1.000	Proteintech Eu.	BSA
IDO-1	Indolamina dioxigenasa-1	Conejo	1:1.000	Santa Cruz	BSA
TDO	Triptófano-2,3-dioxigenasa	Conejo	1:1.000	Aviva Systems Biology	BSA

Tabla 2. Se muestran los anticuerpos primarios empleados en la técnica del western blot.

5.6 Análisis de la expresión génica. RT-PCR cuantitativa

La determinación de la expresión génica del ARNm se llevó a cabo mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR; *quantitative polymerase chain reaction*) tras la conversión del ARN extraído del hipocampo en ADN complementario (ADNc). La técnica fue realizada en la Unidad de Genómica de la Fundación Parque Científico de Madrid, España.

Anticuerpo frente a	Detección	Especie	Dilución	Casa comercial
IgG de ratón	Conjugado con fluoróforo IRDye® 680RD	Cabra	1:10.000	LI-COR
IgG de ratón	Conjugado con HRP	Cabra	1:10.000	Merck-Millipore
IgG de conejo	Conjugado con HRP	Cabra	1:10.000	Merck-Millipore

Tabla 3. Se muestran los anticuerpos secundarios empleados en la técnica del western blot.

5.6.1 Retrotranscripción de ARN (RT)

La RT consiste en la síntesis de ADNc utilizando como molde el ARN obtenido de las muestras. En todos los casos se utilizó una cantidad fija de ARN (500 ng por muestra) diluido en agua Milli-Q al que se añadió una mezcla del kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) compuesta por su tampón correspondiente, cebadores aleatorios, desoxirribonucleótidos trifosfato y la enzima retrotranscriptasa (Multiscribe), esta última encargada de sintetizar ADNc a partir de ARN. Posteriormente, las muestras se sometieron a las siguientes condiciones térmicas: 37°C durante 60 min, 85°C durante 5 min utilizando para ello el termociclador GeneAmp PCR Systems 9700 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras de ADNc obtenidas fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior utilización.

5.6.2 qPCR

La qPCR es una variante de la PCR convencional que tiene la capacidad de amplificar el ADNc, mediante el empleo de una ADN polimerasa termoestable aislada de la bacteria *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa) y, simultáneamente,

cuantificar el producto de amplificación en tiempo real, permitiendo la medición de la expresión del ARNm del gen diana.

La cuantificación se realizó mediante la detección de la fluorescencia emitida por un fluoróforo excitado. Para ello se emplearon sondas TaqMan™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU) formadas por oligonucleótidos específicos con un fluoróforo (FAM, carboxifluoresceína, excitación en $\lambda = 495$ nm, emisión en $\lambda = 515$ nm) unido covalentemente al extremo 5' y un extintor de fluorescencia (*NFQ-MGB*) unido al extremo 3'.

Para llevar a cabo la técnica, se utilizaron 100 ng de ADNc de cada muestra disueltos en la mezcla comercial TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras, contenidas en placas de pocillo cónico libres de ARNasas y ADNasas, fueron introducidas en el aparato de amplificación y de detección AB fast-7900HT System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Primeramente, para inactivar las nucleasas y asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, las muestras se calentaron 2 min a 50°C y 10 min a 95°C. A continuación, se sometieron a 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95°C para la desnaturalización y 1 minuto a 60°C para la hibridación y elongación de la cadena de ADN. Para determinar los niveles de expresión génica, se calculó la diferencia entre el ciclo umbral (C_u , número de ciclos de amplificación necesarios para la detección del fluoróforo) de cada uno de los genes de estudio y el C_u de los genes de referencia, GAPDH y la subunidad ribosómica 18S en todos los casos, obteniéndose el ΔC_u de cada muestra. Posteriormente, los valores resultantes se normalizaron respecto a la media del ΔC_u del grupo control (ΔC_u de cada muestra – promedio ΔC_u grupo control = $\Delta \Delta C_u$). El valor obtenido en negativo se elevó a la potencia de 2 ($2^{-\Delta \Delta C_u}$). Las sondas empleadas para la determinación de los

distintos genes están descritas en la tabla 4.

	ARNm	Referencia
CYP1B1	Citocromo P450 1B1	Rn04219389_g1
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Rn01775763_g1
18S	Subunidad ribosómica 18S	Hs99999901_s1

Tabla 4. Se muestran las sondas Taqman utilizadas para la determinación de cada gen.

6. Medición de la temperatura rectal

La temperatura rectal de los animales se registró a distintos tiempos durante el desarrollo de los experimentos. Para establecer un valor de temperatura basal se obtuvieron mediciones a 1 hora, media hora y justo antes del tratamiento con MDMA. Después de la administración de la droga, se registró la temperatura a la media hora, y cada hora hasta el momento del sacrificio. En los experimentos llevados a cabo 24 h y 7 días después de la administración de MDMA, la temperatura rectal se midió durante las primeras 6 h tras 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 $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ y una precisión de $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. La sonda se introdujo 2,5 cm en el recto de la rata mientras que el animal era ligeramente inmovilizado con la mano. El procedimiento se realizó hasta que la medida de la temperatura rectal fue estable.

7. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el programa PRISM 5.0 (GraphPad Software Inc.). Se realizó una *t* de Student para comparar dos grupos y un test ANOVA de una sola vía, seguido de una prueba *post-hoc* de Newman-Keuls para comparar más de dos grupos, según procedía. El análisis de las temperaturas rectales se llevó a cabo mediante el test ANOVA de dos vías de medidas repetidas, considerando como variables el tiempo y el tratamiento y, a continuación, el post-test de Bonferroni. Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM) de un número variable de experimentos y se consideró como estadísticamente significativa un valor de *p* inferior a 0,05 ($P < 0,05$).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la vía de kinurenina

Para caracterizar los efectos de una única dosis neurotóxica de MDMA sobre la vía de kinurenina se analizaron las concentraciones de KYN, principal derivado de la vía de kinurenina, y de TRP, aminoácido precursor de su síntesis. El estudio se llevó a cabo en hipocampo, corteza frontal y plasma, lo que permitió determinar el estado de activación de la vía de kinurenina, a nivel central y periférico, tras la administración de la droga. Igualmente, con este fin también se analizó la expresión de las principales enzimas que participan en esta vía metabólica tanto en hipocampo como en hígado. Los niveles de 5-HT en hipocampo y corteza también fueron cuantificados con el fin de determinar el efecto que produce MDMA sobre el sistema serotoninérgico a diferentes tiempos.

1.1 Efecto de MDMA sobre la concentración de 5-HT, TRP y KYN en cerebro y plasma

En primer lugar, se llevó a cabo una curva temporal para determinar los niveles centrales y periféricos de 5-HT, TRP y KYN tras la administración intraperitoneal de una dosis de MDMA de 12,5 mg/kg.

El ANOVA de una vía mostró que la inyección de MDMA afecta significativamente a los niveles de 5-HT (figura 17) en hipocampo ($F_{5,52}=36,64$; $p<0,0001$) y corteza frontal ($F_{5,32}=41,43$; $p<0,0001$). El análisis *post-hoc* reveló una disminución significativa de los niveles del neurotransmisor respecto al grupo tratado con vehículo a todos los tiempos analizados tanto en hipocampo (1 h: 37%; 3 h: 48%; 6

h: 67%; 24 h: 49%; 7 días: 62% vs. vehículo) como en corteza frontal (1 h: 21%; 3 h: 72%; 6 h: 79%; 24 h: 56%; 7 días: 50% vs. vehículo).

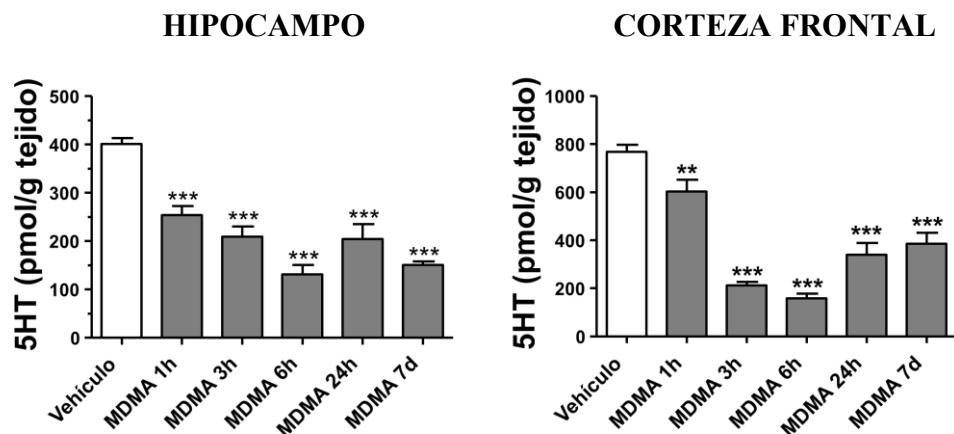


Figura 17. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la concentración de 5-HT en hipocampo y corteza frontal. Se muestran las concentraciones de 5-HT en hipocampo y corteza frontal analizadas a diferentes tiempos tras la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg). Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=4-17). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto al vehículo.

El análisis de la concentración de TRP (figura 18 A), precursor en la síntesis de serotonina, mediante el ANOVA de una vía mostró igualmente cambios significativos tras la administración de la droga tanto en hipocampo ($F_{5,53}=14,37$; $p < 0,0001$) como en corteza frontal ($F_{5,33}=49,61$; $p < 0,0001$). En concreto, tras realizar la comparación múltiple mediante el test Newman-Keuls, se observó un incremento a 1 y 3 h en hipocampo (66% y 72% vs. vehículo, respectivamente) recuperando niveles basales 6 h después de la administración de la droga. En corteza frontal, este mismo análisis estadístico reveló un aumento a 1, 3 y 6 h (83%, 56% y 22% vs. vehículo, respectivamente) reestableciéndose los niveles basales 24 h después del tratamiento. Sin embargo, el ANOVA no mostró un efecto de MDMA sobre los niveles plasmáticos de TRP a ninguno de los tiempos analizados ($F_{5,56}=4,87$;

$p < 0,0009$).

Por otro lado, este mismo análisis reveló cambios significativos en los niveles de KYN (figura 18 B) tras la administración de la droga en hipocampo ($F_{5,55}=24,20$; $p < 0,0001$), corteza frontal ($F_{5,32}=16,53$; $p < 0,0001$) y plasma ($F_{5,54}=16,92$; $p < 0,0001$). Empleando el test Newman-Keuls, los datos mostraron un aumento de la concentración de KYN a 1, 3 y 6 h en hipocampo (56%, 125% y 113% vs. vehículo, respectivamente), a 3 y 6 h en corteza frontal (50% y 104%, respectivamente) y a 1, 3 y 6 h en plasma (44%, 92% y 60% vs. vehículo, respectivamente).

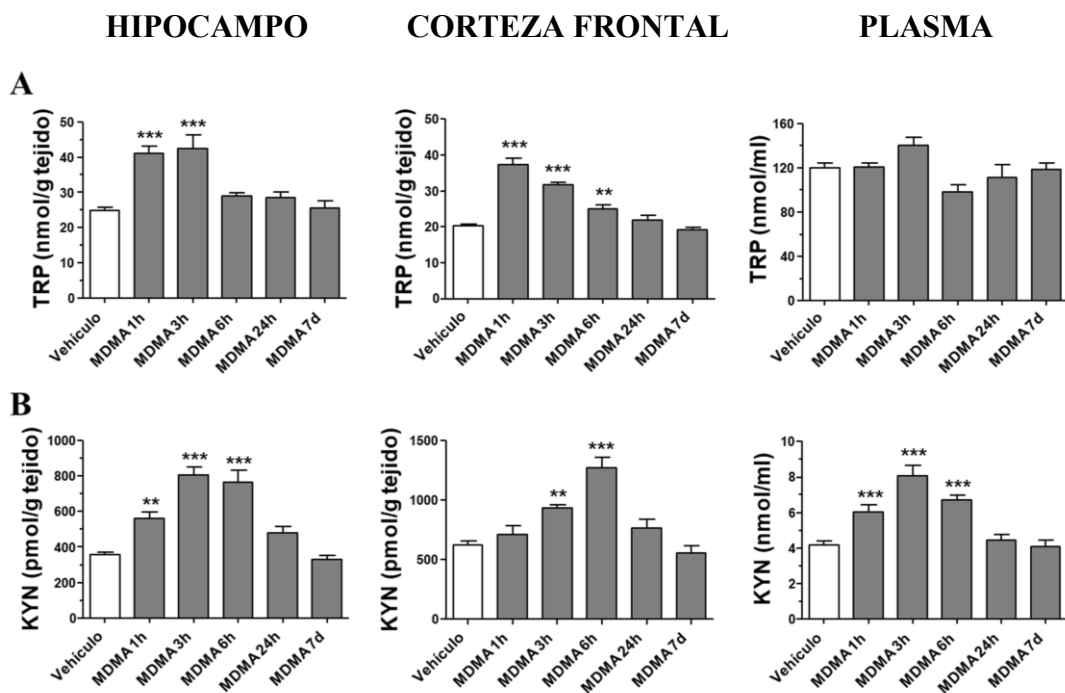


Figura 18. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre las concentraciones de TRP y KYN en hipocampo, corteza frontal y plasma. Se muestran las concentraciones de (A) TRP y (B) KYN en hipocampo, corteza frontal y plasma analizadas a diferentes tiempos tras la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg). Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=4-17). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto al vehículo.

1.2 Efecto de MDMA sobre la actividad y la expresión de las principales enzimas que participan en la vía de kinurenina

La metabolización inicial del TRP a través de la vía de kinurenina está mediada por dos enzimas con distinta regulación, TDO e IDO, que pueden actuar como un factor limitante en la activación de la vía. El producto formado a partir del TRP mediante la acción de estas dos enzimas es la KYN, la cual a su vez puede ser metabolizada principalmente por 2 proteínas distintas, KAT y KMO. Ambas enzimas generan, a partir de KYN, metabolitos que también pueden estar implicados en la regulación de la función neuronal, como KYNA y QUINA [12] (figura 19).

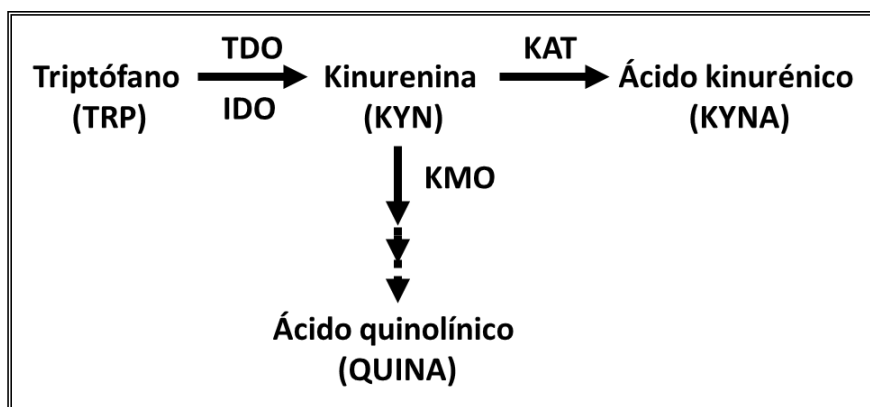


Figura 19. Resumen esquemático de la vía de kinurenina. Se muestran los principales metabolitos y enzimas presentes en la vía de kinurenina. *Indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO)*; *kinurenina aminotransferasa (KAT)*; *kinurenina monooxigenasa (KMO)*; *triptófano 2,3 dioxigenasa (TDO)*.

Para analizar la expresión de las principales enzimas que participan en la vía de kinurenina a nivel central, se empleó el hipocampo como región de estudio. Además, se analizó la expresión de estas proteínas en hígado, por ser éste el principal tejido periférico responsable de la metabolización del TRP a través de esta vía.

1.2.1 Efecto de MDMA sobre la expresión y la actividad enzimática de TDO

La enzima TDO es capaz de regular las concentraciones de TRP mediante la oxidación de este aminoácido en KYN [207]. Se expresa mayoritariamente en hígado, principal tejido responsable de la producción de KYN a nivel periférico, no obstante, otros tejidos como el cerebro también expresan esta enzima en menor proporción [146, 147, 313]. Con el fin de determinar el posible efecto de MDMA sobre la expresión de esta enzima, se emplearon hipocampo e hígado extraídos a diferentes tiempos tras la administración de la droga.

El análisis estadístico de los datos obtenidos mediante el ANOVA de una vía no reveló diferencias significativas en la expresión de TDO (figura 20) tras la administración de MDMA en ninguno de los dos tejidos analizados con respecto al grupo vehículo (hipocampo: $F_{3,18}=1,26$; $p=0,3183$ e hígado: $F_{2,20}=0,40$; $p=0,6782$).

La actividad de TDO puede verse modulada principalmente por dos factores: la disponibilidad de TRP y la presencia de grupos hemo durante la reacción. Ambos parámetros determinan el estado de activación de la enzima TDO, pudiendo establecer una conformación de apoenzima o de holoenzima. La apoenzima, o estado enzimático de menor actividad, es la forma en la cual se encuentra basalmente. Sin embargo, en presencia de hematina, la TDO es capaz de transformarse en su forma holoenzima, el estado enzimático de máxima activación que supone un incremento del 50% de su actividad con respecto a la apoenzima [151].

Para analizar si el tratamiento con MDMA produce un efecto sobre la actividad de TDO en hígado, se realizó un ensayo enzimático *ex vivo* en condiciones de sustrato (TRP) a saturación en presencia o en ausencia del cofactor hematina, responsable del cambio conformacional de la forma apoenzima a la forma holoenzima.

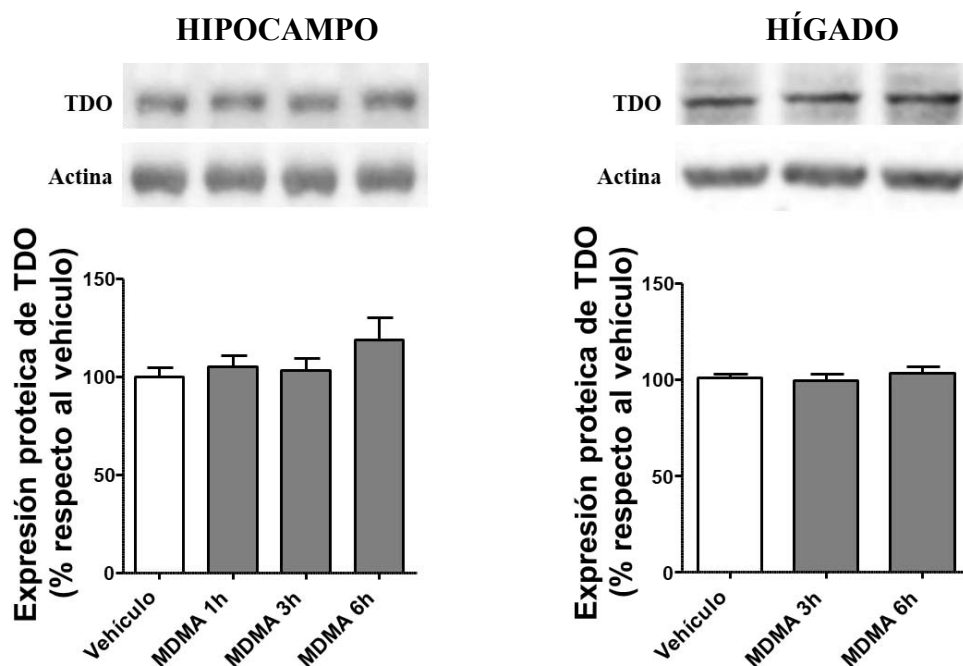


Figura 20. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la expresión de la enzima TDO en hipocampo e hígado. Se muestran imágenes representativas y el análisis densitométrico de la expresión de la proteína TDO en hipocampo e hígado a diferentes tiempos tras la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg). Como control de carga se utilizó la expresión de β -actina. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al vehículo y se representan como la media \pm EEM ($n=5-11$). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía.

El ANOVA de una vía mostró diferencias significativas en los niveles de KYN presentes en los homogenados de hígado obtenidos tras el ensayo enzimático de TDO (figura 21) tanto en su forma de apoenzima ($F_{2,20}=11,83$; $p=0,0004$) como de holoenzima ($F_{2,16}=14,58$; $p=0,0002$). El post-test Newman-Keuls reveló un incremento de la actividad de TDO hepática en su forma de apoenzima y de holoenzima en las ratas tratadas con MDMA a 3 (106% y 105% vs. vehículo, respectivamente) y 6 h (223% y 72% vs. vehículo, respectivamente).

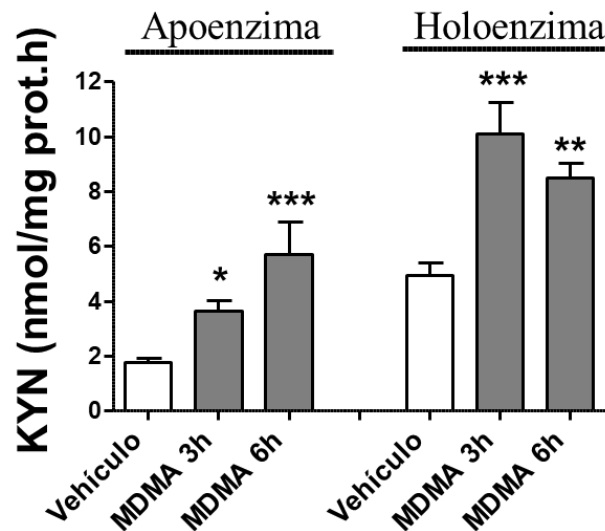


Figura 21. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la actividad enzimática de TDO en hígado. Se muestra la actividad de la TDO en hígado determinada 3 y 6 h después de la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg) mediante la cuantificación de la concentración de KYN producida durante el ensayo enzimático. Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=4-11). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * p <0,05; ** p <0,01 y *** p <0,001 respecto al vehículo.

Para determinar la contribución de TDO e IDO-1 en la formación de kinurena durante el ensayo, se emplearon inhibidores de la actividad enzimática de estas dos proteínas, los compuestos 680C91 y 1-metil-triptófano (1-MT), respectivamente.

El ANOVA de una vía reveló un efecto sobre los niveles de KYN tras el tratamiento con 680C91 ($F_{2,3}=18,79$; $p=0,0201$). El análisis post-test mostró una disminución de la concentración de KYN en los homogenados expuestos a las concentraciones de 5 y 50 μ M (36% y 62% vs. vehículo, respectivamente). Sin embargo, el ANOVA de una vía no mostró cambios significativos en los homogenados tratados con 1-MT ($F_{2,3}=1,68$; $p=0,3245$), confirmando que la enzima TDO es la principal responsable de la producción de KYN durante el ensayo. Los datos del ensayo enzimático se muestran en la tabla 5.

Concentración de KYN (nmol/h/mg de proteína)			
Inhibidor (μM)	0	5	50
680C91	1,83	1,17*	0,69*
1-MT	1,75	1,55	1,63

Tabla 5. Efecto de la inhibición de las enzimas TDO e IDO-1 sobre la concentración de KYN obtenida durante el ensayo enzimático en hígado. Los homogenados de hígado fueron incubados con los inhibidores de TDO (680C91) e IDO-1 (1-MT) a diferentes concentraciones (5 y 50 μM) o con sus vehículos y, seguidamente, fueron ensayados para determinar la cantidad de KYN producida en estas condiciones. Los niveles de KYN obtenidos fueron expresados en nmol/h/mg de proteína. Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=2). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * $p < 0,05$ respecto al vehículo.

1.2.2 Efecto de MDMA sobre la expresión de la enzima IDO-1

La proteína IDO es otra de las enzimas que participa en la oxidación del TRP en KYN. Existen dos isoformas de esta proteína, IDO-1 e IDO-2 [314]. Dado que IDO-1 contribuye en mayor medida a la metabolización del TRP [163, 164], se analizó la implicación de esta isoforma en los cambios producidos por MDMA. IDO-1 es una enzima monomérica que se expresa de forma ubicua en todo el organismo, aunque su expresión está ligada a la presencia de citoquinas proinflamatorias y a fenómenos de estrés oxidativo [168, 169, 315].

El ANOVA de una vía reveló que la administración de MDMA no modificó la expresión de IDO-1 (figura 22) en hipocampo ($F_{3,18}=1,30$; $p=0,3063$) e hígado ($F_{2,20}=2,60$; $p=0,0996$).

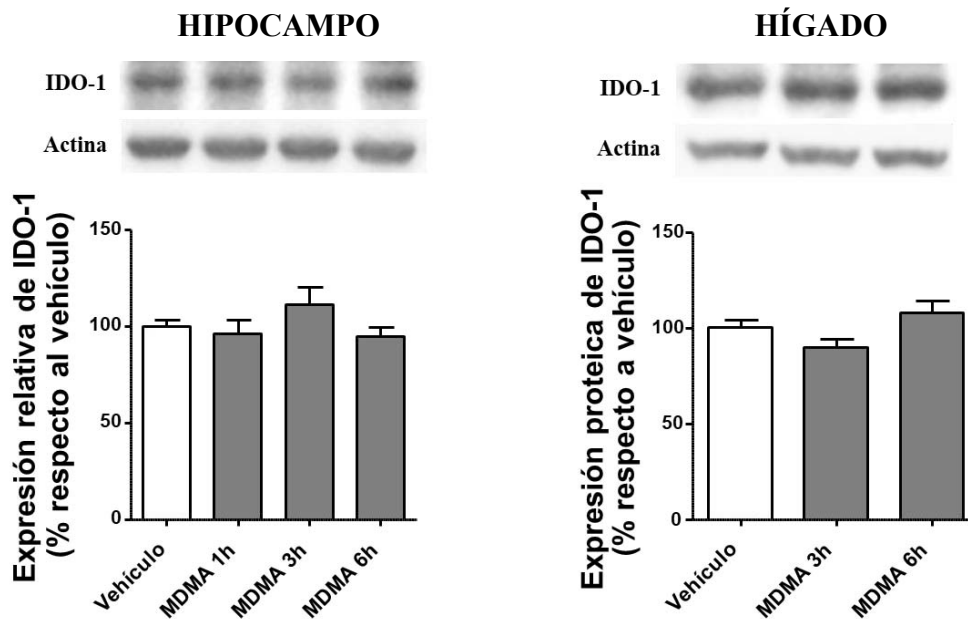


Figura 22. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la expresión de la enzima IDO-1 en hipocampo e hígado. Se muestran imágenes representativas y el análisis densitométrico de la expresión de la proteína IDO-1 en hipocampo e hígado a diferentes tiempos tras la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg). Como control de carga se utilizó la expresión de β -actina. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al vehículo y se representan como la media \pm EEM (n=5-11). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía.

1.2.3 Efecto de MDMA sobre la expresión de las enzimas KMO y KAT II

La enzima KMO participa en la principal ruta de metabolización de KYN. Esta proteína heterodimérica [171] se expresa tanto en periferia, como en el SNC, principalmente en microglía, donde estímulos inflamatorios pueden promover un incremento de su expresión [173].

El ANOVA de una vía no reveló diferencias en la expresión de KMO (figura 23) en hipocampo ($F_{3,18}=0,46$; $p=0,7173$). Sin embargo, este análisis estadístico sí mostró cambios en la expresión de KMO en el hígado ($F_{2,19}=11,57$; $p=0,0005$) tras la administración de MDMA. El post-test de comparación múltiple Newman-Keuls reveló un ligero incremento 3 h después de la inyección de MDMA (14%) y una

disminución 6 h después (12%) respecto al vehículo.

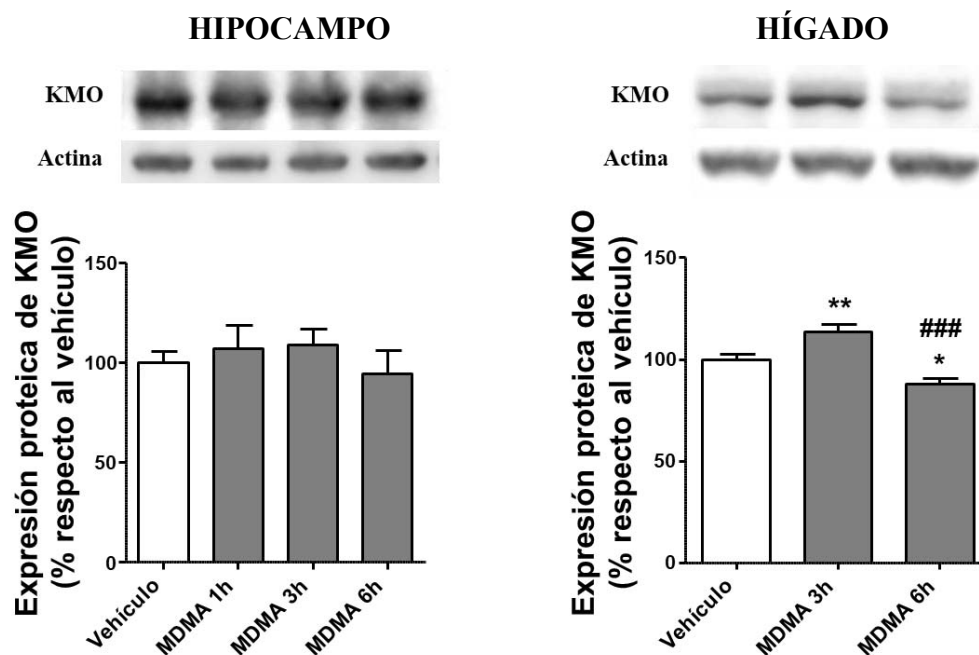


Figura 23. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la expresión de la enzima KMO en hipocampo e hígado. Se muestran imágenes representativas y el análisis densitométrico de la expresión de la proteína KMO en hipocampo e hígado a diferentes tiempos tras la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg). Como control de carga se utilizó la expresión de β -actina. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al vehículo y se representan como la media \pm EEM (n=5-11). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto al vehículo.

La enzima KAT es un homodímero que cataliza la transaminación irreversible de la KYN. Existen cuatro isoformas (I, II, III, IV), sin embargo, KAT II es la enzima mayoritaria presente en el cerebro tanto de humanos como de rata [146, 148, 173]. La expresión de KAT II puede ser regulada por estímulos inflamatorios [183]; además, se ha observado que su actividad puede verse incrementada por un aumento de la concentración de KYN disponible o por una disminución de la actividad de KMO [157, 316].

El análisis estadístico mediante el ANOVA de una vía no reveló diferencias significativas en la expresión de KAT II (figura 24) ni en hipocampo ($F_{3,18}=1,34$; $p=0,2933$) ni en hígado ($F_{2,19}=0,42$; $p=0,6654$) tras la administración de MDMA.

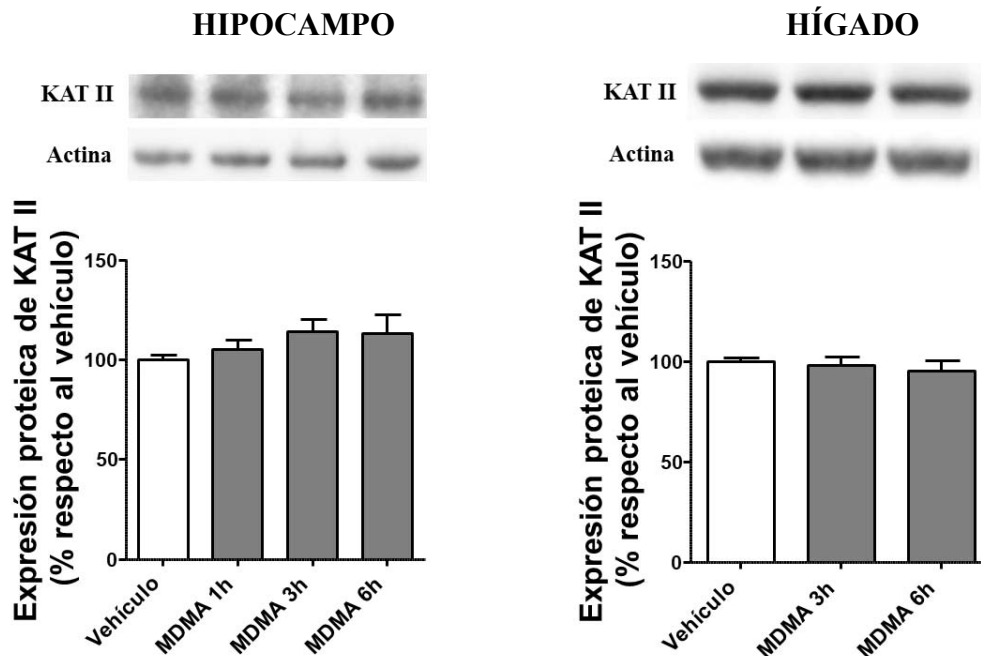


Figura 24. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la expresión de la enzima KAT II en hipocampo e hígado. Se muestran imágenes representativas y el análisis densitométrico de la expresión de la proteína KAT II en hipocampo e hígado a diferentes tiempos tras la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg). Como control de carga se utilizó la expresión de β -actina. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al vehículo y se representan como la media \pm EEM ($n=5-10$). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía.

2. Papel de las principales enzimas de la vía de kinurenina en la neurotoxicidad inducida por MDMA

Con el fin de estudiar si la vía de kinurenina participa en la neurotoxicidad producida por MDMA, se utilizaron diferentes compuestos capaces de inhibir o promover la actividad de las diferentes enzimas que participan en esta ruta metabólica.

2.1 Efecto de la inhibición de la enzima TDO sobre los cambios inducidos por MDMA

Con el fin de dilucidar si la enzima TDO participa en la neurotoxicidad producida por MDMA en nuestro modelo experimental, se administró intraperitonealmente un inhibidor específico de esta enzima, 680C91 (figura 25), 30 minutos antes de la droga empleando una dosis de 10 mg/kg [304].

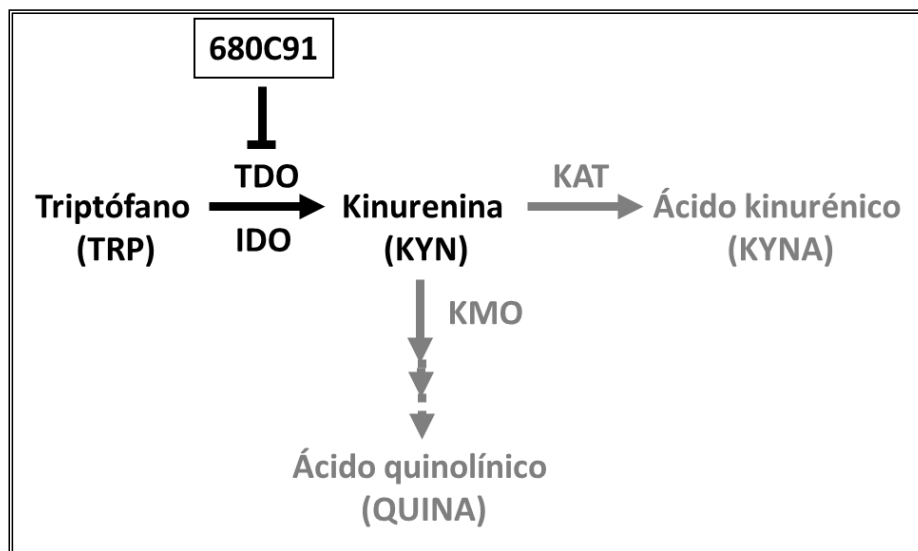


Figura 25. Representación esquemática de la acción del inhibidor 680C91 sobre la vía de kinurenina. Se muestra el efecto inhibitorio de 680C91 sobre la enzima TDO responsable de la transformación del TRP en KYN. *Indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO)*; *kinurenina aminotransferasa (KAT)*; *kinurenina monooxigenasa (KMO)*; *triptófano 2,3 dioxigenasa (TDO)*.

2.1.1 Efecto de la inhibición de TDO sobre los niveles de TRP y KYN observados tras la administración de MDMA

Se analizó la concentración hipocámpica y plasmática de TRP y KYN resultante de la administración del inhibidor 680C91 y MDMA en ratas, 3 h después de la inyección de la droga.

El ANOVA de una vía reveló que la administración de los compuestos produce un efecto significativo en la concentración de TRP (figura 26 A) tanto en hipocampo ($F_{3,15}=10,60$; $p=0,0005$) como en plasma ($F_{3,36}=22,66$; $p<0,0001$). El análisis post-test mediante Newman-Keuls mostró que el pretratamiento con 680C91 incrementó los niveles de TRP 3 h después de la inyección de la droga en hipocampo y en plasma (60% y 65% de incremento *vs.* MDMA, respectivamente). Además, se observó que la administración de 680C91 previo a la administración del vehículo incrementó los niveles de TRP respecto al grupo vehículo tanto en hipocampo (78%) como en plasma (70%).

Paralelamente, el análisis de la concentración de KYN (figura 26 B) mediante el ANOVA de una vía mostró un efecto tanto en hipocampo ($F_{3,14}=10,09$; $p=0,0008$) como en plasma ($F_{3,34}=17,05$; $p<0,0001$) entre los grupos experimentales. El post-test de comparación múltiple reveló que el inhibidor fue capaz de prevenir el aumento en la concentración de KYN inducido por MDMA tanto a nivel central como en periferia (45% y 51% de disminución *vs.* MDMA, respectivamente).

2.1.2 Efecto de la inhibición de TDO sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA

El estudio de la neurotoxicidad se llevó a cabo mediante la técnica de autorradiografía a través del marcaje específico de los SERT con citalopram marcado radiactivamente con tritio. La densidad de los transportadores presentes en hipocampo y corteza frontal refleja el efecto neurotóxico producido por los tratamientos [4, 5, 130, 134].

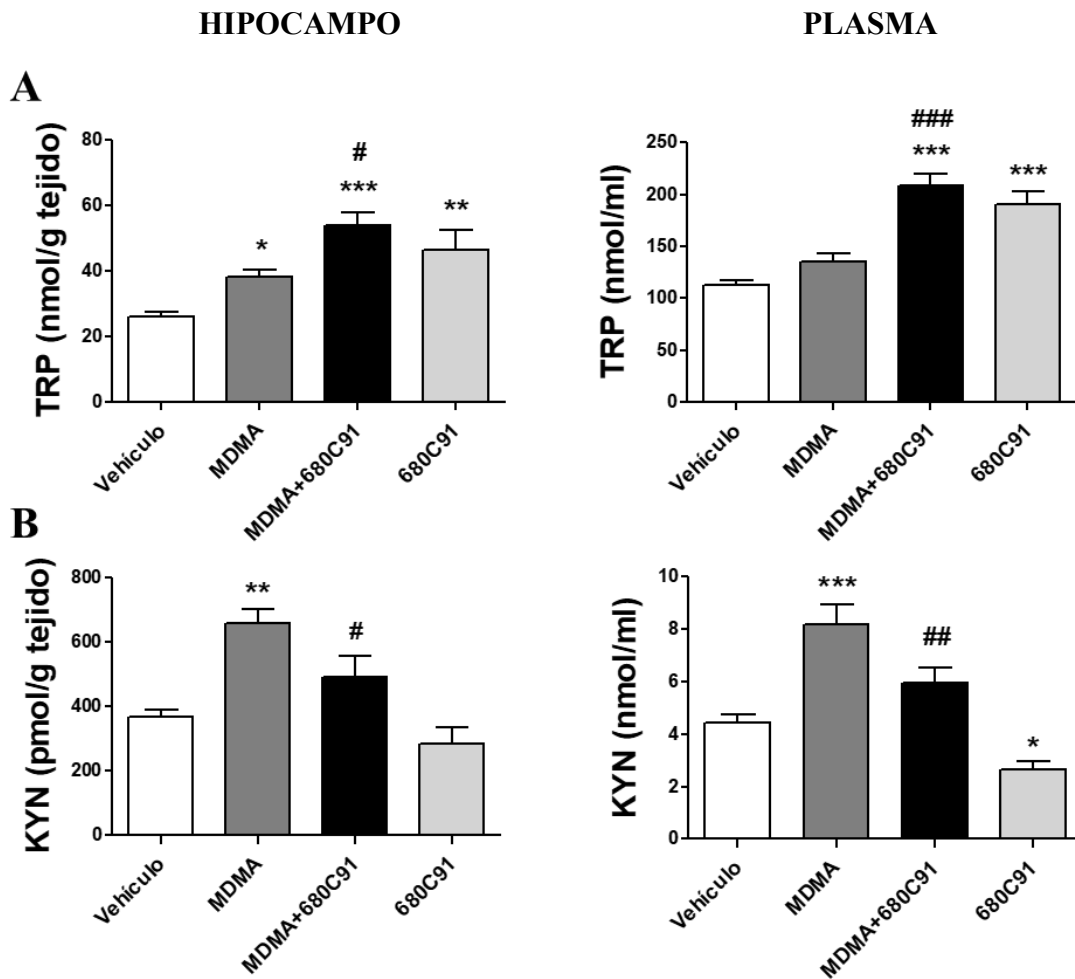


Figura 26. Efecto de la inhibición de TDO sobre las concentraciones de TRP y KYN observadas en hipocampo y plasma 3 h después de la administración de MDMA. Se muestran las concentraciones de (A) TRP y (B) KYN en hipocampo y plasma de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y 680C91 (10 mg/kg; i.p.) analizadas 3 h después de la administración de la droga. Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=4-11). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * p <0,05; ** p <0,01 y *** p <0,001 respecto a vehículo; # p <0,05; ## p <0,01 y ### p <0,001 respecto a MDMA.

El ANOVA de una vía reveló cambios en la densidad de los SERT (figura 27) entre los grupos experimentales en hipocampo ($F_{3,20}=22,75$; p <0,0001) y corteza frontal ($F_{3,20}=27,47$; p <0,0001). El post-test de Newman-Keuls mostró una disminución de la densidad de los SERT en ambas áreas cerebrales 7 días después del tratamiento con MDMA respecto a los animales que recibieron vehículo (hipocampo: 42% y

corteza frontal: 24% vs. vehículo). Este efecto inducido por la droga fue potenciado por el pretratamiento con el inhibidor de TDO, aumentando la neurotoxicidad que produce MDMA en hipocampo y corteza frontal (20% y 18% de disminución de la densidad de los SERT vs. MDMA, respectivamente). Sin embargo, el grupo control tratado con el inhibidor de TDO no mostró cambios en la densidad de los SERT al compararlo con el grupo vehículo en ninguna de las áreas de estudio.

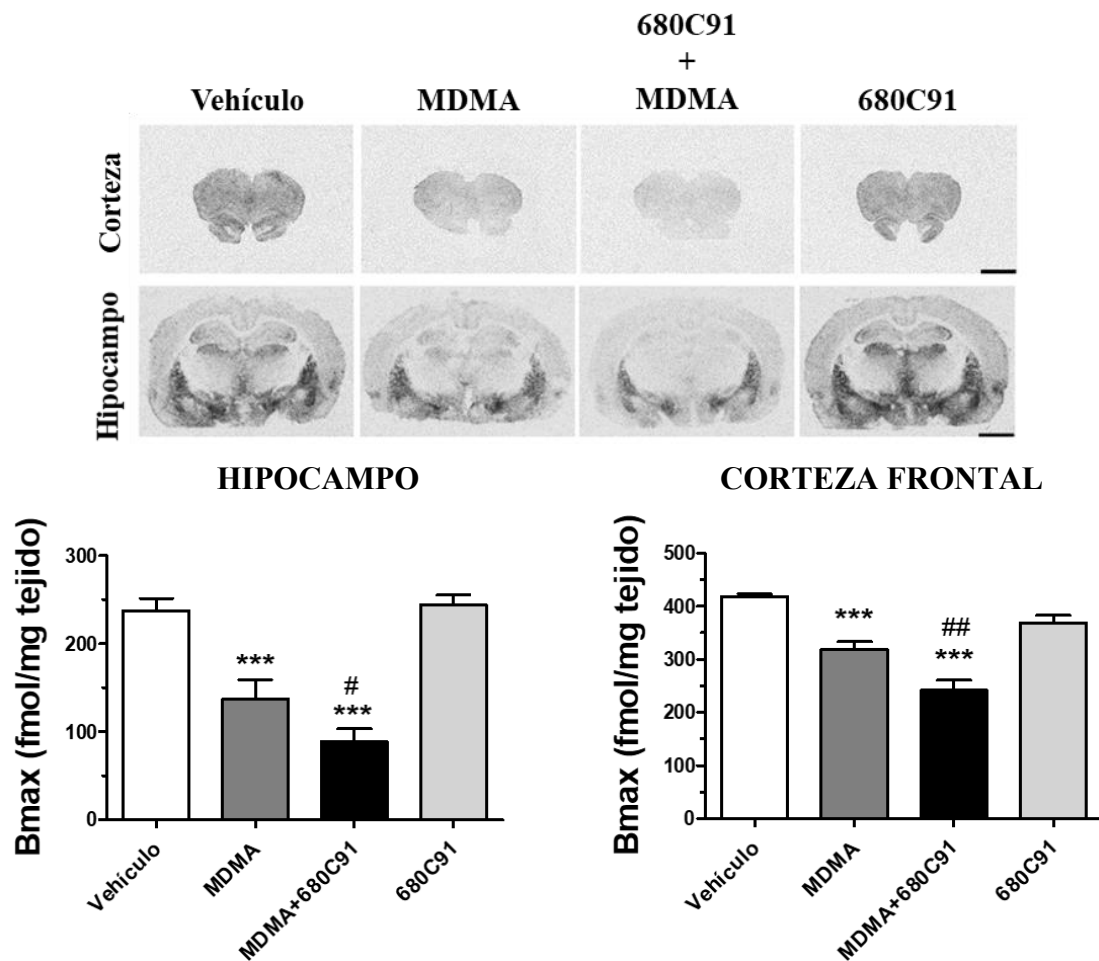


Figura 27. Efecto de la inhibición de TDO sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA en hipocampo y corteza frontal. Se muestran los autorradiogramas representativos y la cuantificación de la fijación de [³H]citalopram en hipocampo y corteza frontal de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y 680C91 (10 mg/kg; i.p.) analizada 7 días después de la administración de los compuestos. Barra = 2 mm. Los resultados se representan como la media ± EEM (n=6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como ****p*<0,001 respecto vehículo; #*p*<0,05 y ##*p*<0,01 respecto a MDMA.

2.1.3 Efecto de la inhibición de TDO sobre la hipertermia producida por MDMA

Debido a que la hipertermia generada por MDMA a corto plazo participa en el mecanismo de neurotoxicidad, se realizaron mediciones de la temperatura rectal de los grupos experimentales durante las primeras horas del experimento.

El ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del factor tiempo ($F_{2,40} = 48,70$; $p < 0,001$) pero no del tratamiento ($F_{3,20} = 3,03$; $p = 0,0532$) en las medidas basales de temperatura rectal. En el resto de medidas determinadas tras la inyección de MDMA, el análisis mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,20} = 84,16$; $p < 0,001$), tiempo ($F_{6,120} = 63,63$; $p < 0,001$) y la interacción entre ambos factores ($F_{18,120} = 6,55$; $p < 0,001$). El post-test Bonferroni mostró un aumento de la temperatura rectal correspondiente a los animales que fueron administrados con MDMA. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor 680C91 no modificó el efecto hipertérmico inducido por MDMA (figura 28).

2.2 Efecto de la administración de una dosis de L-kinurenina sobre los cambios inducidos por MDMA

Con el fin de elucidar si la kinurenina participa en el mecanismo de neurotoxicidad inducida por MDMA, previamente a la inyección de la droga, se administró una dosis exógena de L-kinurenina (100 mg/kg) junto con probenecid (50 mg/kg) por vía intraperitoneal [213]. El probenecid tiene como objetivo el bloqueo de los transportadores OAT presentes en la BHE lo que dificulta la salida de los metabolitos de la vía de kinurenina del SNC [192].

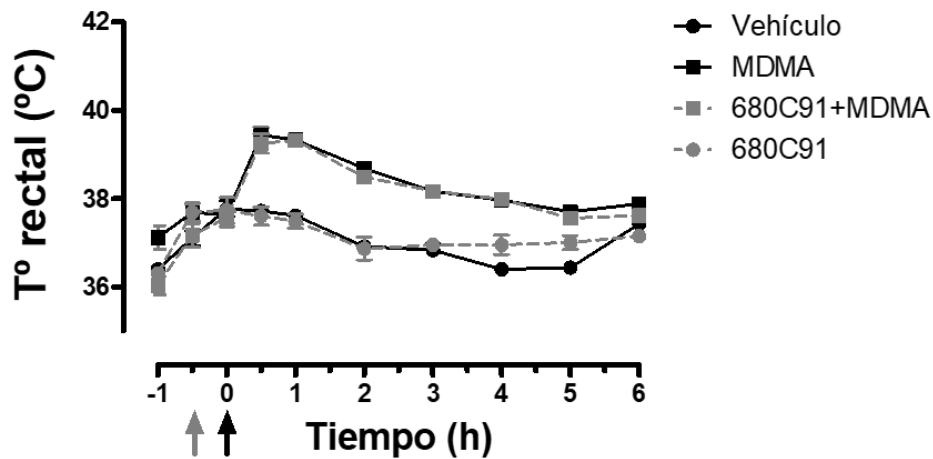


Figura 28. Efecto de la inhibición de TDO sobre la hipertermia producida por MDMA.

Se muestran las curvas de las temperaturas rectales obtenidas de cada uno de los grupos experimentales a diferentes tiempos. Las flechas indican el momento de la administración de 680C91 (gris; 10 mg/kg; i.p.) y de MDMA (negra; 12,5 mg/kg; i.p.). Los resultados se representan como la media \pm EEM ($n=6$). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferoni.

2.2.1 Efecto de la administración de una dosis de L-kinurenina sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA

El ANOVA de una vía mostró un efecto de los diferentes tratamientos sobre la densidad de los SERT (figura 29) entre los grupos experimentales en hipocampo ($F_{6,62}=58,98$; $p<0,0001$) y en corteza frontal ($F_{4,51}=37,82$; $p<0,0001$). El análisis mediante el test de Newman-Keuls reveló que el tratamiento con L-kinurenina y probenecid previno parcialmente la neurotoxicidad inducida por MDMA tanto en hipocampo como en corteza frontal 7 días después de la administración de los compuestos (29% y 14% de incremento de la densidad de los SERT vs. MDMA, respectivamente). Sin embargo, no se observó un efecto sobre la neurotoxicidad producida por la droga en aquellos animales que recibieron probenecid o L-kinurenina de forma independiente en ninguna de las áreas cerebrales de estudio.

2.2.2 Efecto de la administración de L-kinurenina y probenecid sobre la hipertermia producida por MDMA

Se realizaron mediciones de la temperatura rectal de los grupos experimentales durante las primeras horas del experimento con el fin de comprobar si los compuestos administrados alteraban la hipertermia manifestada tras la inyección de MDMA.

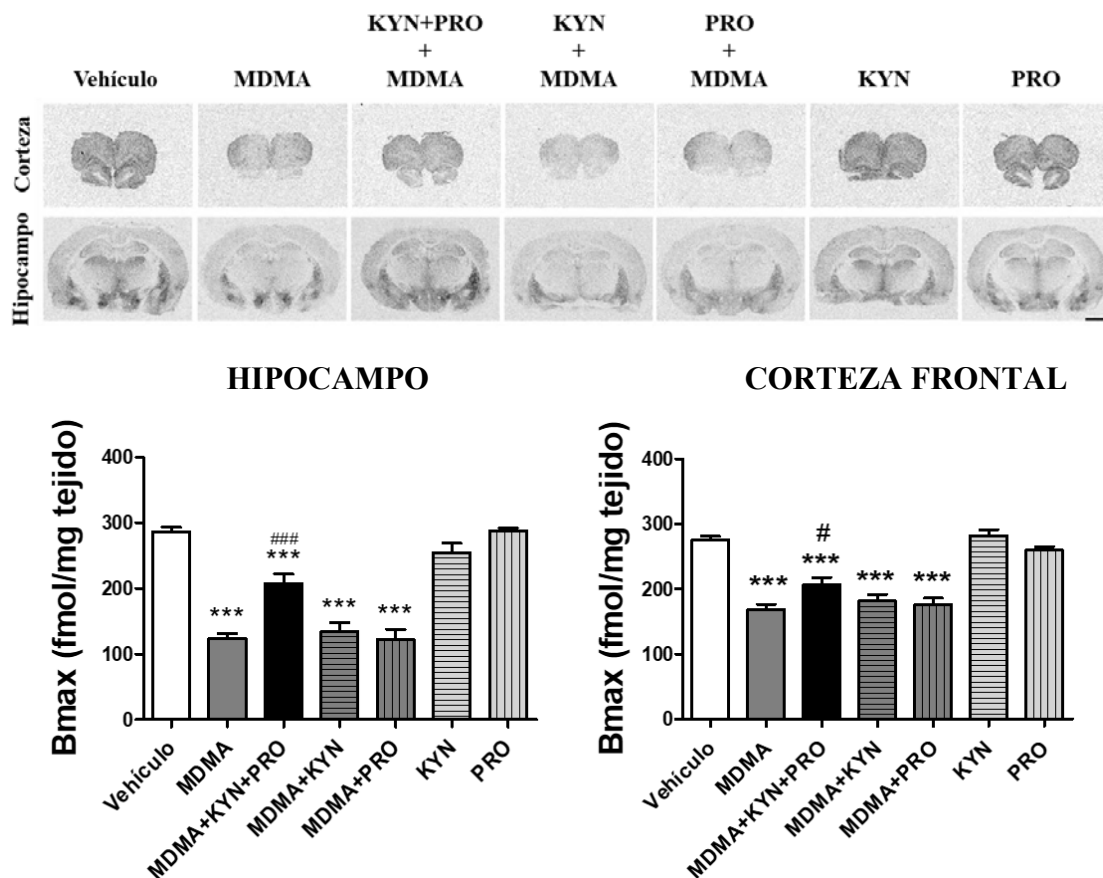


Figura 29. Efecto de la administración de una dosis de L-kinurenina y probenecid sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA en hipocampo y corteza frontal. Se muestran los autorradiogramas representativos y la cuantificación de la fijación de [³H]citalopram en hipocampo y corteza frontal de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.), L-kinurenina (100 mg/kg; i.p.) y probenecid (50 mg/kg; i.p.) analizada 7 días después de la administración de los compuestos. Barra = 2 mm. Los resultados se representan como la media ± EEM (n=5-20). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como *** $p < 0,001$ respecto vehículo; # $p < 0,001$ y ### $p < 0,001$ respecto a MDMA.

El ANOVA de dos vías reveló un efecto significativo del factor tiempo ($F_{2,42} = 15,61$; $p < 0,0001$) pero no del tratamiento ($F_{3,21} = 0,34$; $p = 0,7963$) en las medidas basales de temperatura rectal. En el resto de medidas determinadas tras la inyección de MDMA, el análisis mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,21} = 76,87$; $p < 0,0001$), tiempo ($F_{6,126} = 9,92$; $p < 0,0001$) y la interacción entre ambos factores ($F_{18,126} = 6,54$; $p < 0,0001$). El post-test Bonferroni mostró un aumento de la temperatura rectal correspondiente a los animales que fueron administrados con MDMA. Sin embargo, el análisis post-test no mostró un efecto de los tratamientos sobre la hipertermia inducida por MDMA (figura 30).

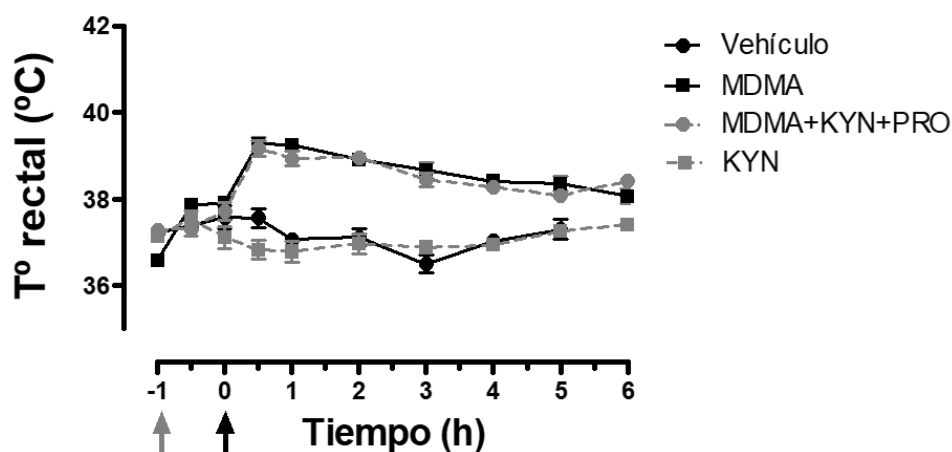


Figura 30. Efecto de la administración de una dosis de L-kinurenina y probenecid sobre la hipertermia producida por MDMA. Se muestran las curvas de las temperaturas rectales obtenidas de cada uno de los grupos experimentales a diferentes tiempos. Las flechas indican el momento de la administración de los compuestos L-kinurenina y probenecid (gris; KYN: 100 mg/kg y PRO: 50 mg/kg; i.p.) y MDMA (negra; 12,5 mg/kg; i.p.). Los resultados se representan como la media \pm EEM ($n=6-7$). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni.

2.3 Efecto de la inhibición de IDO-1 en los cambios inducidos por MDMA

Para estudiar si la IDO-1 está involucrada en las alteraciones que produce MDMA sobre la vía de kinurenina (figura 31), se utilizó el inhibidor específico INCB-024360 [305] el cual fue administrado intraperitonealmente 1 h antes de la inyección de MDMA.

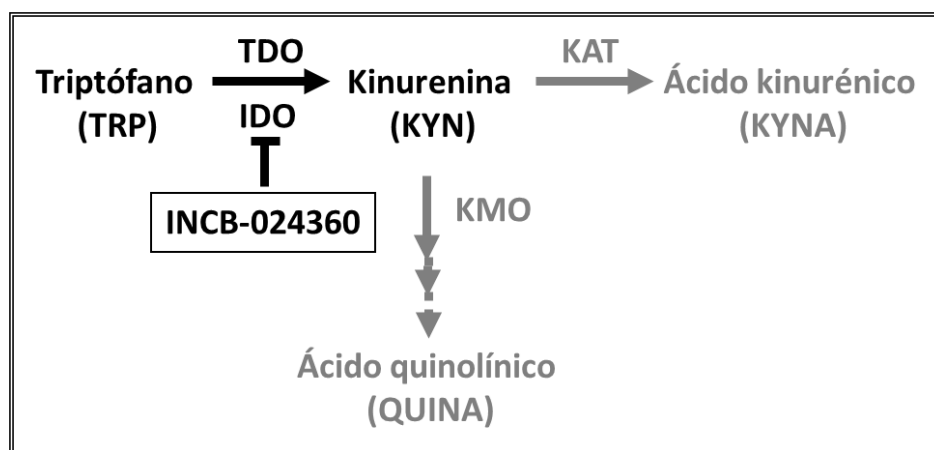


Figura 31. Representación esquemática de la acción del inhibidor INCB-024360 sobre la vía de kinurenina. Se muestra el efecto inhibitorio de INCB-024360 sobre la enzima IDO responsable de la transformación del TRP en KYN. *Indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO)*; *kinurenina aminotransferasa (KAT)*; *kinurenina monooxigenasa (KMO)*; *triptófano 2,3 dioxigenasa (TDO)*.

2.3.1 Efecto de la inhibición de IDO-1 sobre los niveles de TRP y KYN observados tras la administración de MDMA

Se analizaron las concentraciones de TRP y KYN resultantes de la coadministración del inhibidor INCB-024360 y MDMA en hipocampo y plasma, 6 h después de la inyección de la droga.

El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas en las concentraciones de TRP y KYN tras la administración de ambos tratamientos (figura 32) tanto a nivel central (TRP: $F_{3,20}=6,52$; $p=0,003$ y KYN: $F_{3,17}=8,28$; $p=0,0013$) como a nivel

periférico (KYN: $F_{3,19}=10,54$; $p=0,0003$). Sin embargo, el test de comparación múltiple indicó que el tratamiento con el inhibidor de la IDO-1 previo a la administración de MDMA no modificó los niveles de TRP y KYN observados tras la administración de la droga.

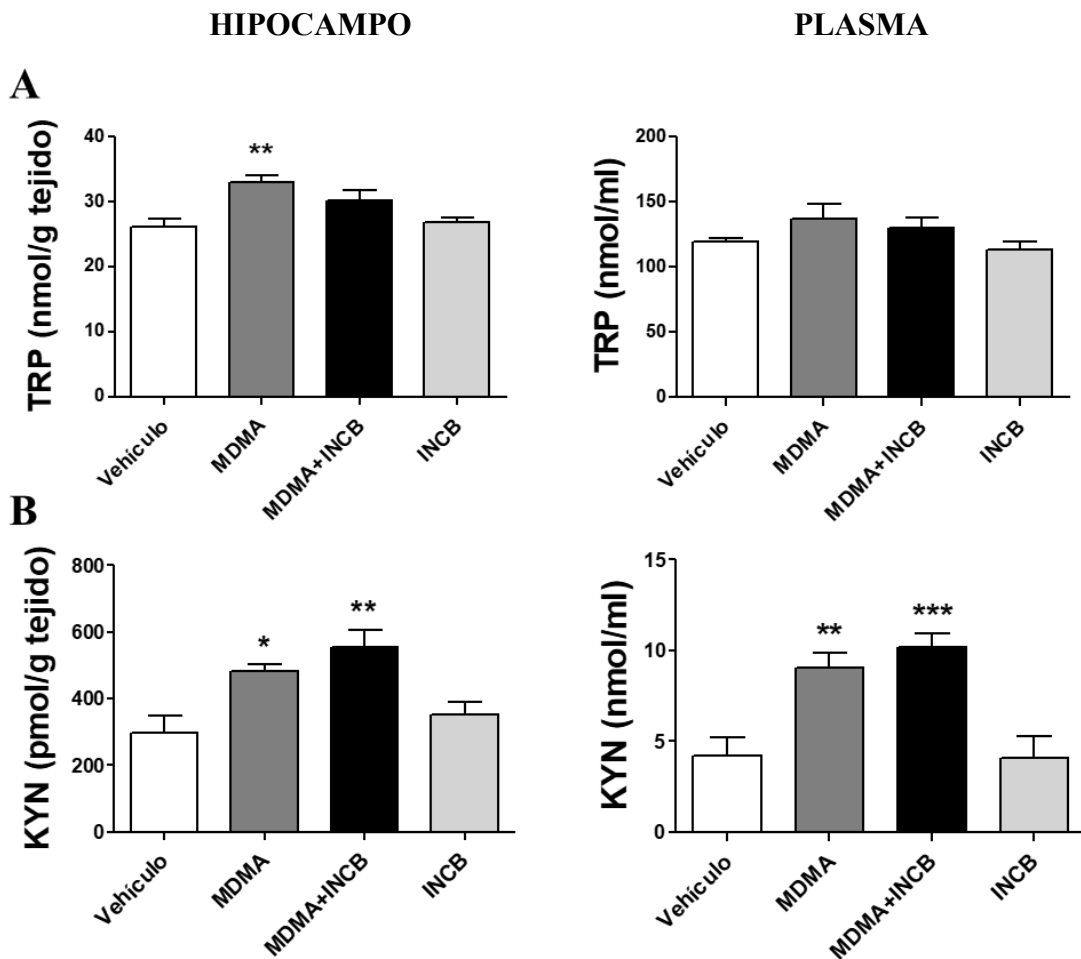


Figura 32. Efecto de la inhibición de IDO-1 sobre las concentraciones de TRP y KYN observadas en hipocampo y plasma 6 h después de la administración de MDMA. Se muestran las concentraciones de (A) TRP y (B) KYN en hipocampo y plasma de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) e INCB-024360 (INCB; 50 mg/kg; i.p.) analizadas 6 h después de la administración de la droga. Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=5-6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * $p<0,05$; ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ respecto al vehículo.

Se ha observado que un estímulo proinflamatorio inducido por LPS es capaz de incrementar la expresión de IDO-1 [173]. Por ello, como comprobación de la efectividad de INCB-024360 utilizando este protocolo de administración, se empleó un modelo de inflamación a través del tratamiento con LPS (2 mg/kg). Los animales fueron tratados 24 h después de la administración de LPS con una dosis del inhibidor INCB-024360 (50 mg/kg) y sacrificados 7 h después con el fin de analizar las concentraciones de TRP y KYN en hipocampo. El ANOVA de una vía reveló diferencias significativas de las concentraciones de TRP y KYN entre los grupos experimentales en hipocampo (tabla 6; TRP: $F_{2,14}=5,18$; $p=0,0208$ y KYN: $F_{2,15}=6,10$; $p=0,0115$). El análisis *post-hoc* indicó que el tratamiento con el inhibidor de IDO-1 no modificó el aumento de la concentración de TRP inducido por LPS, sin embargo, sí previno el incremento de KYN observado en estos mismos animales (56% de disminución vs. vehículo).

	Vehículo	LPS	LPS+INCB
TRP (nmol/mg tejido)	23,91	31,57*	30,64*
KYN (pmol/mg tejido)	368,8	675,8**	470,4 [#]

Tabla 6. Efecto de la inhibición de IDO-1 sobre los cambios observados en las concentraciones de TRP y KYN en hipocampo tras la administración de LPS. Se muestran las concentraciones de TRP y KYN determinadas en hipocampo de ratas tratadas con LPS (2 mg/kg; i.p.) e INCB-024360 (50 mg/kg; i.p.). Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=5-6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * $p<0,05$ y ** $p<0,01$ respecto a vehículo; [#] $p<0,05$ respecto a LPS.

2.3.2 Efecto de la inhibición de IDO-1 sobre la hipertermia producida por MDMA

Durante el desarrollo del experimento, se monitorizó la temperatura rectal de los grupos experimentales.

El ANOVA de dos vías no reveló un efecto significativo del factor tiempo ($F_{2,40} = 1,20$; $p=0,3130$) ni del tratamiento ($F_{3,20} = 1,16$; $p=0,3484$) en las medidas basales de temperatura rectal. En el resto de medidas determinadas tras la inyección de MDMA, el análisis mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,20} = 93,31$; $p<0,0001$), tiempo ($F_{6,120} = 60,16$; $p<0,0001$) pero no de la interacción entre ambos factores ($F_{18,120}=1,31$; $p=0,1922$). El post-test Bonferroni mostró un aumento de la temperatura rectal correspondiente a los animales que fueron administrados con MDMA. Sin embargo, el tratamiento con el inhibidor INCB-024360 no alteró la hipertermia inducida por MDMA a ninguno de los tiempos analizados (figura 33).

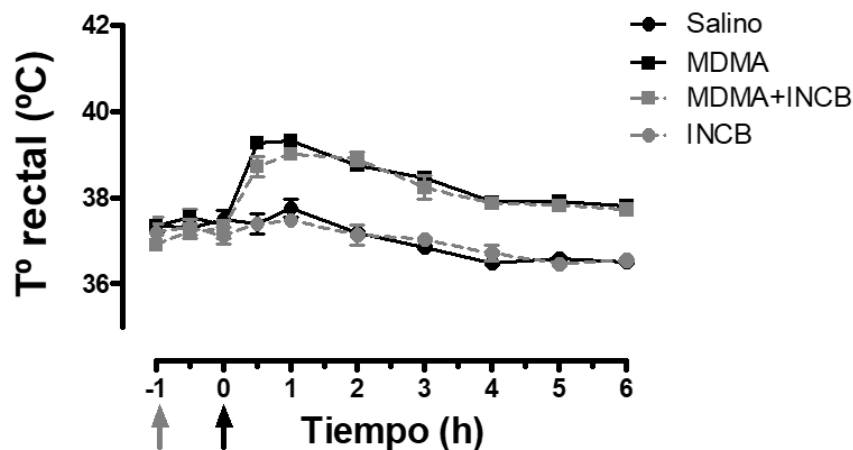


Figura 33. Efecto de la inhibición de IDO-1 sobre la hipertermia producida por MDMA. Se muestran las curvas de las temperaturas rectales obtenidas de cada uno de los grupos experimentales a diferentes tiempos. Las flechas indican el momento de la administración de INCB-024360 (gris; INCB; 50 mg/kg; i.p.) y de MDMA (negro; 12,5 mg/kg; i.p.). Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni.

2.4 Efecto de la inhibición de KMO y KAT II en los cambios inducidos por MDMA

Con el fin de dilucidar si ambas enzimas participan en la neurotoxicidad inducida por MDMA, se utilizaron los inhibidores específicos de las enzimas KMO y KAT II, Ro 61-8048 y PF-04859989, respectivamente [306, 307]. Ambos fueron administrados intraperitonealmente 1 h antes de la inyección de la droga (figura 34).

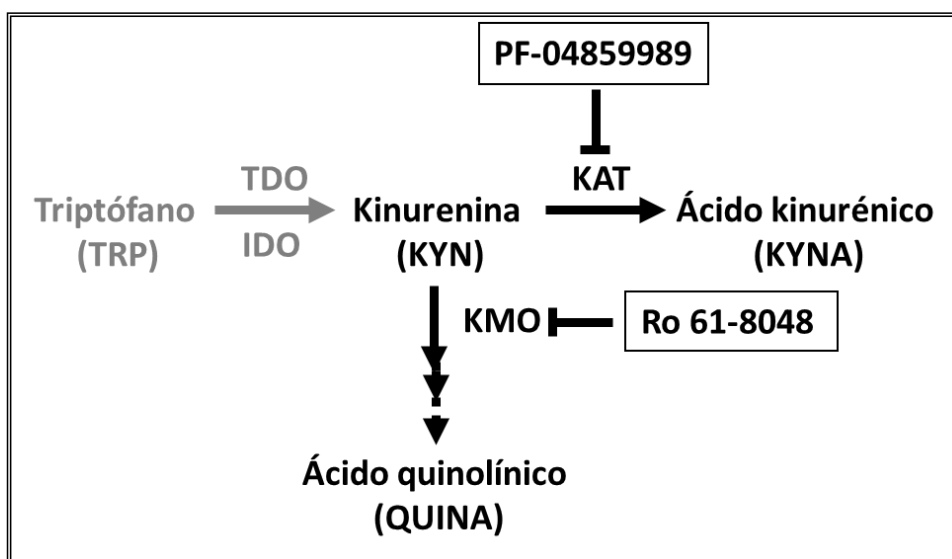


Figura 34. Representación esquemática de la acción de los inhibidores Ro 61-8048 y PF-04859989 sobre la vía de kinurenina. Se muestra el efecto inhibitorio de los compuestos Ro 61-8048 y PF-04859989 sobre las enzimas KMO y KAT II responsables de la metabolización de KYN. *Indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO)*; *kinurenina aminotransferasa (KAT)*; *kinurenina monooxigenasa (KMO)*; *triptófano 2,3 dioxigenasa (TDO)*.

2.4.1 Efecto de la inhibición de KMO y KAT II sobre la concentración de KYN observada tras la administración de MDMA

En primer lugar, se analizó la concentración de KYN en hipocampo y plasma tras la coadministración del inhibidor Ro 61-8048 y de MDMA, 3 h después de la inyección de la droga.

El análisis, mediante el ANOVA de una vía, de las concentraciones de KYN (figura 35 A) reveló diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales tanto en hipocampo ($F_{3,16}=35,75$; $p<0,0001$) como en plasma ($F_{3,14}=30,50$; $p<0,0001$). El test de comparaciones múltiples indicó que la administración del inhibidor de KMO potenció el incremento de los niveles de KYN inducido por MDMA tanto en hipocampo como en plasma (1266% y 473% de incremento *vs.* MDMA, respectivamente). Además, el grupo experimental que recibió únicamente el inhibidor de KMO mostró igualmente un aumento de las concentraciones de KYN respecto al grupo vehículo tanto a nivel central (866%) como periférico (562%).

A continuación, se determinaron las concentraciones de KYN utilizando el inhibidor específico de la isoforma KAT II, PF-04859989.

El ANOVA de una vía mostró cambios estadísticamente significativos en las concentraciones de KYN (figura 35 B) en los grupos experimentales tanto en hipocampo ($F_{3,14}=21,53$; $p<0,0001$) como en plasma ($F_{3,16}=9,92$; $p=0,0006$). El *post-hoc* mostró que PF-04859989 potenció el aumento de las concentraciones de KYN en hipocampo causado por la administración de MDMA (59% de incremento *vs.* MDMA), sin embargo, este efecto no fue observado a nivel periférico.

2.4.2 Efecto de la inhibición de KMO y KAT II sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA

Para determinar si las enzimas KMO y KAT II participaban en la neurotoxicidad producida por MDMA a largo plazo, se analizó la densidad de los SERT a través de la técnica de autorradiografía utilizando un marcaje radiactivo. El ANOVA de una vía mostró un efecto estadísticamente significativo de los diferentes tratamientos

utilizados sobre la densidad de los SERT (figura 36) tanto en hipocampo ($F_{3,16}=50$; $p<0,0001$) como en corteza frontal ($F_{3,17}=8,3$; $p=0,0013$). El análisis mediante el test de Newman-Keuls reveló que ninguno de los dos inhibidores empleados modificaba la neurotoxicidad inducida por MDMA en las áreas de estudio 7 días después de la administración de los compuestos.

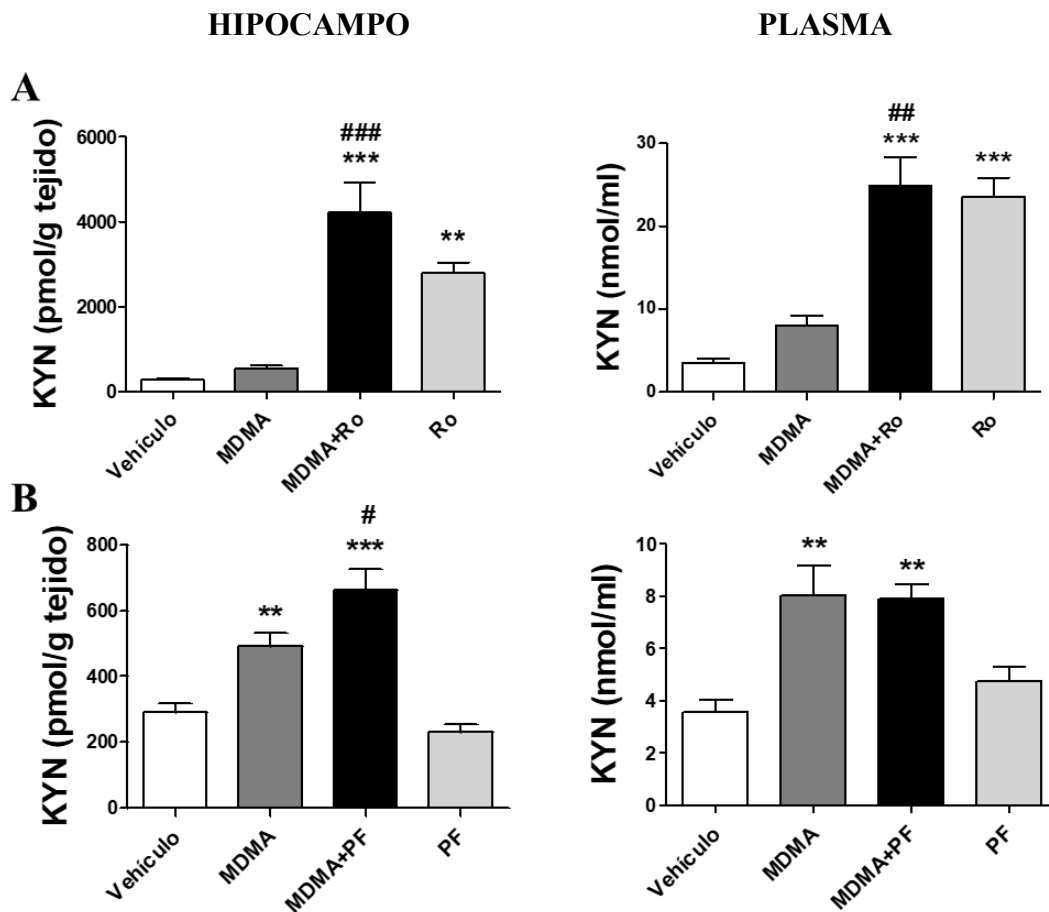


Figura 35. Efecto de la inhibición de KMO y KAT II sobre las concentraciones de KYN observadas en hipocampo y plasma 3 h después de la administración de MDMA. Se muestran las concentraciones de KYN en hipocampo y plasma de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y con los compuestos (A) Ro 61-8048 (Ro, 100 mg/kg; i.p.) y (B) PF-04859989 (PF, 32 mg/kg; i.p.) analizadas 3 h después de la administración de la droga. Los resultados se representan como la media \pm EEM ($n=4-6$). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como $**p<0,01$ y $***p<0,001$ respecto a vehículo; $\#p<0,05$; $\#p<0,01$ y $###p<0,001$ respecto a MDMA.

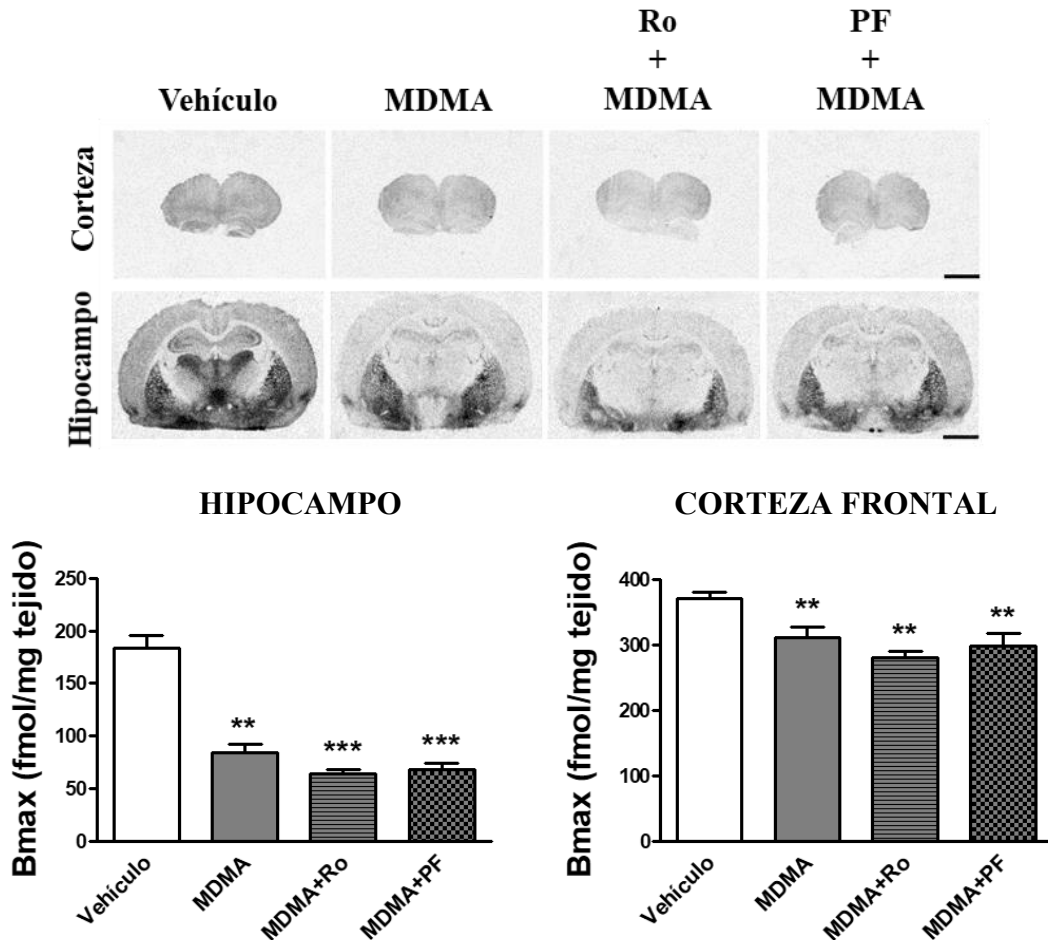


Figura 36. Efecto de la inhibición de KMO y KAT II sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA en hipocampo y corteza frontal. Se muestran los autorradiogramas representativos y la cuantificación de la fijación de [^3H]citalopram en hipocampo y corteza frontal de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y con los compuestos Ro 61-8048 (Ro; 100 mg/kg; i.p.) y PF-04859989 (PF; 32 mg/kg; i.p.) analizada 7 días después de la administración de la droga. Barra = 2 mm. Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=5-6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto al vehículo.

2.4.3 Efecto de los inhibidores de KMO y KAT II sobre la hipertermia producida por MDMA

Durante la realización del experimento se recogieron las medidas de la temperatura rectal de los animales con el objetivo de evidenciar si los compuestos administrados

modificaban la hipertermia inducida MDMA.

El ANOVA de dos vías no mostró un efecto de los factores tiempo ($F_{2,30} = 4,16$; $p=0,0255$) ni tratamiento ($F_{2,15} = 1,10$; $p=0,3593$) en las medidas basales de temperatura rectal. En el resto de medidas determinadas tras la inyección de MDMA, el análisis mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,19} = 78,62$; $p<0,0001$), tiempo ($F_{5,95} = 25,19$; $p<0,0001$) y la interacción entre ambos factores ($F_{15,95}=2,71$; $p=0,0018$). El post-test Bonferroni mostró un aumento de la temperatura rectal correspondiente a los animales que fueron administrados con MDMA. Sin embargo, el tratamiento con los dos inhibidores no indujo un efecto sobre la hipertermia característica de MDMA (figura 37).

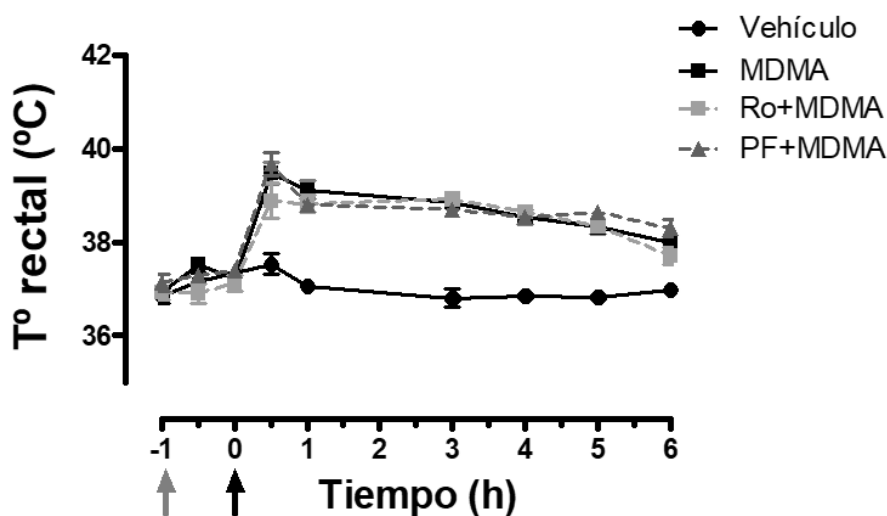


Figura 37. Efecto de la inhibición de KMO y KAT II sobre la hipertermia producida por MDMA. Se muestran las curvas de las temperaturas rectales obtenidas de cada uno de los grupos experimentales a diferentes tiempos. Las flechas indican el momento de la administración de los compuestos Ro 61-8048 o PF-04859989 (gris; Ro: 100 mg/kg y PF: 32 mg/kg; i.p.), y MDMA (negra; 12,5 mg/kg; i.p.). Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni.

3. Papel de los receptores de hidrocarburos de arilo (AhR) en los cambios producidos por la administración de MDMA

La proteína AhR es un receptor citoplasmático que, tras la unión de su ligando, puede traslocarse al núcleo celular promoviendo así la expresión de proteínas que participan en el metabolismo de sustancias, y en mecanismos de inflamación y de estrés oxidativo [16, 229, 275]. Uno de los ligandos endógenos con mayor afinidad por AhR es la KYN, capaz de modular la respuesta tisular a través de este receptor [14, 15].

Con el fin de determinar el efecto de la administración de MDMA sobre la actividad y expresión de AhR, y su posible participación en la neurotoxicidad inducida por la droga, se empleó un antagonista puro de este receptor, el CH-223191, capaz de impedir la entrada al núcleo celular de AhR [308].

3.1 Efecto de MDMA sobre la actividad y expresión de AhR

La actividad y expresión del receptor se determinó en hipocampo por ser ésta la región cerebral que manifiesta mayor daño neurotóxico inducido por la droga [95].

La actividad de AhR se analizó 1 y 3 h después de la administración de MDMA a través del estudio de su traslocación al núcleo. Para ello, se determinó la expresión de AhR en las fracciones nucleares y citoplasmáticas del hipocampo y, seguidamente, se calculó la ratio de las densitometrías resultantes del análisis de la expresión del receptor en ambos extractos subcelulares.

El ANOVA de una vía mostró un efecto significativo de MDMA sobre la ratio de traslocación de AhR (figura 38; $F_{2,13}=8,86$; $p=0,0037$). El análisis de Newman-Keuls

reveló un incremento de la traslocación 1 y 3 h después de la administración de la droga (82% y 128% vs. vehículo, respectivamente).

Para confirmar que el incremento de la traslocación de AhR al núcleo se estaba traduciendo en un efecto sobre su actividad transcripcional, se analizó la expresión de ARNm de CYP1B1, uno de los genes cuya expresión está regulada por el receptor, 6 h después de la administración de MDMA utilizando la técnica de qPCR.

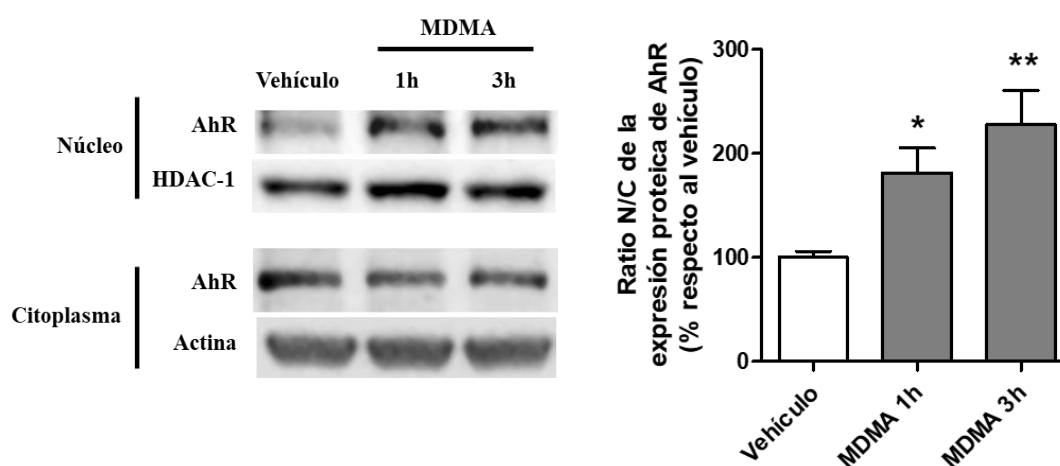


Figura 38. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la actividad de AhR en hipocampo. Se muestran imágenes representativas y el histograma de la ratio núcleo-citoplasma (N/C) calculada a partir de las densitometrías resultantes del análisis de la expresión de AhR en ambas fracciones subcelulares procedentes de hipocampo obtenido 1 y 3 h después de la administración intraperitoneal de MDMA. Se muestra el marcador nuclear HDAC-1 para comprobar la correcta separación de ambos extractos. Como control de carga se utilizó la expresión de HDAC-1 en extractos nucleares y de β -actina en extractos citoplasmáticos. Los resultados se representan como porcentaje respecto a vehículo y se expresan como la media \pm EEM (n=5-6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * p <0,05 y ** p <0,01 respecto al vehículo.

La *t* de Student indicó un efecto estadísticamente significativo del tratamiento sobre los niveles de ARNm de CYP1B1 en hipocampo (figura 39; $t_{1,7}=2,73$; $p=0,0295$). En

concreto, el análisis reveló un incremento de la expresión del ARNm de CYP1B1 inducido por la administración de MDMA (40% vs. vehículo).

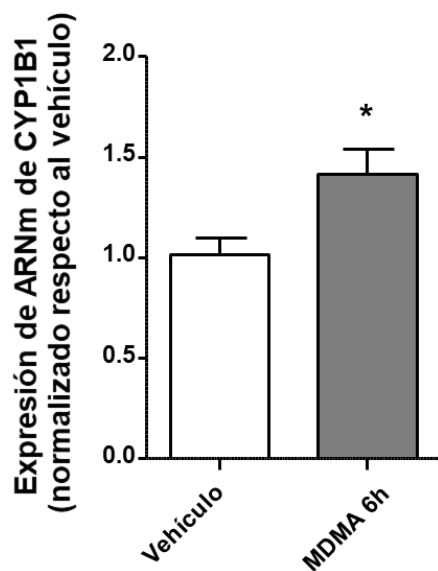


Figura 39. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la expresión del ARNm de CYP1B1 en hipocampo. Se muestra la cuantificación de los niveles de ARNm de CYP1B1 en tejido hipocámpal obtenido 6 h después de la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg). Se empleó la media de los niveles de ARNm de GAPDH y 18S como control endógeno. Los resultados se normalizaron respecto al vehículo y se muestran como la media \pm EEM (n=4-5). El análisis estadístico se realizó empleando una *t* de Student. Las diferencias significativas se representan como $*p < 0,05$ respecto al vehículo.

La regulación de la actividad transcripcional de AhR depende no solo de la unión de un ligando al receptor, sino también de la formación de un heterodímero con el factor de transcripción ARNT en el núcleo celular. La formación de este complejo transcripcionalmente activo media en la regulación de la expresión de diferentes genes. Por ello, se analizó la expresión de ARNT presente en hipocampo 3 h después de la inyección de MDMA. Además, se determinaron los niveles proteicos de AhR en estos mismos homogenados con el objetivo de estudiar el efecto de MDMA sobre la expresión total del receptor.

La *t* de Student mostró un efecto estadísticamente significativo (figura 40 A; $t_{1,10}=2,92$; $p=0,0154$) que se manifestó como un incremento de los niveles de expresión de AhR (27% vs. vehículo) tras la administración de MDMA. Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles totales de ARNT tras la

inyección de la droga (figura 40 B; $t_{1,10}=0,79$; $p=0,4488$).

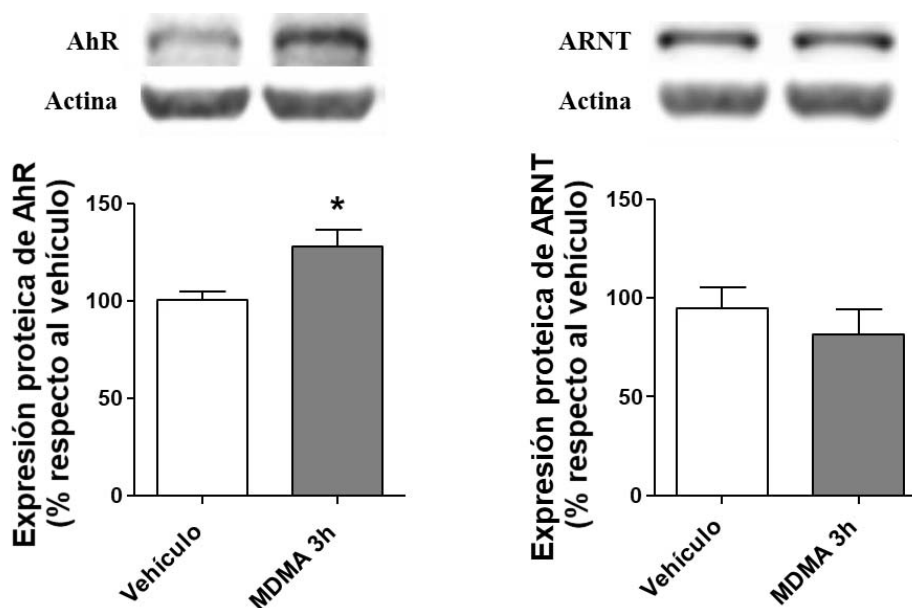


Figura 40. Efecto de una dosis neurotóxica de MDMA sobre la expresión de AhR y ARNT en hipocampo. Se muestran imágenes representativas y el análisis densitométrico de la expresión de las proteínas (A) AhR y (B) ARNT en lisados totales de tejido hipocampal obtenido 3 h después de la administración intraperitoneal de MDMA (12,5 mg/kg). Como control de carga se utilizó la expresión de β -actina. Los resultados se representan como porcentaje respecto al vehículo y se expresan como la media \pm EEM (n=6). El análisis estadístico se realizó empleando una *t* de Student. Las diferencias significativas se muestran como * $p < 0,05$ respecto al vehículo.

3.2 Efecto del antagonismo de AhR sobre los cambios inducidos por MDMA

Con el objetivo de analizar el papel de AhR en los efectos producidos por MDMA se empleó un antagonista específico del receptor, el CH-223191, el cual fue administrado intraperitonealmente 12 h antes, media hora antes y 30 minutos después de la inyección de MDMA.

3.2.1 Efecto del antagonismo de AhR sobre la actividad del receptor inducida por MDMA

Para comprobar si los cambios observados en la actividad de AhR tras la administración de MDMA estaban mediados por la presencia de un ligando, se analizó el efecto de CH-223191 sobre la traslocación del receptor al núcleo celular. A partir de la determinación de la expresión de AhR en extractos nucleares y citoplasmáticos, se obtuvo la ratio de traslocación nuclear del receptor 3 h después de la administración de MDMA.

El ANOVA de una vía mostró cambios significativos entre los grupos experimentales analizados (figura 41; $F_{3,18}=18,89$; $p<0,0001$). El análisis *post-hoc* reveló que el tratamiento con el antagonista de AhR previno su traslocación nuclear inducida por MDMA a las 3 h (87% de disminución de la ratio núcleo-citoplasma vs. MDMA).

3.2.2 Efecto del antagonismo de AhR en la neurotoxicidad producida por MDMA

Para estudiar si la actividad de AhR estaba implicada en la neurotoxicidad producida por MDMA, se determinó la presencia de los SERT en hipocampo y corteza frontal mediante la técnica de autorradiografía.

El ANOVA de una vía reveló un efecto estadísticamente significativo de los diferentes tratamientos utilizados sobre la densidad de los SERT (figura 42) tanto en hipocampo ($F_{3,19}=26,31$; $p<0,0001$) como en corteza frontal ($F_{3,19}=19,19$; $p<0,0001$). El análisis de Newman-Keuls mostró que la administración del antagonista de los AhR potenció la neurotoxicidad inducida por MDMA tanto en hipocampo como en

corteza frontal 7 días después de la administración de los compuestos (28% y 19% de disminución de la densidad de los SERT *vs.* MDMA, respectivamente). Sin embargo, el grupo control tratado con el antagonista de AhR no mostró cambios en la densidad de los SERT al compararlo con el grupo vehículo en ninguna de las áreas de estudio.

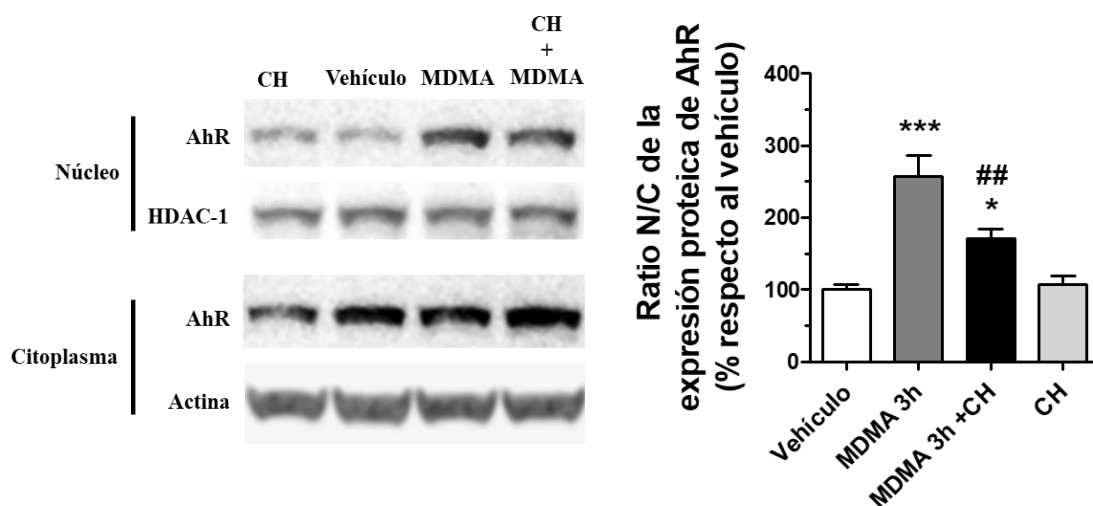


Figura 41. Efecto del antagonismo de AhR sobre los cambios observados en la actividad del receptor en hipocampo 3 h después de la administración de MDMA. Se muestran imágenes representativas y el histograma de la ratio núcleo-citoplasma (N/C) calculada a partir de las densitometrías resultantes del análisis de la expresión de AhR en ambas fracciones subcelulares de hipocampo tras el tratamiento con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y CH-223191 (CH; 10 mg/kg; i.p.) 3 h después de la administración de la droga. Se muestra el marcador nuclear HDAC-1 para comprobar la correcta separación de ambos extractos. Como control de carga se utilizó la expresión de HDAC-1 en extractos nucleares y de β -actina en extractos citoplasmáticos. Los valores se representan como porcentaje respecto vehículo y se expresan como la media \pm EEM (n=5-6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ respecto a vehículo; ## $p < 0,01$ respecto a MDMA 3 h.

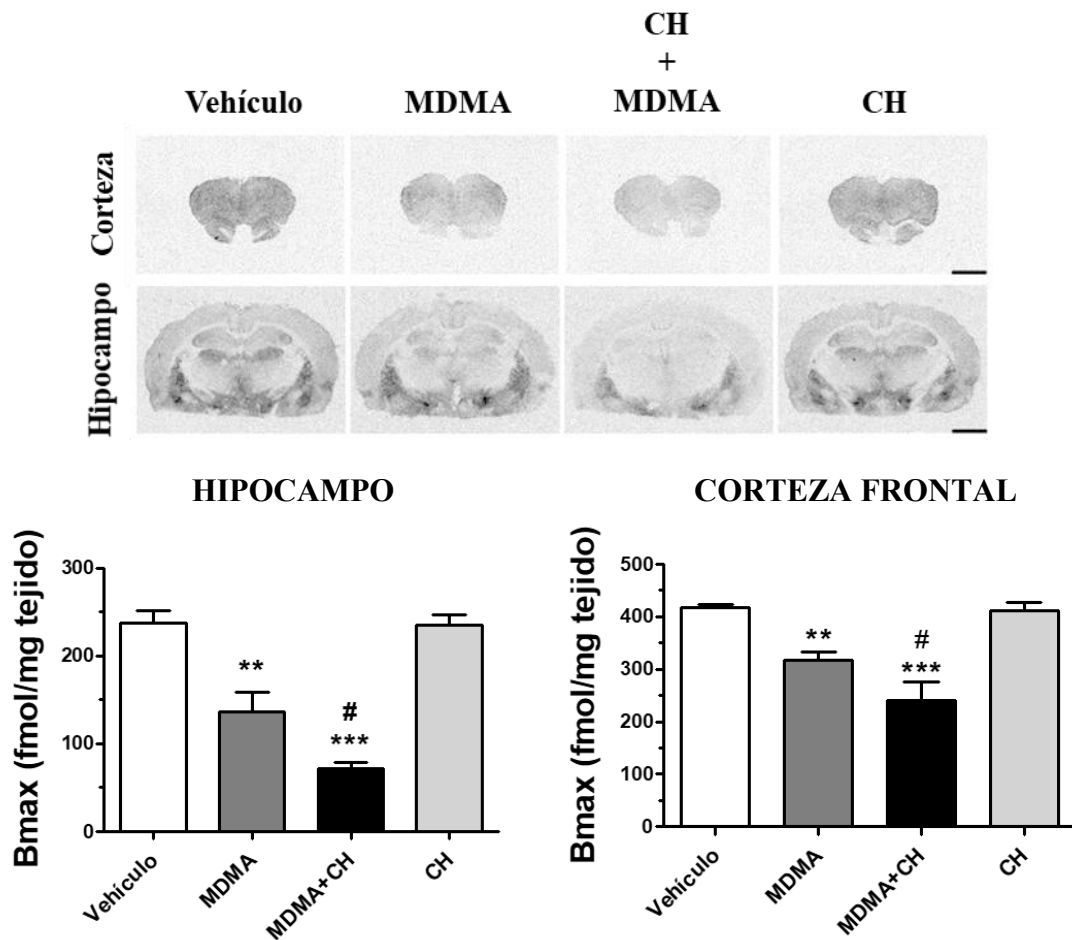


Figura 42. Efecto del antagonismo de AhR sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA en hipocampo y corteza frontal. Se muestran los autorradiogramas representativos y la cuantificación de la fijación de [³H]citalopram en hipocampo y corteza frontal de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y CH-223191 (CH; 10 mg/kg; i.p.) analizada 7 días después de la administración de los compuestos. Barra = 2 mm. Los resultados se representan como la media ± EEM (n=5-6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ respecto a vehículo; # $p < 0,001$ respecto a MDMA.

3.2.3 Efecto del antagonismo de AhR sobre la hipertermia que produce MDMA

Durante la realización del experimento se recogieron las medidas de la temperatura rectal de los animales con el objetivo de determinar si CH-223191 modificaba la hipertermia inducida por MDMA.

RESULTADOS

El ANOVA de dos vías mostró un efecto del factor tiempo ($F_{2,40} = 30,82$; $p < 0,0001$) pero no del tratamiento ($F_{3,20} = 2,83$; $p = 0,0643$) en las medidas basales de temperatura rectal. En el resto de medidas determinadas tras la inyección de MDMA, el análisis mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,20} = 129,48$; $p < 0,0001$), tiempo ($F_{6,120} = 50,22$; $p < 0,0001$) y la interacción entre ambos factores ($F_{18,120} = 9,6$; $p < 0,0001$). El post-test Bonferroni reveló un incremento de la hipertermia inducida por MDMA tras el tratamiento con el antagonista de AhR, 4 h después de la inyección con la droga. Así mismo, también se observó un aumento de la temperatura a las 4 y 5 h en el grupo control del antagonista en comparación con el vehículo (figura 43).

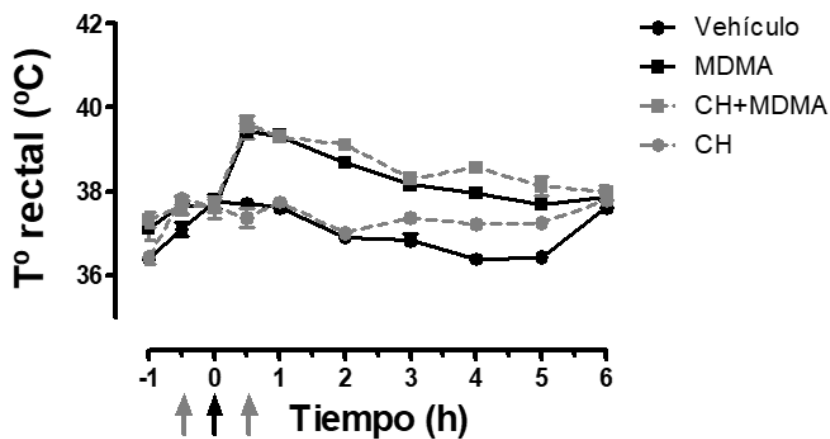


Figura 43. Efecto del antagonismo de AhR sobre la hipertermia producida por MDMA. Se muestran las curvas de las temperaturas rectales obtenidas de cada uno de los grupos experimentales a diferentes tiempos. Las flechas indican el momento de la administración de CH-223191 (gris; CH: 10 mg/kg; i.p.) y de MDMA (negra; 12,5 mg/kg; i.p.). Los resultados se representan como la media \pm EEM ($n=6$). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni.

4. Efecto de la administración del DIM sobre los cambios inducidos por MDMA

El DIM es un agonista de AhR con baja afinidad por el receptor [317-319] y que ha sido utilizado como tratamiento en múltiples enfermedades relacionadas con fenómenos de inflamación y de estrés oxidativo [268, 320]. Para determinar el efecto de este modulador sobre los cambios producidos por MDMA, se administró una única dosis de DIM (250 mg/kg) [309] por vía oral 1 h antes de la inyección de la droga.

4.1 Efecto de la administración de DIM sobre la neurotoxicidad producida por MDMA

Para analizar el efecto de DIM sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA 7 días después de su administración se determinó la densidad de los SERT en hipocampo y corteza frontal mediante la técnica de autorradiografía.

El ANOVA de una vía mostró cambios estadísticamente significativos de la densidad de los SERT (figura 44) entre los diferentes tratamientos utilizados en hipocampo ($F_{3,37}=24$; $p<0,0001$) y en corteza frontal ($F_{3,39}=40$; $p<0,0001$). El test de Newman-Keuls reveló que la administración de DIM prevenía parcialmente la neurotoxicidad inducida por MDMA tanto en hipocampo como en corteza frontal 7 días después de la administración de los compuestos (24% y 19% de incremento de la densidad de los SERT vs. MDMA, respectivamente). Sin embargo, el grupo control tratado con DIM no mostró cambios en la densidad de los SERT al compararlo con el grupo vehículo en ninguna de las áreas de estudio.

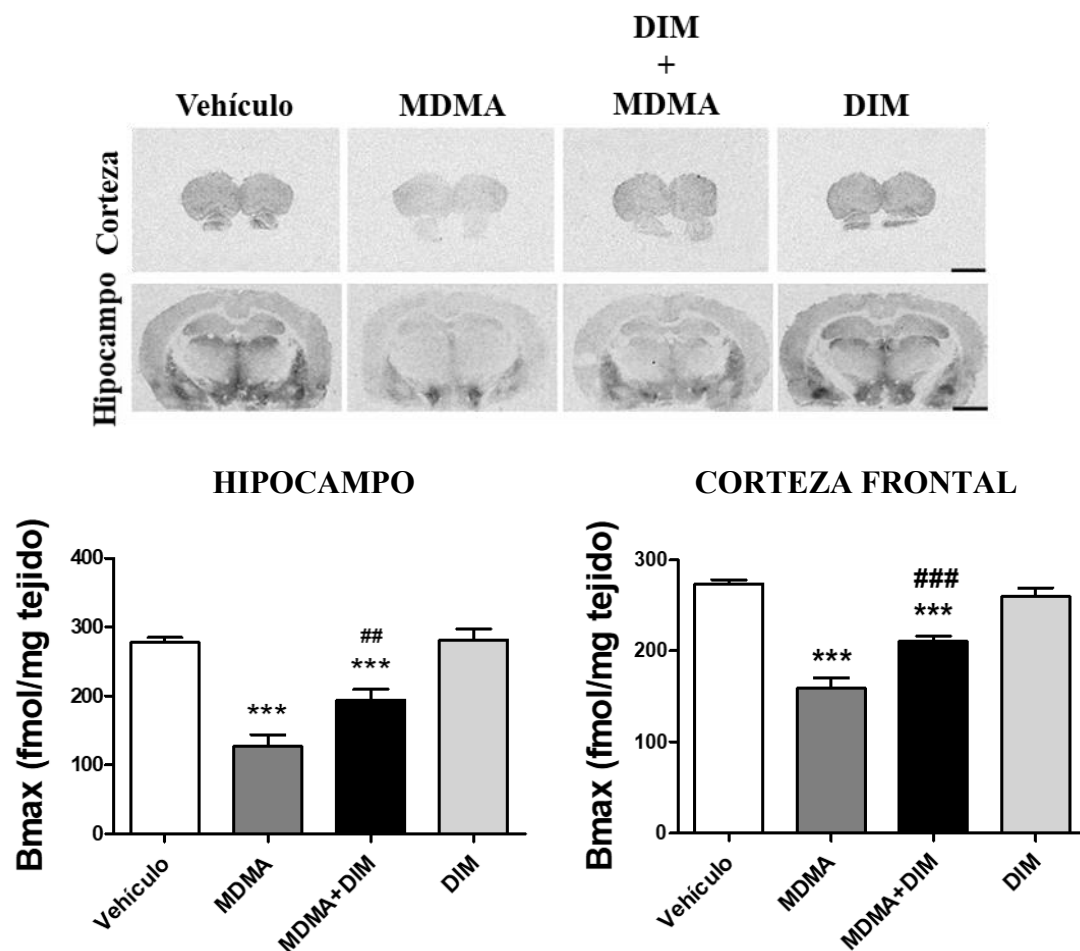


Figura 44. Efecto de la administración de DIM sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA en hipocampo y corteza frontal. Se muestran los autorradiogramas representativos y la cuantificación de la fijación de [³H]citalopram en hipocampo y corteza frontal de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y DIM (250 mg/kg; v.o.) analizada 7 días después de la administración de los compuestos. Barra = 2 mm. Los resultados se representan como la media ± EEM (n=6-13). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como ****p*<0,001 respecto a vehículo; ##*p*<0,01 y ###*p*<0,001 respecto a MDMA.

4.2 Efecto de la administración de DIM sobre el estrés oxidativo producido por MDMA a corto plazo

Uno de los principales mecanismos por el cual MDMA produce neurotoxicidad serotoninérgica es a través de la formación de radicales libres [102]. Con el fin de dilucidar el impacto del tratamiento con DIM sobre los procesos de estrés oxidativo

inducidos por la administración de la droga, se analizó la expresión de las proteínas inducibles en presencia de radicales libres, catalasa y HO-1.

El análisis de la expresión de catalasa mediante el ANOVA de una vía indicó un efecto estadísticamente significativo 3 h después de la administración de MDMA o vehículo (figura 45 A; $F_{3,19}=20,13$; $p<0,0001$). El *post-hoc* reveló un incremento de los niveles de catalasa tras la administración de MDMA (35% vs. vehículo) que fue prevenido al tratar a los animales con DIM previamente a la inyección de la droga (43% de disminución vs. MDMA 3 h). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de esta proteína tras 6 h desde la administración de MDMA o vehículo (figura 45 B; $F_{3,19}=0,7983$; $p=0,5100$).

Además, se analizó el contenido total de la enzima HO-1, la cual presenta un papel protector frente a fenómenos de estrés oxidativo. El ANOVA de una vía mostró un efecto estadísticamente significativo sobre los grupos analizados 3 h (figura 46 A; $F_{3,22}=6,23$; $p=0,0032$) y 6 h (figura 46 B; $F_{3,15}=4,75$; $p=0,016$) después del tratamiento con MDMA o vehículo. El test de Newman-Keuls reveló un incremento de los niveles de HO-1 3 h después de la administración de MDMA (35% vs. vehículo) que fue parcialmente revertido en aquellos animales que fueron tratados con DIM previamente a la administración de la droga (28% de disminución vs. MDMA 3 h). El análisis de los datos con el mismo post-test estadístico mostró un efecto similar sobre la expresión de HO-1 6 h después de la administración con MDMA (101% de aumento vs. vehículo) y tras el pretratamiento con DIM (66% de disminución vs. MDMA 6 h).

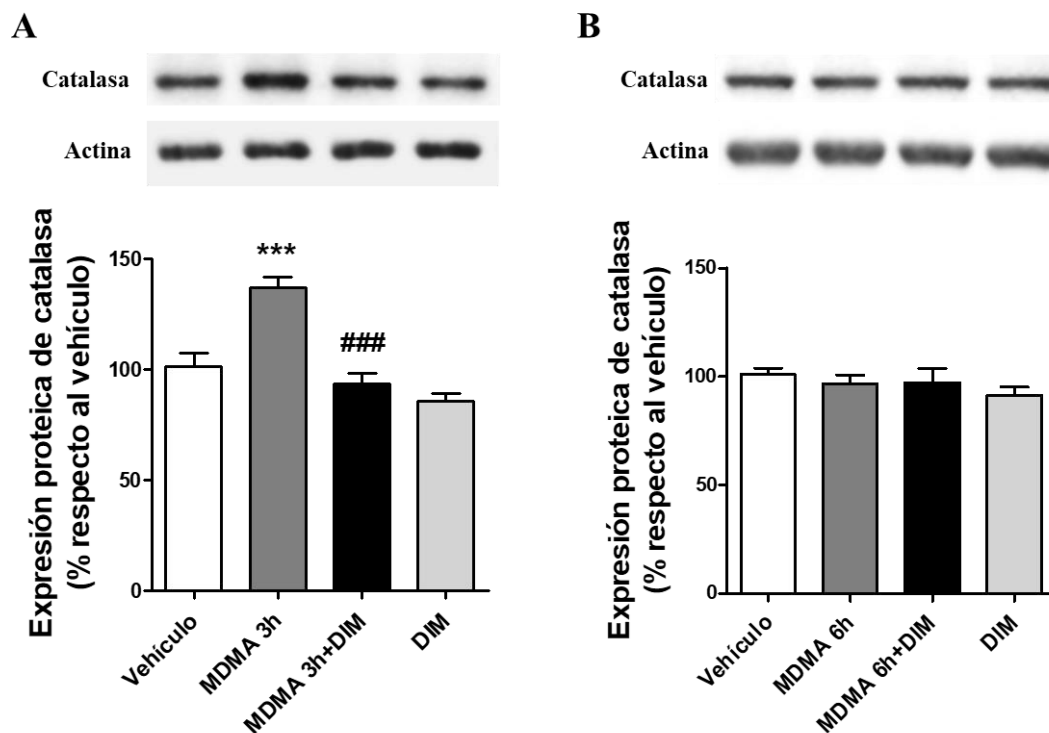


Figura 45. Efecto de la administración de MDMA y de DIM sobre la expresión de la enzima catalasa en hipocampo. Se muestran bandas representativas y el análisis densitométrico de la expresión de la proteína catalasa en los hipocampos de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y DIM (250 mg/kg; v.o.) obtenidos (A) 3 h y (B) 6 h después de la administración de la droga. Como control de carga se utilizó la expresión de β -actina. Los resultados se representan como porcentaje respecto a vehículo y se expresan como la media \pm EEM (n=5-6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como *** $p < 0,001$ respecto a vehículo; ### $p < 0,001$ respecto a MDMA 3 h.

4.3 Efecto de la administración de DIM sobre la hipertermia producida por MDMA

Con el fin de determinar si la administración de DIM modificaba la hipertermia inducida por MDMA, se recogieron las medidas de la temperatura rectal para cada uno de los grupos de experimentación.

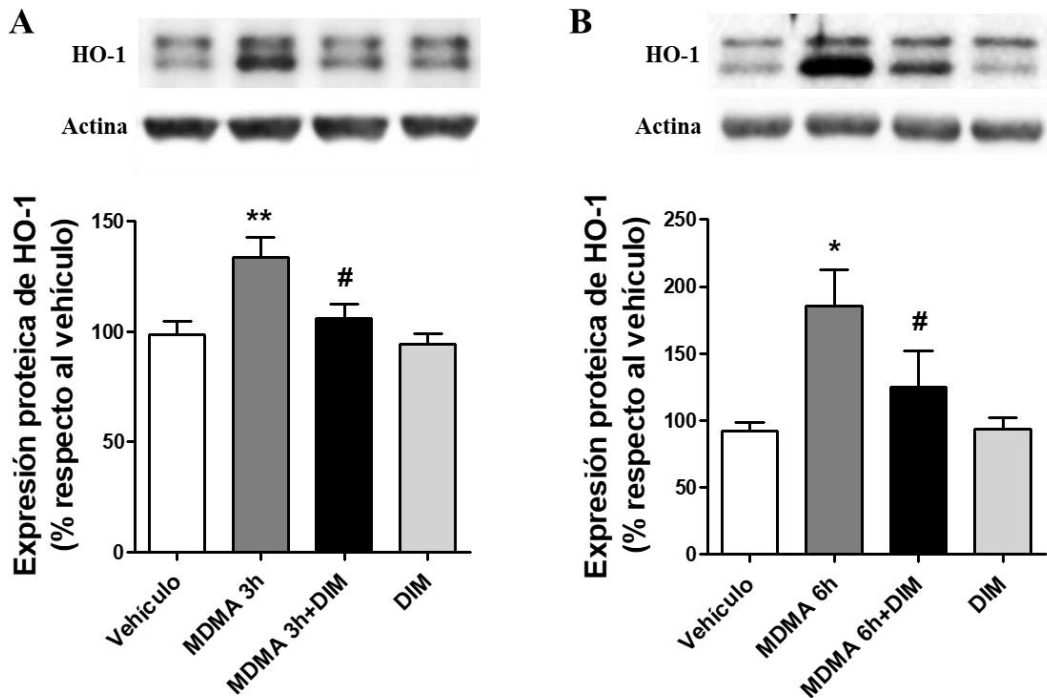


Figura 46. Efecto de la administración de MDMA y DIM sobre la expresión de la enzima HO-1 en hipocampo. Se muestran bandas representativas y el análisis densitométrico de la expresión de la proteína HO-1 en los hipocampos de ratas tratadas con MDMA (12,5 mg/kg; i.p.) y DIM (250 mg/kg; v.o.) obtenidos (A) 3 h y (B) 6 h después de la administración de la droga. Como control de carga se utilizó la expresión de β -actina. Los resultados se representan como porcentaje respecto a vehículo y se expresan como la media \pm EEM (n=4-6). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de una vía seguido del test *post-hoc* de Newman-Keuls. Las diferencias significativas se muestran como * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ respecto a vehículo; # $p < 0,05$ respecto a MDMA.

El ANOVA de dos vías mostró un efecto significativo del factor tiempo ($F_{3,22} = 6,75$; $p = 0,0028$) pero no del tratamiento ($F_{3,20} = 0,8$; $p = 0,5051$) en las medidas basales de temperatura rectal. En el resto de medidas determinadas tras la inyección de MDMA, el análisis mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,22} = 61,18$; $p < 0,0001$), tiempo ($F_{6,132} = 59,27$; $p < 0,0001$) y la interacción entre ambos factores ($F_{18,132} = 7,41$; $p < 0,0001$). El post-test Bonferroni mostró un aumento de la temperatura rectal correspondiente a los animales que fueron administrados con MDMA. Sin embargo, el tratamiento con DIM no produjo cambios sobre la hipertermia inducida por

MDMA. Además, el grupo control que recibió DIM mostró un incremento de la temperatura rectal a las 5 y 6 h en comparación con el vehículo (figura 47).

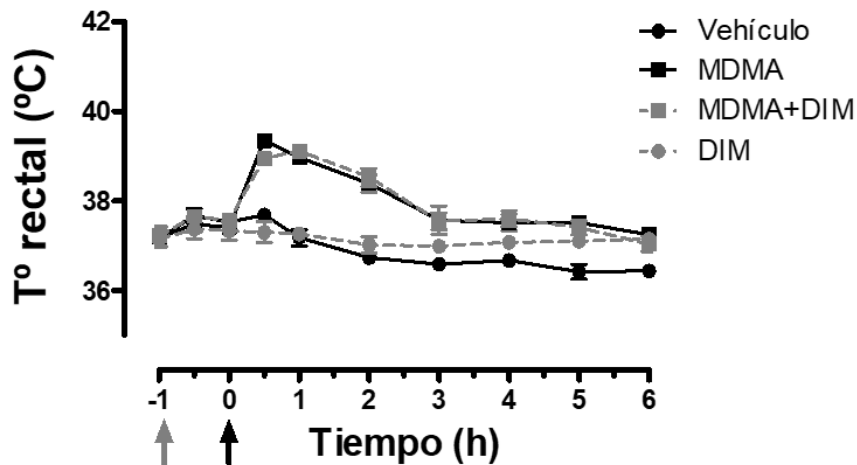


Figura 47. Efecto de la administración de DIM sobre la hipertermia producida por MDMA. Se muestran las curvas de las temperaturas rectales obtenidas de cada uno de los grupos experimentales a diferentes tiempos. Las flechas indican el momento de la administración de DIM (gris; 250 mg/kg; v.o.) y MDMA (negra; 12,5 mg/kg; i.p.). Los resultados se representan como la media \pm EEM (n=6-7). El análisis estadístico se realizó empleando el ANOVA de dos vías seguido del test *post-hoc* de Bonferroni.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

MDMA es un derivado anfetamínico con actividad psicotropa que afecta principalmente al sistema serotoninérgico [1]. Numerosos trabajos realizados en distintas cepas de rata han descrito que la administración de dosis neurotóxicas de MDMA disminuye la concentración de 5-HT en diferentes áreas cerebrales; en concreto, se ha observado una reducción muy marcada de los niveles de este neurotransmisor en el hipocampo y la corteza frontal [2-5, 39]. Sin embargo, no existen estudios que hayan observado un efecto de MDMA sobre el metabolismo del TRP, aminoácido precursor de la síntesis de 5-HT, y de la principal ruta metabólica que regula su concentración, la vía de kinurenina. La alteración del correcto funcionamiento de esta vía se ha asociado a varias enfermedades neurológicas [10, 11]. El metabolito mayoritario de la vía, KYN [12], actúa como agonista de los AhR, cuya actividad está relacionada con el metabolismo de moléculas y la modulación de la respuesta inflamatoria y antioxidante [16, 17]. Por todo ello, el objetivo de este estudio fue determinar si la administración de una dosis neurotóxica de MDMA da lugar a la activación de la vía de kinurenina promoviendo, a su vez, mecanismos neuroprotectores que limiten el daño serotoninérgico que produce la droga mediante la activación de los AhR.

Los resultados observados en este trabajo mostraron un aumento de la concentración de KYN a corto plazo a nivel central y periférico tras la inyección de MDMA, principalmente como consecuencia de la activación de la enzima TDO hepática. La inhibición de la actividad de la TDO potenció el efecto neurotóxico a largo plazo inducido por la droga, mientras que la administración de L-kinurenina junto con probenecid atenuó el daño serotoninérgico derivado de MDMA. Además, se observó un aumento de la actividad transcripcional de los AhR a corto plazo tras el

tratamiento con la droga. El bloqueo de la actividad de este receptor mediante un antagonista específico potenció la neurotoxicidad producida por MDMA. Por otro lado, la administración del agonista de los AhR, DIM, protegió parcialmente de este efecto neurotóxico, mediante un mecanismo relacionado con la regulación del estrés oxidativo derivado de MDMA.

1. Implicación de la vía de kinurenina en la neurotoxicidad inducida por MDMA

El TRP es un aminoácido esencial que participa como precursor en diferentes rutas metabólicas claves en el mantenimiento de la homeostasis del organismo [9]. Aproximadamente un 1% del TRP disponible es empleado en la producción de 5-HT mientras que alrededor de un 95% es metabolizado a través de la vía de kinurenina. La importancia de ésta última radica en que posee un papel fundamental en el mantenimiento de las concentraciones de TRP dentro de su rango fisiológico [12], evitando las alteraciones derivadas tanto de su acumulación como de su déficit [9, 321, 322].

No existen publicaciones que hayan determinado una relación entre el daño serotoninérgico producido por MDMA y cambios sobre el TRP, precursor de la síntesis de 5-HT, y otros metabolitos derivados de la vía de kinurenina. Por lo tanto, inicialmente se evaluó si la administración de una dosis neurotóxica de MDMA alteraba los metabolitos de esta vía. Los resultados mostraron un incremento de la concentración de TRP tanto en hipocampo como en corteza desde la primera hora hasta 3 h después de su administración, manteniéndose ligeramente elevada en la corteza frontal 6 h después de la inyección de la droga. En esta misma línea y

manifestando una clara relación con los datos de TRP, la concentración de KYN, metabolito mayoritario de la vía y precursor del resto de metabolitos minoritarios [12], está incrementada 1 h después del tratamiento, alcanzando niveles máximos a las 3 y 6 h. Este incremento temprano de los niveles de TRP y KYN observado en ambas estructuras cerebrales, cursó de forma paralela con una disminución de la concentración de 5-HT en hipocampo y corteza frontal, manteniéndose 7 días después de la administración de la MDMA.

El efecto de MDMA sobre la concentración de este neurotransmisor ha sido ampliamente descrito [2-4, 39], asociándose a varios mecanismos que podrían estar contribuyendo a esta disminución. Los más destacados son la liberación masiva del neurotransmisor al espacio sináptico [323-325], la inversión del sistema de recaptación de serotonina [41, 323, 326], y la inhibición inmediata e irreversible de la enzima TPH [95, 327, 328], responsable de la síntesis del neurotransmisor [329]. El aumento de la concentración del TRP en ambas estructuras cerebrales y su consecuente metabolización hacia KYN podría estar relacionado, en parte, con la inhibición de la enzima TPH inducida por MDMA [95, 327, 328], sin embargo, la proporción de TRP responsable de la síntesis de 5-HT es muy pequeña, por lo que otros factores podrían estar participando en los cambios observados en las concentraciones de TRP y KYN. En este sentido, tanto el TRP como la KYN son capaces de atravesar la BHE [200, 330]. De hecho, se ha propuesto a la vía de la kinurenina como un mediador de la comunicación entre órganos [135], de tal forma que alteraciones a nivel periférico podrían producir un efecto a nivel central. Por todo ello, se determinó la concentración plasmática de TRP y KYN en ratas tratadas con MDMA.

A diferencia de lo que ocurre en cerebro, las concentraciones plasmáticas de TRP no

se alteraron de forma significativa a ninguno de los tiempos analizados tras la inyección de la droga. Sin embargo, y coincidiendo con los datos obtenidos a nivel central, el análisis de la concentración de KYN en plasma evidenció un aumento de los valores 1, 3 y 6 h después de la administración de MDMA. Considerando estos resultados y, dado que en condiciones fisiológicas un 60% de la KYN presente en el SNC procede de la periferia [204], podría ser que el incremento de la concentración plasmática de KYN esté contribuyendo al aumento observado de los niveles de este metabolito en cerebro.

En cambio, la relación entre el incremento observado de la concentración de TRP en cerebro y los niveles observados en la periferia no es tan evidente. En condiciones fisiológicas, gran parte del TRP circulante se encuentra unido a la albúmina, sin embargo, únicamente el TRP libre puede ser empleado por los tejidos, formando parte de distintas rutas metabólicas [187, 331]. Este equilibrio puede verse alterado en presencia de un incremento de los ácidos grasos libres circulantes, los cuales son capaces de desplazar al TRP unido a la albúmina [332], aumentando así la proporción de aminoácido disponible que puede ser captado por los tejidos [333, 334]. Un estudio publicado por Sprague *et al.* [335] demostró que, media hora después de su administración, MDMA induce la activación del sistema simpático, dando lugar a un incremento de la actividad lipolítica y, como consecuencia, a una liberación masiva de ácidos grasos libres al torrente sanguíneo. Es por ello que, este aumento de los ácidos grasos libres inducidos por MDMA podría incrementar el TRP libre, el cual es capaz de atravesar la BHE [200, 334, 336], contribuyendo así al aumento de la concentración de TRP detectado a nivel central.

En relación con estos resultados, tan sólo existe un trabajo realizado recientemente en humanos en el que no se observaron alteraciones significativas en los niveles

plasmáticos de TRP y KYN tras la administración de 125 mg de MDMA por vía oral [337]. Esta aparente discrepancia en los niveles de KYN puede ser debida a las diferencias en la toxicidad de las dosis, la vía de administración o las diferencias metabólicas entre especies. La equivalencia y traslacionalidad de las dosis de MDMA entre rata y humano ha sido discutida durante años [46, 60]. Así, mientras que la dosis de 12,5 mg/kg es neurotóxica para la cepa de rata Dark Agouti empleada en esta Tesis, la dosis de 125 mg se considera segura en humanos, empleándose en ensayos clínicos en la actualidad con el fin de evaluar el efecto de MDMA en el síndrome de estrés postraumático [30, 61, 62].

Dos de las enzimas más relevantes de la vía de kinurenina son la TDO y la IDO-1, las cuales poseen un papel limitante en la actividad de esta ruta metabólica al ser las responsables de la formación de KYN a partir del TRP [314, 338]. Ambas enzimas están presentes tanto en el SNC como en la periferia [146, 147, 339, 340], y su participación en la síntesis de KYN está condicionada por diferentes factores que determinan su actividad y expresión [11, 314]. TDO es responsable de la regulación de las concentraciones fisiológicas de TRP y se expresa mayoritariamente de forma constitutiva en el tejido hepático [341, 342], aunque su actividad y expresión pueden verse incrementadas en presencia de un aumento de la concentración de TRP y de glucocorticoides [154, 339, 340]. Por otra parte, IDO-1 es una enzima inducible que está presente principalmente en las células del sistema inmune, de tal forma que su expresión y activación están asociadas a la presencia de un estímulo inflamatorio [343]. Teniendo en cuenta el incremento previamente observado de los niveles de KYN inducido por MDMA tanto en el SNC como a nivel periférico, a continuación se analizó la posible contribución de ambas enzimas en los cambios observados tras la administración de la droga.

En primer lugar, los datos mostraron que la administración de MDMA no altera la expresión de TDO a ninguno de los tiempos analizados ni en hipocampo ni en hígado. Sin embargo, al evaluar su actividad enzimática *ex vivo*, se observó un aumento de dicha actividad en el hígado de las ratas sacrificadas 3 y 6 h después de la administración de MDMA, reflejada por un aumento de las concentraciones de KYN producidas durante el ensayo enzimático. Teniendo en cuenta que la actividad de la enzima TDO se induce como consecuencia de un aumento de la concentración de su sustrato (TRP) [339], es posible que un incremento de la concentración del TRP libre circulante derivado de su desplazamiento de la albúmina, favoreciera una mayor captación de este aminoácido no sólo por parte del cerebro sino también por parte del hígado [185-187], activando de esta forma la enzima TDO y por tanto a la vía de kinurenina.

Para confirmar la implicación de la TDO en la activación de la vía de kinurenina tras la administración de MDMA se empleó el inhibidor específico de la enzima 680C91 [304]. Este estudio se llevó a cabo 3 h después de la administración de la droga ya que es a este tiempo cuando se observaron las concentraciones máximas de KYN en hipocampo y en plasma. El tratamiento con el inhibidor previno el incremento de la concentración de KYN inducido por la droga tanto a nivel central como periférico. Paralelamente, este inhibidor potenció el incremento observado de la concentración de TRP en hipocampo de ratas tratadas con MDMA y aumentó de forma significativa los niveles plasmáticos del aminoácido. Así mismo, el grupo control del 680C91 también mostró un aumento de la concentración del aminoácido a nivel central y periférico confirmando así la inhibición de la enzima TDO con este tratamiento [304, 344]. Sin embargo, aunque el grupo control que recibió el inhibidor mostró una disminución de los niveles plasmáticos de KYN respecto al vehículo, no se

observaron cambios significativos en la región hipocampal. Considerando estos datos, es posible que la contribución de la enzima TDO a la producción de KYN sea menos relevante a nivel central que en la periferia, donde las concentraciones de TDO son cuantitativamente mayores [147, 345, 346]. No obstante, no se puede descartar un menor efecto farmacológico del inhibidor de TDO a nivel central ya que se desconoce la capacidad del compuesto para atravesar la BHE. En conjunto, estos datos indican que la enzima TDO juega un papel clave en el incremento de KYN inducido por MDMA, promoviendo la activación de la vía de kinurenina a corto plazo.

Otra de las enzimas capaces de participar en la síntesis de KYN a partir de TRP en determinadas circunstancias es IDO [11, 159, 314]. Existen dos isoformas de esta proteína, conocidas como IDO-1 e IDO-2 [314]. Dado que IDO-1 posee más afinidad por el TRP y contribuye en mayor medida a su metabolización [163, 164], se analizó la implicación de esta isoforma en la síntesis de KYN inducida por MDMA. Para este fin, se empleó el inhibidor específico de la enzima INCB-024360 [305] y se analizaron las concentraciones de TRP y KYN 6 h después de la administración de la droga. Se eligió este tiempo debido a que, 6 h después de la inyección de MDMA, la concentración de TRP a nivel central disminuye significativamente respecto a los valores observados 1 y 3 h después del tratamiento con la droga, evitando así una posible interferencia de la actividad enzimática de TDO, la cual depende de la concentración de su sustrato. El tratamiento con el inhibidor de IDO-1 no alteró las concentraciones de TRP y KYN observadas tras la administración de MDMA ni en hipocampo ni en plasma. Además, tampoco se observaron cambios en las concentraciones de ambos metabolitos en el grupo control que recibió únicamente el inhibidor farmacológico, posiblemente debido a que la actividad de esta isoforma se

manifiesta principalmente en condiciones de inflamación y estrés oxidativo [315]. Finalmente, con el objetivo de confirmar que el protocolo utilizado en la administración del INCB-024360 era capaz de inhibir laIDO-1, se empleó un modelo de inflamación desencadenado por la administración de LPS por vía intraperitoneal, capaz de inducir un aumento tanto de la expresión de esta enzima como de los niveles de KYN [347-349]. La inyección de INCB-024360 atenuó el incremento de los niveles de KYN inducido en ratas previamente sometidas a un estímulo inflamatorio, confirmando así la eficacia del compuesto [350]. Todos estos datos sugieren que la actividad deIDO-1 no está relacionada de forma significativa con el incremento de los niveles de KYN inducido a corto plazo tras la administración de MDMA. Además, apoyando estos resultados, el análisis de la expresión deIDO-1 no reveló cambios a ninguno de los tiempos analizados tras la administración de MDMA ni en hipocampo ni en hígado, a pesar de que estudios previos han demostrado que MDMA desencadena una respuesta inflamatoria a nivel central y periférico aumentando la concentración de citoquinas proinflamatorias [97, 110, 133, 351], las cuales son capaces de inducir un aumento de la expresión de la enzima [168, 169].

En conjunto, los resultados demuestran que MDMA induce un incremento de la concentración de KYN a nivel central y periférico, principalmente, debido al aumento de la actividad enzimática deIDO en hígado. Sin embargo, no se puede descartar la participación de la enzimaIDO presente a nivel central, la cual pudo activarse por el incremento de la concentración de TRP inducido tras la administración de MDMA tanto en hipocampo como en corteza frontal.

Con el fin de determinar si los cambios inducidos por MDMA a corto plazo sobre la vía de kinurenina, estaban implicados en la neurotoxicidad serotoninérgica producida a

largo plazo por la droga [39, 102, 352, 353], se abordó el estudio desde dos puntos de vista opuestos. Por un lado, se previno el incremento de KYN empleando de nuevo el inhibidor 680C91, teniendo en consideración el papel de la TDO observado previamente en la activación de la vía tras la administración de MDMA y, por otro lado, mediante la administración de forma exógena de este metabolito, potenciando así el incremento de KYN inducido por MDMA.

Varios trabajos han demostrado que la inhibición específica de la actividad de TDO ejerce un efecto protector en diferentes modelos de enfermedades neurológicas como la esquizofrenia o la enfermedad de Huntington [11, 141, 354]. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que la inhibición de TDO potenció la neurotoxicidad inducida por MDMA 7 días después de la administración de los compuestos. Estos datos indican que el bloqueo de la producción de KYN tiene como consecuencia un incremento de la neurotoxicidad inducida por la droga, sugiriendo un posible papel protector de este metabolito sobre el daño serotoninérgico. Por ello, con el objetivo de confirmar esta hipótesis, se administraron de forma conjunta L-kinurenina y probenecid, este último por su capacidad de bloquear los OAT encargados del transporte de distintos metabolitos de la vía de kinurenina fuera del SNC [199, 355]. Los datos revelaron que el tratamiento con L-kinurenina y probenecid previno parcialmente la neurotoxicidad inducida por MDMA tanto en hipocampo como en corteza frontal 7 días después de la administración de los compuestos, sin embargo, no se observó una disminución de la neurotoxicidad producida por la droga tras la administración de L-kinurenina o probenecid de forma independiente. En línea con estos resultados, varias publicaciones han demostrado que el tratamiento conjunto con L-kinurenina y probenecid posee un efecto sinérgico protector frente a fenómenos de neurotoxicidad [222, 223, 356]. Una de las posibles causas que se han

descrito en relación a este efecto es el aumento de la concentración de KYNA en cerebro [213, 222, 223, 356], metabolito derivado de la vía de kinurenina sintetizado a partir de su precursor directo KYN [12]. Este aumento de la concentración de KYNA es potenciado por la co-administración de KYN junto con probenecid, el cual bloquea los transportadores OAT induciendo la acumulación en el SNC principalmente de KYNA y también de KYN [199, 213, 356]. Dado que ambos metabolitos de la vía son moléculas capaces de secuestrar especies reactivas de oxígeno [205], un incremento de ambas podría favorecer la disminución del estrés oxidativo derivado de la administración de la droga a corto plazo, el cual participa en la neurotoxicidad inducida por MDMA [6, 41, 102, 103]. Además, es posible que el incremento de la concentración de KYN observado tras la administración de MDMA favorezca la producción de NAD^+ , uno de los productos finales de la vía de kinurenina y cofactor esencial en diferentes mecanismos con actividad antioxidante [139, 140]. En la misma línea, un trabajo publicado por Sprague *et al.* [357] mostró que el pretratamiento con triptófano producía un efecto protector sobre la neurotoxicidad inducida por MDMA 7 días después de su administración, lo que pudo inducir un incremento de los niveles de KYN [339], y como consecuencia una disminución del efecto neurotóxico derivado de la droga. Por otro lado, el bloqueo de la vía de kinurenina tras el tratamiento con el inhibidor de TDO podría alterar la correcta regulación de las concentraciones de TRP dando lugar a la síntesis de metabolitos tóxicos como derivados de triptamina e indoles [321, 358] contribuyendo así a la neurotoxicidad inducida por MDMA.

A pesar de observarse mayor daño serotoninérgico en el hipocampo que en la corteza frontal tras la administración de MDMA, el 680C91 y L-kinurenina mostraron una acción similar en ambas regiones cerebrales, indicando que el efecto de estos

tratamientos no presenta una especificidad dependiente de la estructura cerebral. Por otro lado, uno de los mecanismos que participa en la neurotoxicidad producida por MDMA a largo plazo es la respuesta hipertérmica del organismo en las primeras horas tras la inyección de la droga [65]. Por ello, con el objetivo de determinar si alguno de los tratamientos administrados modificaba la hipertermia inducida por MDMA, se analizó la temperatura rectal de los animales durante las primeras 6 horas tras la inyección. Los resultados revelaron que ni el 680C91 ni el tratamiento con L-kinurenina y probenecid modificaron la hipertermia producida por la administración de MDMA, descartando así que los mecanismos de regulación de la temperatura corporal estuvieran involucrados.

En conjunto, los resultados obtenidos tras el tratamiento con el 680C91 y L-kinurenina evidencian la implicación de la enzima TDO en la activación de mecanismos neuroprotectores inducidos tras la administración de MDMA.

En condiciones fisiológicas, gran parte de la KYN sintetizada es utilizada por la enzima KMO, cuya ruta metabólica está dirigida al mantenimiento de las concentraciones de NAD^+ . El resto de KYN disponible es utilizada como sustrato en varias reacciones, siendo la ruta mediada por la enzima KAT una de las más importantes [12]. La utilización de KYN por ambas enzimas depende de su afinidad por el sustrato. En este sentido, aunque KMO presenta una K_m menor que la enzima KAT, la metabolización de KYN a través de esta última puede verse incrementada cuando la disponibilidad del sustrato es mayor o tras la inhibición de KMO [148, 157, 172, 316]. Para determinar si la administración de MDMA induce cambios en la expresión de KAT II, la isoforma de la enzima KAT más relevante en el SNC tanto en humanos como en ratas [12, 146, 316], y de KMO, se analizaron los niveles totales de ambas enzimas en hipocampo e hígado de ratas previamente tratadas con la

droga. El análisis de los datos no reveló diferencias en la expresión de KAT II y KMO en hipocampo tras la administración de MDMA a ninguno de los tiempos analizados al compararlos con el grupo control. Sin embargo, el análisis de la expresión de KMO en hígado mostró un aumento de sus niveles totales 3 h después de la administración de MDMA y una disminución a las 6 h. Se ha descrito que la expresión de KMO puede estar regulada a través de citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IFN- γ , incrementando o disminuyendo los niveles de esta enzima en función del tipo de citoquina [359]. Teniendo esto en consideración, es posible que las citoquinas inflamatorias producidas tras la administración de MDMA en tejido hepático puedan estar induciendo cambios sobre la expresión de KMO [110, 360]. Por el contrario, la expresión de KAT II en tejido hepático no se encontraba alterada tras la administración de MDMA a ninguno de los tiempos analizados, a pesar de que esta enzima también puede ser regulada por estímulos inflamatorios [183].

Para profundizar en la implicación de las enzimas KMO y KAT II en la metabolización de la KYN producida tras el tratamiento con MDMA, se administraron dos inhibidores específicos de ambas enzimas, Ro 61-8048 y PF-0485998 [306, 307], respectivamente, y se analizaron las concentraciones de KYN en hipocampo y plasma 3 h después del tratamiento con MDMA, momento en el cual el incremento de la concentración de KYN es máximo tanto a nivel central como en periferia. La administración del inhibidor de KMO (Ro 61-8048) potenció de manera significativa el incremento de los niveles de KYN inducido por el tratamiento con MDMA tanto en hipocampo como en plasma. Además, este mismo efecto fue observado en el grupo control que recibió únicamente el inhibidor, probablemente debido a que la enzima KMO metaboliza gran parte de la KYN sintetizada en condiciones fisiológicas [12]. Estos resultados son consistentes con los efectos

observados en otros trabajos, donde el uso de este mismo inhibidor produjo un incremento notable de las concentraciones de KYN en el SNC [361, 362]. No obstante, se ha observado que este compuesto no es capaz de atravesar la BHE [363], por lo que es posible que parte del incremento de KYN observado en hipocampo sea consecuencia del aumento de este metabolito a nivel periférico.

Por otro lado, la administración del inhibidor de KAT II (PF-04859989), potenció el aumento de la concentración de KYN inducida por MDMA en hipocampo, sin observarse ningún efecto sobre el grupo control que sólo recibió el inhibidor. En línea con estos datos, un trabajo previamente publicado por Cherian *et al.* [364] mostró que el tratamiento con PF-04859989 inducía un efecto inhibitorio de la actividad de KAT II cuando éste se administraba en ratas tratadas con una dosis de L-kinurenina en comparación con las ratas control que recibieron L-kinurenina. Sin embargo, la administración única del inhibidor no produjo ningún efecto significativo. En base a estas observaciones, este trabajo concluye que para inducir la actividad de KAT II es necesario un incremento de los niveles de KYN, debido a la menor afinidad de KAT por este metabolito en comparación con KMO, la vía principal de metabolización de KYN [148, 172, 316]. Teniendo en cuenta estas consideraciones, es posible que el incremento de KYN observado en el hipocampo de las ratas tratadas con el PF-04859989 y MDMA se produzca como resultado del bloqueo de la actividad de KAT II, sugiriendo que el aumento de KYN observado tras la inyección de la droga es capaz de inducir un incremento de la actividad de esta enzima en hipocampo. Por el contrario, no se observaron cambios en los niveles plasmáticos del metabolito a nivel periférico en ninguno de los grupos que recibió el inhibidor de KAT II probablemente debido a que otras isoformas de KAT adquieren un papel más relevante en la periferia [12].

Considerando que ambas enzimas, KMO y KAT II, pueden sintetizar, a partir de KYN, diferentes metabolitos como KYNA y QUINA capaces de participar en diversos mecanismos de protección [144] se emplearon los inhibidores anteriores, Ro 61-8048 y PF-04859989, con el objetivo de dilucidar su implicación en la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por MDMA 7 días después de su administración. El análisis de los resultados mostró que ninguno de los dos inhibidores empleados modificaba la neurotoxicidad inducida por MDMA ni en hipocampo ni en corteza frontal 7 días después del tratamiento. A diferencia de los datos mencionados previamente donde la administración conjunta de L-kinurenina y probenecid tenía como consecuencia una disminución del efecto neurotóxico derivado de la droga, el incremento observado de los niveles de KYN tras la administración de ambos inhibidores no indujo un efecto neuroprotector en ningún caso. Es posible que el uso del probenecid esté retrasando el aclaramiento de algunos de los metabolitos de la vía de kinurenina a nivel central responsables del efecto neuroprotector favoreciendo así su acumulación en el SNC [199, 222, 355, 356]. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que las enzimas KAT II y KMO no desempeñan un papel relevante en la neurotoxicidad derivada de la administración de la droga. No obstante, dado que ambas enzimas dan lugar a moléculas neuroactivas, futuros experimentos serán necesarios para profundizar en la implicación de estos metabolitos en el efecto neurotóxico inducido por MDMA a largo plazo.

En conclusión, los resultados mostrados en este bloque demuestran que la administración de MDMA promueve un incremento de los niveles de KYN a corto plazo a través de la activación de la enzima TDO hepática. El aumento de las concentraciones de este metabolito podría estar limitando el daño serotoninérgico derivado de la droga a través de la activación de distintos mecanismos directa o

indirectamente, actuando en este último caso como precursor de otros metabolitos neuroactivos pertenecientes a la vía de kinurenina.

2. Implicación de los receptores AhR en la neurotoxicidad inducida por MDMA

Los AhR son receptores citoplasmáticos cuya actividad depende de su unión con diferentes ligandos de naturaleza exógena o endógena [18, 233, 365-367]. Muchos de sus principales ligandos endógenos provienen del metabolismo del TRP, donde uno de los productos mayoritarios es KYN [13-15]. La unión de KYN con el AhR induce su traslocación al núcleo celular. Una vez allí, este complejo se une al factor de transcripción ARNT, formando un heterodímero capaz de interactuar con secuencias XRE e inducir así la expresión de diversos genes [231, 278, 368] cuya función está relacionada con fenómenos de estrés oxidativo, inflamación o el metabolismo de moléculas, entre otros [16, 17, 228]. Teniendo en cuenta estos hechos, y en base a los resultados previamente comentados donde se observó que la administración de MDMA indujo un incremento de KYN a corto plazo en hipocampo, se determinó el posible efecto del aumento de la concentración de este agonista sobre la actividad de AhR. Para ello, se analizó la traslocación nuclear de este receptor a través del análisis de su expresión en extractos nucleares y citoplasmáticos de hipocampo 1 y 3 h después de la administración de la droga. El tratamiento con MDMA indujo un incremento de la ratio núcleo-citoplasma de los AhR, coincidiendo con el aumento previamente observado de los niveles de KYN en esta área cerebral. Con el objetivo de confirmar si el incremento observado de la traslocación de AhR al núcleo celular estaba mediado por un mecanismo dependiente de ligando, se administró un antagonista específico de este receptor, el CH-223191,

[13, 259, 308], el cual es capaz de bloquear la unión de AhR con alguno de sus principales ligandos como KYN, impidiendo así su activación [260, 369]. El tratamiento con el CH-223191 atenuó el aumento de la traslocación nuclear de AhR observado en el hipocampo 3 h después de la inyección de MDMA, confirmando así que la activación de AhR producida tras la administración de la droga es debida principalmente a la unión del receptor con alguno de sus ligandos endógenos como KYN u otros metabolitos derivados del TRP [13, 15, 17, 219, 367, 370].

Con el objetivo de conocer si el aumento de la traslocación de AhR al núcleo celular tras el tratamiento con MDMA tenía como resultado un incremento de su actividad transcripcional, se analizó la expresión del gen CYP1B1, cuya regulación es dependiente del receptor [14, 276, 371]. El análisis de los datos reveló un aumento de los niveles de ARNm de CYP1B1 como resultado de la administración de la droga; en línea con otros trabajos donde observaron un aumento de la expresión de este gen y de otros dependientes de AhR como consecuencia de la activación del receptor mediada por la unión de KYN [14, 372]. Algunos autores han observado que el incremento de la expresión de AhR y de su cofactor en la función transcripcional ARNT tiene como resultado un efecto sinérgico que potencia la actividad del complejo resultante [373, 374]. Por ello, con el fin de determinar si el incremento de la actividad transcripcional de AhR inducido por la droga está en parte mediado por cambios en su expresión o en la de ARNT, se analizaron los niveles de ambas proteínas en homogenados totales de hipocampo. MDMA indujo un incremento de la expresión de AhR 3 h después de su administración, sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de ARNT. Estos resultados coinciden con otros trabajos previamente publicados [239, 243], donde se observó que el aumento de la expresión de AhR en determinados contextos tenía como consecuencia un incremento de la

actividad transcripcional del heterodímero a pesar de no observarse cambios en la expresión de ARNT.

En conjunto, estos resultados indican que la administración de MDMA induce la traslocación de AhR al núcleo celular posiblemente mediante el incremento de la concentración de su ligando endógeno KYN. El aumento de la presencia nuclear de AhR, así como de su expresión, tienen como consecuencia un incremento de su actividad transcripcional promoviendo la regulación de genes dependientes del receptor, como el CYP1B1.

Tradicionalmente, los AhR han sido descritos como inductores de una respuesta tóxica y carcinogénica derivada de la exposición a la dioxina TCDD [234], sin embargo, numerosas publicaciones han evidenciado que este receptor también posee un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis del organismo [16, 17, 229]. La función de AhR depende, en parte, del ligando encargado de activar al receptor, induciendo mecanismos de daño o protección celular dependiendo de si la activación es crónica o transitoria [17, 248, 249]. Así, la presencia de determinados agentes xenobióticos con una elevada afinidad por el receptor o el incremento mantenido de las concentraciones de distintos ligandos endógenos pueden activar AhR crónicamente, provocando la desregulación del receptor y, como consecuencia, la alteración de mecanismos celulares asociados al mantenimiento de la correcta función celular [13, 15, 375, 376]. Sin embargo, la activación aguda del receptor por alguno de sus ligandos endógenos u otros agonistas puede inducir mecanismos protectores frente a fenómenos inflamatorios o de daño oxidativo [269, 377, 378]. Por ello, con el fin de conocer si la activación aguda de AhR inducida tras la administración de MDMA ejerce un efecto neuroprotector a largo plazo, se antagonizó la traslocación nuclear del receptor con el compuesto utilizado

anteriormente el CH-223191 [13, 308] y se analizó la densidad de los SERT en hipocampo y corteza frontal. El bloqueo selectivo de AhR potenció la neurotoxicidad inducida a largo plazo por MDMA en ambas regiones cerebrales. Este efecto concuerda con los resultados mencionados previamente los cuales también mostraron un incremento del daño serotoninérgico producido por la droga al inducir la disminución de los niveles del ligando KYN mediante el inhibidor de la enzima TDO. Estos datos sugieren que la activación de los AhR podría participar en mecanismos neuroprotectores frente a la neurotoxicidad producida por la droga.

Para profundizar en esta hipótesis se empleó un agonista de AhR que presenta baja afinidad por el receptor, DIM [379]. A diferencia de otros agonistas con mayor afinidad por el AhR los cuales son capaces de inducir su activación crónicamente [380, 381], el DIM es capaz de activar al receptor con carácter transitorio [317-319], mostrando un efecto protector dependiente de AhR en diferentes modelos experimentales [269, 317, 319]. Los datos mostraron que el tratamiento con DIM previno parcialmente el daño serotoninérgico producido por MDMA en hipocampo y corteza frontal. Este efecto manifiesta una clara relación con los resultados observados tras la administración de L-kinurena, ligando de AhR, junto con probenecid, produciendo una disminución significativa de la neurotoxicidad inducida por la droga. En conjunto, los resultados indican que la activación de AhR observada en las primeras horas tras la inyección de MDMA limita el daño serotoninérgico a largo plazo inducido por la droga. No obstante, la administración de DIM podría estar produciendo un efecto protector independiente de AhR como se ha observado en modelos de la enfermedad de Parkinson [268], encefalomiелitis [320] y otros modelos experimentales [270, 271, 309, 382, 383] mediante la activación de mecanismos que disminuyen del estrés oxidativo [270, 309, 382, 383].

MDMA induce la formación inmediata de especies reactivas de oxígeno, reflejada por un aumento de la concentración de ácido 2,3-dihidroxibenzoico en el dializado cerebral [7, 102, 103]. En este sentido, varios estudios previos han observado que el incremento de radicales libres promueve un aumento de la transcripción de enzimas antioxidantes, como catalasa y HO-1, con el fin de minimizar el daño oxidativo [19-23]. El análisis de los resultados reveló un incremento de la expresión de las enzimas catalasa y HO-1 en hipocampo 3 h después de la inyección de la droga, aunque únicamente HO-1 manifestó un aumento significativo de su expresión a las 6 h. Este efecto sugiere que el incremento de la expresión de ambas enzimas antioxidantes podría ser consecuencia del estrés oxidativo inducido de forma inmediata tras la administración de la droga.

La relación entre el estrés oxidativo generado y la neurotoxicidad inducida por MDMA ha sido ampliamente demostrada en diferentes publicaciones mediante la administración del agente captador de radicales libres PBN [6] o de otros compuestos antioxidantes [7, 8], los cuales fueron capaces de disminuir el daño serotoninérgico asociado a la droga. En base a esto, y considerando que DIM previno parcialmente la neurotoxicidad inducida por MDMA en nuestro modelo animal, se determinó si DIM podría estar limitando el daño serotoninérgico en hipocampo mediante su capacidad como inductor de enzimas antioxidantes [228, 264, 270, 290, 384] o captador de radicales libres [24-27]. Sorprendentemente, la administración de DIM en nuestro modelo animal previno el incremento de la expresión de catalasa y de HO-1 inducido por MDMA a todos los tiempos analizados, lo que sugiere que DIM podría estar disminuyendo el estrés oxidativo inducido por la droga mediante su función como captador de radicales libres [24-27], contribuyendo así a la disminución de la neurotoxicidad observada.

Por otra parte, considerando que otro de los mecanismos que participa en la neurotoxicidad producida por MDMA a largo plazo es la respuesta hipertérmica del organismo en las primeras horas tras la inyección de la droga [65], se determinó si alguno de los tratamientos administrados, DIM y CH-223191 modificaban la hipertermia derivada de la administración de MDMA. Los resultados mostraron que el tratamiento con DIM no alteró la hipertermia producida por la droga, sin embargo, el antagonista CH-223191 indujo un incremento significativo de la hipertermia producida por MDMA 4 h después de la inyección de la droga. Aunque existe una relación entre la hipertermia aguda y la neurotoxicidad a largo plazo, MDMA es capaz de producir un efecto neurotóxico de forma independiente al efecto hipertérmico. Así, un estudio de nuestro grupo de investigación ha observado que la administración de L-DOPA indujo un incremento de la hipertermia inducida por MDMA sin alterar el efecto neurotóxico derivado de la droga [385]. Además, se ha observado que dosis altas de MDMA inducen un daño serotoninérgico en ausencia de una respuesta hipertérmica [386]. Por ello, aunque la hipertermia tiene un papel modulador, no se considera un factor esencial en el mecanismo neurotóxico inducido por la droga [65]. Teniendo estos hechos en consideración, el efecto observado de DIM y CH-223191 sobre la neurotoxicidad de MDMA parecen cursar de forma independiente a los mecanismos de regulación de la temperatura corporal.

En conjunto, estos datos sugieren que el efecto neuroprotector inducido tras la administración de DIM está relacionado con una disminución del estrés oxidativo producido tras la inyección de MDMA mediante su función como captador de radicales libres.

En conclusión, los resultados de esta Tesis Doctoral revelan que la administración de una dosis neurotóxica de MDMA en rata incrementa los niveles plasmáticos de KYN

a corto plazo a través de un aumento de la actividad de TDO hepática. Este efecto podría ser, en parte, responsable del aumento de la concentración de KYN en hipocampo y corteza, el cual desencadenaría mecanismos protectores limitando la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA mediante la activación de los receptores AhR. Además, la administración previa de DIM, agonista de AhR, protegió parcialmente de la neurotoxicidad producida por la droga a través de mecanismos que disminuyen el estrés oxidativo generado tras la inyección de MDMA a corto plazo. Los resultados de este estudio han permitido dilucidar un mecanismo protector frente a la neurotoxicidad inducida por una dosis elevada de MDMA que podría ser clave en el desarrollo de futuras terapias que puedan disminuir sus secuelas a largo plazo.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De los resultados presentados en esta tesis doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La administración de MDMA induce un incremento de los niveles de KYN a corto plazo a nivel central y periférico, en parte, a través de un aumento de la disponibilidad de TRP y de la actividad de la enzima TDO en hígado.
2. El incremento de la actividad de TDO induce la activación de mecanismos neuroprotectores que limitan el daño serotoninérgico a largo plazo producido por la administración de MDMA, posiblemente, mediante un aumento de las concentraciones de metabolitos neuroactivos derivados de la vía de kinurenina como la KYN.
3. La administración de MDMA produce un aumento de la actividad transcripcional de AhR a corto plazo que podría ser debida a la unión del receptor con alguno de sus ligandos endógenos como la KYN.
4. El bloqueo específico de AhR potencia el efecto neurotóxico inducido por MDMA a largo plazo, sugiriendo que la activación de estos receptores a corto plazo limita el daño serotoninérgico producido por la droga.
5. La administración de DIM, un agonista de los AhR, protege parcialmente frente al daño serotoninérgico inducido a largo plazo por MDMA. Este efecto neuroprotector mediado por DIM podría estar parcialmente relacionado con la disminución del estrés oxidativo producido en las primeras horas tras la administración de MDMA.

CONCLUSIONES

En conjunto, los resultados de la presente Tesis Doctoral revelan que la administración de una dosis neurotóxica de MDMA produce un aumento de la actividad de TDO y, como consecuencia, un incremento a corto plazo de la concentración de KYN en el cerebro el cual podría activar a los AhR limitando así la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Green, A.R., A.O. Mechan, J.M. Elliott, E. O'Shea, and M.I. Colado, *The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy")*. *Pharmacol Rev*, 2003. 55(3): p. 463-508.
2. Battaglia, G., S.Y. Yeh, E. O'Hearn, M.E. Molliver, M.J. Kuhar, and E.B. De Souza, *3,4-Methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine destroy serotonin terminals in rat brain: quantification of neurodegeneration by measurement of [3H]paroxetine-labeled serotonin uptake sites*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1987. 242(3): p. 911-6.
3. Colado, M.I., T.K. Murray, and A.R. Green, *5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine*. *Br J Pharmacol*, 1993. 108(3): p. 583-9.
4. 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.
5. O'Shea, E., R. Granados, B. Esteban, M.I. Colado, and A.R. Green, *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.
6. 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.
7. 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.
8. Gudelsky, G.A., *Effect of ascorbate and cysteine on the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced depletion of brain serotonin*. *J Neural Transm (Vienna)*, 1996. 103(12): p. 1397-404.
9. Bender, D.A., *Biochemistry of tryptophan in health and disease*. *Mol Aspects Med*, 1983. 6(2): p. 101-97.
10. Fujigaki, H., Y. Yamamoto, and K. Saito, *L-Tryptophan-kynurenine pathway enzymes are therapeutic target for neuropsychiatric diseases: Focus on cell type differences*. *Neuropharmacology*, 2017. 112(Pt B): p. 264-274.
11. O'Farrell, K. and A. Harkin, *Stress-related regulation of the kynurenine pathway: Relevance to neuropsychiatric and degenerative disorders*. *Neuropharmacology*, 2017. 112(Pt B): p. 307-323.

12. Badawy, A.A., *Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects*. Int J Tryptophan Res, 2017. 10: p. 1178646917691938.
13. Cuartero, M.I., I. Ballesteros, J. de la Parra, A.L. Harkin, A. Abautret-Daly, E. Sherwin, P. Fernandez-Salguero, A.L. Corbi, I. Lizasoain, and M.A. Moro, *L-kynurenine/aryl hydrocarbon receptor pathway mediates brain damage after experimental stroke*. Circulation, 2014. 130(23): p. 2040-51.
14. Mezrich, J.D., J.H. Fechner, X. Zhang, B.P. Johnson, W.J. Burlingham, and C.A. Bradfield, *An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells*. J Immunol, 2010. 185(6): p. 3190-8.
15. Opitz, C.A., U.M. Litzénburger, F. Sahm, M. Ott, I. Tritschler, S. Trump, T. Schumacher, L. Jestaedt, D. Schrenk, M. Weller, M. Jugold, G.J. Guillemin, C.L. Miller, C. Lutz, B. Radlwimmer, I. Lehmann, A. von Deimling, W. Wick, and M. Platten, *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2011. 478(7368): p. 197-203.
16. Dietrich, C., *Antioxidant Functions of the Aryl Hydrocarbon Receptor*. Stem Cells Int, 2016. 2016: p. 7943495.
17. Rothhammer, V. and F.J. Quintana, *The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2019. 19(3): p. 184-197.
18. Juricek, L. and X. Coumoul, *The Aryl Hydrocarbon Receptor and the Nervous System*. Int J Mol Sci, 2018. 19(9).
19. Le, W.D., W.J. Xie, and S.H. Appel, *Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury*. J Neurosci Res, 1999. 56(6): p. 652-8.
20. Yi, J.H. and A.S. Hazell, *N-acetylcysteine attenuates early induction of heme oxygenase-1 following traumatic brain injury*. Brain Res, 2005. 1033(1): p. 13-9.
21. Rohrdanz, E., G. Schmuck, S. Ohler, and R. Kahl, *The influence of oxidative stress on catalase and MnSOD gene transcription in astrocytes*. Brain Res, 2001. 900(1): p. 128-36.
22. Ishii, T., K. Itoh, S. Takahashi, H. Sato, T. Yanagawa, Y. Katoh, S. Bannai, and M. Yamamoto, *Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages*. J Biol Chem, 2000. 275(21): p. 16023-9.
23. Wassmann, S., K. Wassmann, and G. Nickenig, *Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells*. Hypertension, 2004. 44(4): p. 381-6.
24. Arnao, M.B., J. Sanchez-Bravo, and M. Acosta, *Indole-3-carbinol as a scavenger of free radicals*. Biochem Mol Biol Int, 1996. 39(6): p. 1125-34.

25. Herraiz, T. and J. Galisteo, *Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay*. Free Radic Res, 2004. 38(3): p. 323-31.
26. Benabadji, S.H., R. Wen, J.B. Zheng, X.C. Dong, and S.G. Yuan, *Anticarcinogenic and antioxidant activity of diindolylmethane derivatives*. Acta Pharmacol Sin, 2004. 25(5): p. 666-71.
27. Bloch-Mechkour, A., T. Bally, A. Sikora, R. Michalski, A. Marcinek, and J. Gebicki, *Radicals and radical ions derived from indole, indole-3-carbinol and diindolylmethane*. J Phys Chem A, 2010. 114(25): p. 6787-94.
28. Kalant, H., *The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs*. CMAJ, 2001. 165(7): p. 917-28.
29. Mithoefer, M.C., C.S. Grob, and T.D. Brewerton, *Novel psychopharmacological therapies for psychiatric disorders: psilocybin and MDMA*. Lancet Psychiatry, 2016. 3(5): p. 481-8.
30. Mithoefer, M.C., A.T. Mithoefer, A.A. Feduccia, L. Jerome, M. Wagner, J. Wymer, J. Holland, S. Hamilton, B. Yazar-Klosinski, A. Emerson, and R. Doblin, *3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-assisted psychotherapy for post-traumatic stress disorder in military veterans, firefighters, and police officers: a randomised, double-blind, dose-response, phase 2 clinical trial*. Lancet Psychiatry, 2018. 5(6): p. 486-497.
31. Ot'alara, G.M., J. Grigsby, B. Poulter, J.W. Van Derveer, 3rd, S.G. Giron, L. Jerome, A.A. Feduccia, S. Hamilton, B. Yazar-Klosinski, A. Emerson, M.C. Mithoefer, and R. Doblin, *3,4-Methylenedioxymethamphetamine-assisted psychotherapy for treatment of chronic posttraumatic stress disorder: A randomized phase 2 controlled trial*. J Psychopharmacol, 2018. 32(12): p. 1295-1307.
32. Mithoefer, M.C., A.A. Feduccia, L. Jerome, A. Mithoefer, M. Wagner, Z. Walsh, S. Hamilton, B. Yazar-Klosinski, A. Emerson, and R. Doblin, *MDMA-assisted psychotherapy for treatment of PTSD: study design and rationale for phase 3 trials based on pooled analysis of six phase 2 randomized controlled trials*. Psychopharmacology (Berl), 2019.
33. Hake, H.S., J.K.P. Davis, R.R. Wood, M.K. Tanner, E.C. Loetz, A. Sanchez, M. Ostrovskyy, E.B. Oleson, J. Grigsby, R. Doblin, and B.N. Greenwood, *3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) impairs the extinction and reconsolidation of fear memory in rats*. Physiol Behav, 2019. 199: p. 343-350.
34. Schenk, S. and D. Newcombe, *Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Psychiatry: Pros, Cons, and Suggestions*. J Clin Psychopharmacol, 2018. 38(6): p. 632-638.
35. 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.
36. Adam, D., *Origins of ecstasy an urban myth*. Nat Rev Drug Discov, 2006. 5(10): p. 806-7.

37. Anderson, G.M., 3rd, G. Braun, U. Braun, D.E. Nichols, and A.T. Shulgin, *Absolute configuration and psychotomimetic activity*. NIDA Res Monogr, 1978(22): p. 8-15.
38. Benzenhofer, U. and T. Passie, *Rediscovering MDMA (ecstasy): the role of the American chemist Alexander T. Shulgin*. Addiction, 2010. 105(8): p. 1355-61.
39. Ricaurte, G., G. Bryan, L. Strauss, L. Seiden, and C. Schuster, *Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals*. Science, 1985. 229(4717): p. 986-8.
40. Morimoto, B.H., S. Lovell, and B. Kahr, *Ecstasy: 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA)*. Acta Crystallogr C, 1998. 54 (Pt 2): p. 229-31.
41. Capela, J.P., H. Carmo, F. Remiao, M.L. Bastos, A. Meisel, and F. Carvalho, *Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: an overview*. Mol Neurobiol, 2009. 39(3): p. 210-71.
42. Johnson, M., A.A. Letter, K. Merchant, G.R. Hanson, and J.W. Gibb, *Effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine isomers on central serotonergic, dopaminergic and nigral neurotensin systems of the rat*. J Pharmacol Exp Ther, 1988. 244(3): p. 977-82.
43. Pitts, E.G., D.W. Curry, K.N. Hampshire, M.B. Young, and L.L. Howell, *(+/-)-MDMA and its enantiomers: potential therapeutic advantages of R(-)-MDMA*. Psychopharmacology (Berl), 2018. 235(2): p. 377-392.
44. Mounteney, J., P. Griffiths, A. Bo, A. Cunningham, J. Matias, and A. Pirona, *Nine reasons why ecstasy is not quite what it used to be*. Int J Drug Policy, 2018. 51: p. 36-41.
45. Caudevilla Galligo, F., *[Ecstasy: a review of scientific literature about MDMA]*. Med Clin (Barc), 2003. 120(13): p. 505-15.
46. Green, A.R., M.V. King, S.E. Shortall, and K.C. Fone, *Lost in translation: preclinical studies on 3,4-methylenedioxyamphetamine 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.
47. de la Torre, R., M. Farre, P.N. Roset, N. Pizarro, S. Abanades, M. Segura, J. Segura, and J. Cami, *Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition*. Ther Drug Monit, 2004. 26(2): p. 137-44.
48. Concheiro, M., M.H. Baumann, K.B. Scheidweiler, R.B. Rothman, G.F. Marrone, and M.A. Huestis, *Nonlinear pharmacokinetics of (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and its pharmacodynamic consequences in the rat*. Drug Metab Dispos, 2014. 42(1): p. 119-25.
49. Baumann, M.H., D. Zolkowska, I. Kim, K.B. Scheidweiler, R.B. Rothman, and M.A. Huestis, *Effects of dose and route of administration on pharmacokinetics of (+ or -)-3,4-methylenedioxyamphetamine in the rat*. Drug Metab Dispos, 2009. 37(11): p. 2163-70.

50. Meyer, J.S., *3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): current perspectives*. *Subst Abuse Rehabil*, 2013. 4: p. 83-99.
51. EMCDDA, *European drug report: Trends and developments*. 2018, Publications Office of the European Union Luxembourg.
52. Morefield, K.M., M. Keane, P. Felgate, J.M. White, and R.J. Irvine, *Pill content, dose and resulting plasma concentrations of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in recreational 'ecstasy' users*. *Addiction*, 2011. 106(7): p. 1293-300.
53. Gouzoulis-Mayfrank, E. and J. Daumann, *The confounding problem of polydrug use in recreational ecstasy/MDMA users: a brief overview*. *J Psychopharmacol*, 2006. 20(2): p. 188-93.
54. Drogas, D.d.G.d.E.p.e.P.N.s., *Informe EDADES 2017*. Disponible en: <http://www.pnsd.mscbs.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/home.htm>, 2017.
55. Aarde, S.M. and M.A. Taffe, *Predicting the Abuse Liability of Entactogen-Class, New and Emerging Psychoactive Substances via Preclinical Models of Drug Self-administration*. *Curr Top Behav Neurosci*, 2017. 32: p. 145-164.
56. Gould, R.W., H.D. Gage, M.L. Banks, B.L. Blaylock, P.W. Czoty, and M.A. Nader, *Differential effects of cocaine and MDMA self-administration on cortical serotonin transporter availability in monkeys*. *Neuropharmacology*, 2011. 61(1-2): p. 245-51.
57. Jansen, K.L., *Ecstasy (MDMA) dependence*. *Drug Alcohol Depend*, 1999. 53(2): p. 121-4.
58. Schenk, S., D. Gittings, M. Johnstone, and E. Daniela, *Development, maintenance and temporal pattern of self-administration maintained by ecstasy (MDMA) in rats*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2003. 169(1): p. 21-7.
59. Vollenweider, F.X., R.T. Jones, and M.J. Baggott, *Caveat emptor: editors beware*. *Neuropsychopharmacology*, 2001. 24(4): p. 461-3.
60. Green, A.R., J. Gabrielsson, C.A. Marsden, and K.C. Fone, *MDMA: on the translation from rodent to human dosing*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009. 204(2): p. 375-8.
61. Vizeli, P. and M.E. Liechti, *Safety pharmacology of acute MDMA administration in healthy subjects*. *J Psychopharmacol*, 2017. 31(5): p. 576-588.
62. Sessa, B., L. Higbed, and D. Nutt, *A Review of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-Assisted Psychotherapy*. *Front Psychiatry*, 2019. 10: p. 138.
63. Krebs, T.S., P.O. Johansen, L. Jerome, and J.H. Halpern, *Importance of psychiatric confounding in non-randomized studies of heavy ecstasy users*. *Psychol Med*, 2009. 39(5): p. 876-8.

64. Lyvers, M., *Recreational ecstasy use and the neurotoxic potential of MDMA: current status of the controversy and methodological issues*. Drug Alcohol Rev, 2006. 25(3): p. 269-76.
65. 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.
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. 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.
68. Goodwin, A.K., M. Mueller, C.D. Shell, G.A. Ricaurte, and N.A. Ator, *Behavioral effects and pharmacokinetics of (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) after intragastric administration to baboons*. J Pharmacol Exp Ther, 2013. 345(3): p. 342-53.
69. Kish, S.J., P.S. Fitzmaurice, I. Boileau, G.A. Schmunk, L.C. Ang, Y. Furukawa, L.J. Chang, D.J. Wickham, A. Sherwin, and J. Tong, *Brain serotonin transporter in human methamphetamine users*. Psychopharmacology (Berl), 2009. 202(4): p. 649-61.
70. Moratalla, R., A. Khairnar, N. Simola, N. Granado, J.R. Garcia-Montes, P.F. Porceddu, Y. Tizabi, G. Costa, and M. Morelli, *Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: Main mechanisms*. Prog Neurobiol, 2017. 155: p. 149-170.
71. Kish, S.J., Y. Furukawa, L. Ang, S.P. Vorce, and K.S. Kalasinsky, *Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (Ecstasy) user*. Neurology, 2000. 55(2): p. 294-6.
72. Buchert, R., R. Thomasius, B. Nebeling, K. Petersen, J. Obrocki, L. Jenicke, F. Wilke, L. Wartberg, P. Zapletalova, and M. Clausen, *Long-term effects of "ecstasy" use on serotonin transporters of the brain investigated by PET*. J Nucl Med, 2003. 44(3): p. 375-84.
73. Muller, F., R. Brandle, M.E. Liechti, and S. Borgwardt, *Neuroimaging of chronic MDMA ("ecstasy") effects: A meta-analysis*. Neurosci Biobehav Rev, 2019. 96: p. 10-20.
74. 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.
75. 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.
76. Di Iorio, C.R., T.J. Watkins, M.S. Dietrich, A. Cao, J.U. Blackford, B. Rogers, M.S. Ansari, R.M. Baldwin, R. Li, R.M. Kessler, R.M. Salomon, M. Benningfield, and R.L. Cowan, *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.
77. Mueller, M., J. Yuan, U.D. McCann, G. Hatzidimitriou, and G.A. Ricaurte, *Single oral doses of (+/-) 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.
 78. Ricaurte, G.A., L.E. DeLanney, S.G. Wiener, I. Irwin, and J.W. Langston, *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.
 79. Hatzidimitriou, G., U.D. McCann, and G.A. Ricaurte, *Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery*. J Neurosci, 1999. 19(12): p. 5096-107.
 80. Ricaurte, G.A., L.S. Forno, M.A. Wilson, L.E. DeLanney, I. Irwin, M.E. Molliver, and J.W. Langston, *(+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates*. JAMA, 1988. 260(1): p. 51-5.
 81. Kamilar-Britt, P. and G. Bedi, *The prosocial effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): Controlled studies in humans and laboratory animals*. Neurosci Biobehav Rev, 2015. 57: p. 433-46.
 82. 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.
 83. 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.
 84. Bonsignore, A., R. Barranco, A. Morando, G. Fraternali Orcioni, and F. Ventura, *MDMA Induced Cardio-toxicity and Pathological Myocardial Effects: A Systematic Review of Experimental Data and Autopsy Findings*. Cardiovasc Toxicol, 2019.
 85. Al-Dabbagh, S.G., J.R. Idle, and R.L. Smith, *Animal modelling of human polymorphic drug oxidation--the metabolism of debrisoquine and phenacetin in rat inbred strains*. J Pharm Pharmacol, 1981. 33(3): p. 161-4.
 86. Matsunaga, E., U.M. Zanger, J.P. Hardwick, H.V. Gelboin, U.A. Meyer, and F.J. Gonzalez, *The CYP2D gene subfamily: analysis of the molecular basis of the debrisoquine 4-hydroxylase deficiency in DA rats*. Biochemistry, 1989. 28(18): p. 7349-55.
 87. Cadet, J.L., N. Thiriet, and S. Jayanthi, *Involvement of free radicals in MDMA-induced neurotoxicity in mice*. Ann Med Interne (Paris), 2001. 152 Suppl 3: p. IS57-9.

88. Colado, M.I., J. Camarero, A.O. Mehan, V. Sanchez, B. Esteban, J.M. Elliott, and A.R. Green, *A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain*. *Br J Pharmacol*, 2001. 134(8): p. 1711-23.
89. O'Shea, E., B. Esteban, J. Camarero, A.R. Green, and M.I. Colado, *Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ('ecstasy') on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain*. *Neuropharmacology*, 2001. 40(1): p. 65-74.
90. Gudelsky, G.A. and B.K. Yamamoto, *Actions of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on cerebral dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2008. 90(2): p. 198-207.
91. Matsumoto, T., Y. Maeno, H. Kato, Y. Seko-Nakamura, J. Monma-Ohtaki, A. Ishiba, M. Nagao, and Y. Aoki, *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.
92. 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.
93. Leonardi, E.T. and E.C. Azmitia, *MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac)*. *Neuropsychopharmacology*, 1994. 10(4): p. 231-8.
94. Steuer, A.E., M.I. Boxler, L. Stock, and T. Kraemer, *Inhibition potential of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites on the in vitro monoamine oxidase (MAO)-catalyzed deamination of the neurotransmitters serotonin and dopamine*. *Toxicol Lett*, 2016. 243: p. 48-55.
95. O'Shea, E., L. Orio, I. Escobedo, V. Sanchez, J. Camarero, A.R. Green, and M.I. Colado, *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.
96. 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.
97. Orio, L., E. O'Shea, V. Sanchez, J.M. Pradillo, I. Escobedo, J. Camarero, M.A. Moro, A.R. Green, and M.I. Colado, *3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion*. *J Neurochem*, 2004. 89(6): p. 1445-53.
98. O'Shea, E., A. Urrutia, A.R. Green, and M.I. Colado, *Current preclinical studies on neuroinflammation and changes in blood-brain barrier integrity by MDMA and methamphetamine*. *Neuropharmacology*, 2014. 87: p. 125-34.

99. Rubio-Araiz, A., M. Perez-Hernandez, A. Urrutia, F. Porcu, E. Borcel, M.D. Gutierrez-Lopez, E. O'Shea, and M.I. Colado, *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.
100. Adori, C., R.D. Ando, G.G. Kovacs, and G. Bagdy, *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.
101. 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.
102. Colado, M.I., E. O'Shea, R. Granados, T.K. Murray, and A.R. Green, *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.
103. Escobedo, I., I. Peraile, L. Orio, M.I. Colado, and E. O'Shea, *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.
104. Schiavone, S., M. Neri, A.B. Maffione, P. Frisoni, M.G. Morgese, L. Trabace, and E. Turillazzi, *Increased iNOS and Nitrosative Stress in Dopaminergic Neurons of MDMA-Exposed Rats*. *Int J Mol Sci*, 2019. 20(5).
105. 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.
106. 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.
107. Colado, M.I., E. O'Shea, R. Granados, A. Misra, T.K. Murray, and A.R. Green, *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*, 1997. 121(4): p. 827-33.
108. Colado, M.I., E. O'Shea, B. Esteban, R. Granados, and A.R. Green, *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.
109. Song, B.J., K.H. Moon, V.V. Upreti, N.D. Eddington, and I.J. Lee, *Mechanisms of MDMA (ecstasy)-induced oxidative stress, mitochondrial*

- dysfunction, and organ damage*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010. 11(5): p. 434-43.
110. Cerretani, D., S. Bello, S. Cantatore, A.I. Fiaschi, G. Montefrancesco, M. Neri, C. Pomara, I. Riezzo, C. Fiore, A. Bonsignore, E. Turillazzi, and V. Fineschi, *Acute administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induces oxidative stress, lipoperoxidation and TNFalpha-mediated apoptosis in rat liver*. *Pharmacol Res*, 2011. 64(5): p. 517-27.
 111. Cerretani, D., I. Riezzo, A.I. Fiaschi, F. Centini, G. Giorgi, S. D'Errico, C. Fiore, S.B. Karch, M. Neri, C. Pomara, E. Turillazzi, and V. Fineschi, *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.
 112. Goni-Allo, B., O.M. B, M. Segura, E. Puerta, B. Lasheras, R. de la Torre, and N. Aguirre, *The relationship between core body temperature and 3,4-methylenedioxymethamphetamine metabolism in rats: implications for neurotoxicity*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2008. 197(2): p. 263-78.
 113. Green, A.R., E. O'Shea, K.S. Saadat, J.M. Elliott, and M.I. Colado, *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.
 114. 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.
 115. Ho, Y.J., C.R. Pawlak, L. Guo, and R.K. Schwarting, *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.
 116. Mechan, A.O., P.M. Moran, M. Elliott, A.J. Young, M.H. Joseph, and R. Green, *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.
 117. 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.
 118. McAleer, L.M., T. Schallert, and C.L. Duvauchelle, *Weekend Ecstasy use disrupts memory in rats*. *Neurosci Lett*, 2013. 549: p. 173-6.
 119. Huff, C., N. Bhide, A. Schroering, B.K. Yamamoto, and G.A. Gudelsky, *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.
 120. 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.

121. 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.
122. Molliver, M.E., U.V. Berger, L.A. Mamounas, D.C. Molliver, E. O'Hearn, and M.A. Wilson, *Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies*. Ann N Y Acad Sci, 1990. 600: p. 649-61; discussion 661-4.
123. Kovacs, G.G., R.D. Ando, C. Adori, E. Kirilly, A. Benedek, M. Palkovits, and G. Bagdy, *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.
124. Scanzello, C.R., G. Hatzidimitriou, A.L. Martello, J.L. Katz, and G.A. Ricaurte, *Serotonergic recovery after (+/-)3,4-(methylenedioxy) methamphetamine injury: observations in rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1993. 264(3): p. 1484-91.
125. Stone, D.M., G.R. Hanson, and J.W. Gibb, *Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats*. Neuropharmacology, 1987. 26(11): p. 1657-61.
126. 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.
127. Soleimani Asl, S., M.H. Farhadi, K. Moosavizadeh, A. Samadi Kuchak Saraei, M. Soleimani, S.B. Jamei, M.T. Joghataei, A. Samzadeh-Kermani, H. Hashemi-Nasl, and M. Mehdizadeh, *Evaluation of Bcl-2 Family Gene Expression in Hippocampus of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine Treated Rats*. Cell J, 2012. 13(4): p. 275-80.
128. Esteban, B., E. O'Shea, J. Camarero, V. Sanchez, A.R. Green, and M.I. Colado, *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.
129. Sabol, K.E., R. Lew, J.B. Richards, G.L. Vosmer, and L.S. Seiden, *Methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin deficits are followed by partial recovery over a 52-week period. Part I: Synaptosomal uptake and tissue concentrations*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. 276(2): p. 846-54.
130. Fischer, C., G. Hatzidimitriou, J. Wlos, J. Katz, and G. Ricaurte, *Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy")*. J Neurosci, 1995. 15(8): p. 5476-85.
131. Farfel, G.M. and L.S. Seiden, *Role of hypothermia in the mechanism of protection against serotonergic toxicity. I. Experiments using 3,4-methylenedioxymethamphetamine, dizocilpine, CGS 19755 and NBQX*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. 272(2): p. 860-7.

132. Orio, L., N. Llopis, E. Torres, M. Izco, E. O'Shea, and M.I. Colado, *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.
133. O'Shea, E., V. Sanchez, L. Orio, I. Escobedo, A.R. Green, and M.I. Colado, *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.
134. Sanchez, V., J. Camarero, B. Esteban, M.J. Peter, A.R. Green, and M.I. Colado, *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.
135. Cervenka, I., L.Z. Agudelo, and J.L. Ruas, *Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health*. Science, 2017. 357(6349).
136. Schwarcz, R. and T.W. Stone, *The kynurenine pathway and the brain: Challenges, controversies and promises*. Neuropharmacology, 2017. 112(Pt B): p. 237-247.
137. Bender, D.A., B.I. Magboul, and D. Wynick, *Probable mechanisms of regulation of the utilization of dietary tryptophan, nicotinamide and nicotinic acid as precursors of nicotinamide nucleotides in the rat*. Br J Nutr, 1982. 48(1): p. 119-27.
138. Williams, J.N., Jr., P. Feigelson, and C.A. Elvehjem, *Relation of tryptophan and niacin to pyridine nucleotides of tissue*. J Biol Chem, 1950. 187(2): p. 597-604.
139. Mukherjee, S.K., L.K. Klaidman, R. Yasharel, and J.D. Adams, Jr., *Increased brain NAD prevents neuronal apoptosis in vivo*. Eur J Pharmacol, 1997. 330(1): p. 27-34.
140. Sahm, F., I. Oezen, C.A. Opitz, B. Radlwimmer, A. von Deimling, T. Ahrendt, S. Adams, H.B. Bode, G.J. Guillemin, W. Wick, and M. Platten, *The endogenous tryptophan metabolite and NAD+ precursor quinolinic acid confers resistance of gliomas to oxidative stress*. Cancer Res, 2013. 73(11): p. 3225-34.
141. Badawy, A.A., *Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness*. J Psychopharmacol, 2013. 27(10): p. 878-93.
142. Maddison, D.C. and F. Giorgini, *The kynurenine pathway and neurodegenerative disease*. Semin Cell Dev Biol, 2015. 40: p. 134-41.
143. Baumgartner, R., M.J. Forteza, and D.F.J. Ketelhuth, *The interplay between cytokines and the Kynurenine pathway in inflammation and atherosclerosis*. Cytokine, 2017.

144. Schwarcz, R., J.P. Bruno, P.J. Muchowski, and H.Q. Wu, *Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology*. *Nat Rev Neurosci*, 2012. 13(7): p. 465-77.
145. Gal, E.M. and A.D. Sherman, *Synthesis and metabolism of L-kynurenine in rat brain*. *J Neurochem*, 1978. 30(3): p. 607-13.
146. Guillemain, G.J., K.M. Cullen, C.K. Lim, G.A. Smythe, B. Garner, V. Kapoor, O. Takikawa, and B.J. Brew, *Characterization of the kynurenine pathway in human neurons*. *J Neurosci*, 2007. 27(47): p. 12884-92.
147. Haber, R., D. Bessette, B. Hulihan-Giblin, M.J. Durcan, and D. Goldman, *Identification of tryptophan 2,3-dioxygenase RNA in rodent brain*. *J Neurochem*, 1993. 60(3): p. 1159-62.
148. Guidetti, P., E. Okuno, and R. Schwarcz, *Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II*. *J Neurosci Res*, 1997. 50(3): p. 457-65.
149. Dale, W.E., Y. Dang, and O.R. Brown, *Tryptophan metabolism through the kynurenine pathway in rat brain and liver slices*. *Free Radic Biol Med*, 2000. 29(2): p. 191-8.
150. Forouhar, F., J.L. Anderson, C.G. Mowat, S.M. Vorobiev, A. Hussain, M. Abashidze, C. Bruckmann, S.J. Thackray, J. Seetharaman, T. Tucker, R. Xiao, L.C. Ma, L. Zhao, T.B. Acton, G.T. Montelione, S.K. Chapman, and L. Tong, *Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(2): p. 473-8.
151. Badawy, A.A. and M. Evans, *Regulation of rat liver tryptophan pyrrolase by its cofactor haem: Experiments with haematin and 5-aminolaevulinate and comparison with the substrate and hormonal mechanisms*. *Biochem J*, 1975. 150(3): p. 511-20.
152. Green, A.R., H.F. Woods, and M.H. Joseph, *Tryptophan metabolism in the isolated perfused liver of the rat: effects of tryptophan concentration, hydrocortisone and allopurinol on tryptophan pyrrolase activity and kynurenine formation*. *Br J Pharmacol*, 1976. 57(1): p. 103-14.
153. Ren, S. and M.A. Correia, *Heme: a regulator of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase?* *Arch Biochem Biophys*, 2000. 377(1): p. 195-203.
154. Nakamura, T., S. Niimi, K. Nawa, C. Noda, A. Ichihara, Y. Takagi, M. Anai, and Y. Sakaki, *Multihormonal regulation of transcription of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene in primary cultures of adult rat hepatocytes with special reference to the presence of a transcriptional protein mediating the action of glucocorticoids*. *J Biol Chem*, 1987. 262(2): p. 727-33.
155. Danesch, U., S. Hashimoto, R. Renkawitz, and G. Schutz, *Transcriptional regulation of the tryptophan oxygenase gene in rat liver by glucocorticoids*. *J Biol Chem*, 1983. 258(8): p. 4750-3.

156. Cho-Chung, Y.S. and H.C. Pitot, *Feedback control of rat liver tryptophan pyrrolase. I. End product inhibition of tryptophan pyrrolase activity.* J Biol Chem, 1967. 242(6): p. 1192-8.
157. Badawy, A.A. and S. Bano, *Tryptophan Metabolism in Rat Liver After Administration of Tryptophan, Kynurenine Metabolites, and Kynureninase Inhibitors.* Int J Tryptophan Res, 2016. 9: p. 51-65.
158. Fujiwara, M., M. Shibata, Y. Watanabe, T. Nukiwa, F. Hirata, N. Mizuno, and O. Hayaishi, *Indoleamine 2,3-dioxygenase. Formation of L-kynurenine from L-tryptophan in cultured rabbit pineal gland.* J Biol Chem, 1978. 253(17): p. 6081-5.
159. Shimizu, T., S. Nomiya, F. Hirata, and O. Hayaishi, *Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties.* J Biol Chem, 1978. 253(13): p. 4700-6.
160. Cook, J.S., C.I. Pogson, and S.A. Smith, *Indoleamine 2,3-dioxygenase. A new, rapid, sensitive radiometric assay and its application to the study of the enzyme in rat tissues.* Biochem J, 1980. 189(3): p. 461-6.
161. Ozaki, Y., J.F. Reinhard, Jr., and C.A. Nichol, *Cofactor activity of dihydroflavin mononucleotide and tetrahydrobiopterin for murine epididymal indoleamine 2,3-dioxygenase.* Biochem Biophys Res Commun, 1986. 137(3): p. 1106-11.
162. Sugimoto, H., S. Oda, T. Otsuki, T. Hino, T. Yoshida, and Y. Shiro, *Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(8): p. 2611-6.
163. Jusof, F.F., S.M. Bakmiwewa, S. Weiser, L.K. Too, R. Metz, G.C. Prendergast, S.T. Fraser, N.H. Hunt, and H.J. Ball, *Investigation of the Tissue Distribution and Physiological Roles of Indoleamine 2,3-Dioxygenase-2.* Int J Tryptophan Res, 2017. 10: p. 1178646917735098.
164. Meininger, D., L. Zalameda, Y. Liu, L.P. Stepan, L. Borges, J.D. McCarter, and C.L. Sutherland, *Purification and kinetic characterization of human indoleamine 2,3-dioxygenases 1 and 2 (IDO1 and IDO2) and discovery of selective IDO1 inhibitors.* Biochim Biophys Acta, 2011. 1814(12): p. 1947-54.
165. Metz, R., C. Smith, J.B. DuHadaway, P. Chandler, B. Baban, L.M. Merlo, E. Pigott, M.P. Keough, S. Rust, A.L. Mellor, L. Mandik-Nayak, A.J. Muller, and G.C. Prendergast, *IDO2 is critical for IDO1-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation.* Int Immunol, 2014. 26(7): p. 357-67.
166. Pfefferkorn, E.R., S. Rebhun, and M. Eckel, *Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts.* J Interferon Res, 1986. 6(3): p. 267-79.
167. Ozaki, Y., M.P. Edelstein, and D.S. Duch, *The actions of interferon and antiinflammatory agents of induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in*

- human peripheral blood monocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 144(3): p. 1147-53.
168. Hu, B., B.D. Hissong, and J.M. Carlin, *Interleukin-1 enhances indoleamine 2,3-dioxygenase activity by increasing specific mRNA expression in human mononuclear phagocytes*. *J Interferon Cytokine Res*, 1995. 15(7): p. 617-24.
169. Hwang, S.L., N.P. Chung, J.K. Chan, and C.L. Lin, *Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines*. *Cell Res*, 2005. 15(3): p. 167-75.
170. Alberati-Giani, D., A.M. Cesura, C. Broger, W.D. Warren, S. Rover, and P. Malherbe, *Cloning and functional expression of human kynurenine 3-monooxygenase*. *FEBS Lett*, 1997. 410(2-3): p. 407-12.
171. Amaral, M., C. Levy, D.J. Heyes, P. Lafite, T.F. Outeiro, F. Giorgini, D. Leys, and N.S. Scrutton, *Structural basis of kynurenine 3-monooxygenase inhibition*. *Nature*, 2013. 496(7445): p. 382-5.
172. Bender, D.A. and G.M. McCreanor, *The preferred route of kynurenine metabolism in the rat*. *Biochim Biophys Acta*, 1982. 717(1): p. 56-60.
173. Connor, T.J., N. Starr, J.B. O'Sullivan, and A. Harkin, *Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma?* *Neurosci Lett*, 2008. 441(1): p. 29-34.
174. Molteni, R., F. Macchi, C. Zecchillo, M. Dell'agli, E. Colombo, F. Calabrese, G. Guidotti, G. Racagni, and M.A. Riva, *Modulation of the inflammatory response in rats chronically treated with the antidepressant agomelatine*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2013. 23(11): p. 1645-55.
175. Zunszain, P.A., C. Anacker, A. Cattaneo, S. Choudhury, K. Musaelyan, A.M. Myint, S. Thuret, J. Price, and C.M. Pariante, *Interleukin-1beta: a new regulator of the kynurenine pathway affecting human hippocampal neurogenesis*. *Neuropsychopharmacology*, 2012. 37(4): p. 939-49.
176. Verjee, Z.H., *Tryptophan metabolism in baboons: effect of riboflavin and pyridoxine deficiency*. *Acta Vitaminol Enzymol*, 1975. 29(1-6): p. 198-201.
177. Chiarugi, A., R. Carpenedo, M.T. Molina, L. Mattoli, R. Pellicciari, and F. Moroni, *Comparison of the neurochemical and behavioral effects resulting from the inhibition of kynurenine hydroxylase and/or kynureninase*. *J Neurochem*, 1995. 65(3): p. 1176-83.
178. Han, Q., T. Cai, D.A. Tagle, H. Robinson, and J. Li, *Substrate specificity and structure of human aminoadipate aminotransferase/kynurenine aminotransferase II*. *Biosci Rep*, 2008. 28(4): p. 205-15.
179. Han, Q., T. Cai, D.A. Tagle, and J. Li, *Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains*. *Cell Mol Life Sci*, 2010. 67(3): p. 353-68.
180. Yu, P., N.A. Di Prospero, M.T. Sapko, T. Cai, A. Chen, M. Melendez-Ferro, F. Du, W.O. Whetsell, Jr., P. Guidetti, R. Schwarcz, and D.A. Tagle,

- Biochemical and phenotypic abnormalities in kynurenine aminotransferase II-deficient mice.* Mol Cell Biol, 2004. 24(16): p. 6919-30.
181. Takeuchi, F. and Y. Shibata, *Kynurenine metabolism in vitamin-B-6-deficient rat liver after tryptophan injection.* Biochem J, 1984. 220(3): p. 693-9.
 182. Adams, S., C. Teo, K.L. McDonald, A. Zinger, S. Bustamante, C.K. Lim, G. Sundaram, N. Braidy, B.J. Brew, and G.J. Guillemin, *Involvement of the kynurenine pathway in human glioma pathophysiology.* PLoS One, 2014. 9(11): p. e112945.
 183. Song, C., S.M. Clark, C.N. Vaughn, J.D. Nicholson, K.J. Murphy, T.M. Mou, R. Schwarcz, G.E. Hoffman, and L.H. Tonelli, *Quantitative Analysis of Kynurenine Aminotransferase II in the Adult Rat Brain Reveals High Expression in Proliferative Zones and Corpus Callosum.* Neuroscience, 2018. 369: p. 1-14.
 184. Oxenkrug, G., *Serotonin-kynurenine hypothesis of depression: historical overview and recent developments.* Curr Drug Targets, 2013. 14(5): p. 514-21.
 185. Badawy, A.A., *Plasma free tryptophan revisited: what you need to know and do before measuring it.* J Psychopharmacol, 2010. 24(6): p. 809-15.
 186. Knott, P.J. and G. Curzon, *Free tryptophan in plasma and brain tryptophan metabolism.* Nature, 1972. 239(5373): p. 452-3.
 187. Smith, S.A. and C.I. Pogson, *The metabolism of L-tryptophan by isolated rat liver cells. Effect of albumin binding and amino acid competition on oxidation of tryptophan by tryptophan 2,3-dioxygenase.* Biochem J, 1980. 186(3): p. 977-86.
 188. Badawy, A.A., *Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging, exercise, diet and nutritional supplements.* Neuropharmacology, 2017. 112(Pt B): p. 248-263.
 189. Takao, Y., Y. Kamisaki, and T. Itoh, *Beta-adrenergic regulation of amine precursor amino acid transport across the blood-brain barrier.* Eur J Pharmacol, 1992. 215(2-3): p. 245-51.
 190. Eriksson, T. and A. Carlsson, *Beta-adrenergic control of brain uptake of large neutral amino acids.* Life Sci, 1988. 42(17): p. 1583-9.
 191. Edwards, D.J., D.A. Sorisio, and S. Knopf, *Effects of the beta 2-adrenoceptor agonist clenbuterol on tyrosine and tryptophan in plasma and brain of the rat.* Biochem Pharmacol, 1989. 38(18): p. 2957-65.
 192. Nigam, S.K., K.T. Bush, G. Martovetsky, S.Y. Ahn, H.C. Liu, E. Richard, V. Bhatnagar, and W. Wu, *The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective.* Physiol Rev, 2015. 95(1): p. 83-123.
 193. Wu, W., K.T. Bush, and S.K. Nigam, *Key Role for the Organic Anion Transporters, OAT1 and OAT3, in the in vivo Handling of Uremic Toxins and Solutes.* Sci Rep, 2017. 7(1): p. 4939.

194. Bahn, A., M. Ljubojevic, H. Lorenz, C. Schultz, E. Ghebremedhin, B. Ugele, I. Sabolic, G. Burckhardt, and Y. Hagos, *Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005. 289(5): p. C1075-84.
195. Altman, K. and O. Greengard, *Correlation of kynurenine excretion with liver tryptophan pyrrolase levels in disease and after hydrocortisone induction*. *J Clin Invest*, 1966. 45(10): p. 1527-34.
196. Takikawa, O., R. Yoshida, R. Kido, and O. Hayaishi, *Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase*. *J Biol Chem*, 1986. 261(8): p. 3648-53.
197. Michael, A.F., K.N. Drummond, D. Doeden, J.A. Anderson, and R.A. Good, *Tryptophan Metabolism in Man*. *J Clin Invest*, 1964. 43: p. 1730-46.
198. Morrison, P.F., G.M. Morishige, K.E. Beagles, and M.P. Heyes, *Quinolinic acid is extruded from the brain by a probenecid-sensitive carrier system: a quantitative analysis*. *J Neurochem*, 1999. 72(5): p. 2135-44.
199. Miller, J.M., U. MacGarvey, and M.F. Beal, *The effect of peripheral loading with kynurenine and probenecid on extracellular striatal kynurenic acid concentrations*. *Neurosci Lett*, 1992. 146(1): p. 115-8.
200. Fukui, S., R. Schwarcz, S.I. Rapoport, Y. Takada, and Q.R. Smith, *Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism*. *J Neurochem*, 1991. 56(6): p. 2007-17.
201. Boado, R.J., J.Y. Li, M. Nagaya, C. Zhang, and W.M. Pardridge, *Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(21): p. 12079-84.
202. Geier, E.G., A. Schlessinger, H. Fan, J.E. Gable, J.J. Irwin, A. Sali, and K.M. Giacomini, *Structure-based ligand discovery for the Large-neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(14): p. 5480-5.
203. Sekine, A., Y. Kuroki, T. Urata, N. Mori, and T. Fukuwatari, *Inhibition of Large Neutral Amino Acid Transporters Suppresses Kynurenic Acid Production Via Inhibition of Kynurenine Uptake in Rodent Brain*. *Neurochem Res*, 2016. 41(9): p. 2256-66.
204. Gal, E.M. and A.D. Sherman, *L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain*. *Neurochem Res*, 1980. 5(3): p. 223-39.
205. Gonzalez Esquivel, D., D. Ramirez-Ortega, B. Pineda, N. Castro, C. Rios, and V. Perez de la Cruz, *Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions*. *Neuropharmacology*, 2017. 112(Pt B): p. 331-345.
206. Vogel, C.F., E. Sciallo, W. Li, P. Wong, G. Lazennec, and F. Matsumura, *RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription*. *Mol Endocrinol*, 2007. 21(12): p. 2941-55.

207. Stone, T.W., *Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids*. Pharmacol Rev, 1993. 45(3): p. 309-79.
208. Schwarcz, R. and F. Du, *Quinolinic acid and kynurenic acid in the mammalian brain*. Adv Exp Med Biol, 1991. 294: p. 185-99.
209. Nishizuka, Y. and O. Hayaishi, *Enzymic synthesis of niacin nucleotides from 3-hydroxyanthranilic acid in mammalian liver*. J Biol Chem, 1963. 238: p. 483-5.
210. Vandresen-Filho, S., W.C. Martins, D.B. Bertoldo, G. Mancini, A.F. De Bem, and C.I. Tasca, *Cerebral cortex, hippocampus, striatum and cerebellum show differential susceptibility to quinolinic acid-induced oxidative stress*. Neurol Sci, 2015. 36(8): p. 1449-56.
211. Albuquerque, E.X. and R. Schwarcz, *Kynurenic acid as an antagonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the brain: facts and challenges*. Biochem Pharmacol, 2013. 85(8): p. 1027-32.
212. Foster, A.C., A. Vezzani, E.D. French, and R. Schwarcz, *Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid*. Neurosci Lett, 1984. 48(3): p. 273-8.
213. Nozaki, K. and M.F. Beal, *Neuroprotective effects of L-kynurenine on hypoxia-ischemia and NMDA lesions in neonatal rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1992. 12(3): p. 400-7.
214. Lugo-Huitron, R., T. Blanco-Ayala, P. Ugalde-Muniz, P. Carrillo-Mora, J. Pedraza-Chaverri, D. Silva-Adaya, P.D. Maldonado, I. Torres, E. Pinzon, E. Ortiz-Islas, T. Lopez, E. Garcia, B. Pineda, M. Torres-Ramos, A. Santamaria, and V.P. La Cruz, *On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress*. Neurotoxicol Teratol, 2011. 33(5): p. 538-47.
215. Stone, T.W., N. Stoy, and L.G. Darlington, *An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan*. Trends Pharmacol Sci, 2013. 34(2): p. 136-43.
216. Erhardt, S., K. Blennow, C. Nordin, E. Skogh, L.H. Lindstrom, and G. Engberg, *Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia*. Neurosci Lett, 2001. 313(1-2): p. 96-8.
217. Schwarcz, R., A. Rassoulpour, H.Q. Wu, D. Medoff, C.A. Tamminga, and R.C. Roberts, *Increased cortical kynurenate content in schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2001. 50(7): p. 521-30.
218. Erhardt, S., L. Schwieler, S. Imbeault, and G. Engberg, *The kynurenine pathway in schizophrenia and bipolar disorder*. Neuropharmacology, 2017. 112(Pt B): p. 297-306.
219. DiNatale, B.C., I.A. Murray, J.C. Schroeder, C.A. Flaveny, T.S. Lahoti, E.M. Laurenzana, C.J. Omiecinski, and G.H. Perdew, *Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling*. Toxicol Sci, 2010. 115(1): p. 89-97.

220. Alkondon, M., E.F. Pereira, S.W. Todd, W.R. Randall, M.V. Lane, and E.X. Albuquerque, *Functional G-protein-coupled receptor 35 is expressed by neurons in the CA1 field of the hippocampus*. *Biochem Pharmacol*, 2015. 93(4): p. 506-18.
221. Bohar, Z., J. Toldi, F. Fulop, and L. Vecsei, *Changing the face of kynurenines and neurotoxicity: therapeutic considerations*. *Int J Mol Sci*, 2015. 16(5): p. 9772-93.
222. Sas, K., H. Robotka, E. Rozsa, M. Agoston, G. Szenasi, G. Gigler, M. Marosi, Z. Kis, T. Farkas, L. Vecsei, and J. Toldi, *Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus*. *Neurobiol Dis*, 2008. 32(2): p. 302-8.
223. Robotka, H., K. Sas, M. Agoston, E. Rozsa, G. Szenasi, G. Gigler, L. Vecsei, and J. Toldi, *Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate*. *Life Sci*, 2008. 82(17-18): p. 915-9.
224. Hattori, M., Y. Kotake, and Y. Kotake, *Studies on the urinary excretion of xanthurenic acid in diabetics*. *Acta Vitaminol Enzymol*, 1984. 6(3): p. 221-8.
225. Huang, J.Y., L.M. Butler, O. Midttun, A. Ulvik, R. Wang, A. Jin, Y.T. Gao, P.M. Ueland, W.P. Koh, and J.M. Yuan, *A prospective evaluation of serum kynurenine metabolites and risk of pancreatic cancer*. *PLoS One*, 2018. 13(5): p. e0196465.
226. Schwarz, M.J., G.J. Guillemin, S.J. Teipel, K. Buerger, and H. Hampel, *Increased 3-hydroxykynurenine serum concentrations differentiate Alzheimer's disease patients from controls*. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 2013. 263(4): p. 345-52.
227. Wolowczuk, I., B. Hennart, A. Leloire, A. Bessedé, M. Soichot, S. Taront, R. Caiazzo, V. Raverdy, M. Pigeyre, A. Consortium, G.J. Guillemin, D. Allorge, F. Pattou, P. Froguel, and O. Poulain-Godefroy, *Tryptophan metabolism activation by indoleamine 2,3-dioxygenase in adipose tissue of obese women: an attempt to maintain immune homeostasis and vascular tone*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012. 303(2): p. R135-43.
228. Kohle, C. and K.W. Bock, *Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2*. *Biochem Pharmacol*, 2007. 73(12): p. 1853-62.
229. Neavin, D.R., D. Liu, B. Ray, and R.M. Weinshilboum, *The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) in Immune and Inflammatory Diseases*. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(12).
230. Rothhammer, V., D.M. Borucki, M.I. Garcia Sanchez, M.A. Mazzola, C.C. Hemond, K. Regev, A. Paul, P. Kivisakk, R. Bakshi, G. Izquierdo, H.L. Weiner, and F.J. Quintana, *Dynamic regulation of serum aryl hydrocarbon receptor agonists in MS*. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2017. 4(4): p. e359.
231. Beischlag, T.V., J. Luis Morales, B.D. Hollingshead, and G.H. Perdew, *The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression*. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2008. 18(3): p. 207-50.

232. Puga, A., C. Ma, and J.L. Marlowe, *The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways*. *Biochem Pharmacol*, 2009. 77(4): p. 713-22.
233. Denison, M.S. and S.R. Nagy, *Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003. 43: p. 309-34.
234. Hankinson, O., *The aryl hydrocarbon receptor complex*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1995. 35: p. 307-40.
235. Wu, D., N. Potluri, Y. Kim, and F. Rastinejad, *Structure and dimerization properties of the aryl hydrocarbon receptor PAS-A domain*. *Mol Cell Biol*, 2013. 33(21): p. 4346-56.
236. Carver, L.A., J.B. Hogenesch, and C.A. Bradfield, *Tissue specific expression of the rat Ah-receptor and ARNT mRNAs*. *Nucleic Acids Res*, 1994. 22(15): p. 3038-44.
237. Yamamoto, J., K. Ihara, H. Nakayama, S. Hikino, K. Satoh, N. Kubo, T. Iida, Y. Fujii, and T. Hara, *Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells*. *Life Sci*, 2004. 74(8): p. 1039-49.
238. Kainu, T., J.A. Gustafsson, and M. Pelto-Huikko, *The dioxin receptor and its nuclear translocator (Arnt) in the rat brain*. *Neuroreport*, 1995. 6(18): p. 2557-60.
239. Brauze, D., M. Widerak, J. Cwykiel, K. Szyfter, and W. Baer-Dubowska, *The effect of aryl hydrocarbon receptor ligands on the expression of AhR, AhRR, ARNT, Hif1alpha, CYP1A1 and NQO1 genes in rat liver*. *Toxicol Lett*, 2006. 167(3): p. 212-20.
240. Petersen, S.L., M.A. Curran, S.A. Marconi, C.D. Carpenter, L.S. Lubbers, and M.D. McAbee, *Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem*. *J Comp Neurol*, 2000. 427(3): p. 428-39.
241. Xu, K., Z. Yang, R. Shi, C. Luo, and Z. Zhang, *Expression of aryl hydrocarbon receptor in rat brain lesions following traumatic brain injury*. *Diagn Pathol*, 2016. 11(1): p. 72.
242. Kitamura, Y., K. Takata, J. Kakimura, M. Umeki, S. Azukawa, S. Suzuki, and T. Taniguchi, *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator is induced by kainic acid in rat hippocampal glial cells*. *Neurosci Lett*, 2000. 291(2): p. 117-20.
243. Memari, B., M. Bouttier, V. Dimitrov, M. Ouellette, M.A. Behr, J.H. Fritz, and J.H. White, *Engagement of the Aryl Hydrocarbon Receptor in Mycobacterium tuberculosis-Infected Macrophages Has Pleiotropic Effects on Innate Immune Signaling*. *J Immunol*, 2015. 195(9): p. 4479-91.
244. Pandini, A., M.S. Denison, Y. Song, A.A. Soshilov, and L. Bonati, *Structural and functional characterization of the aryl hydrocarbon receptor ligand*

- binding domain by homology modeling and mutational analysis.* Biochemistry, 2007. 46(3): p. 696-708.
245. Tijet, N., P.C. Boutros, I.D. Moffat, A.B. Okey, J. Tuomisto, and R. Pohjanvirta, *Aryl hydrocarbon receptor regulates distinct dioxin-dependent and dioxin-independent gene batteries.* Mol Pharmacol, 2006. 69(1): p. 140-53.
246. Ohtake, F., A. Baba, I. Takada, M. Okada, K. Iwasaki, H. Miki, S. Takahashi, A. Kouzmenko, K. Nohara, T. Chiba, Y. Fujii-Kuriyama, and S. Kato, *Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase.* Nature, 2007. 446(7135): p. 562-6.
247. Luecke-Johansson, S., M. Gralla, H. Rundqvist, J.C. Ho, R.S. Johnson, K. Gradin, and L. Poellinger, *A Molecular Mechanism To Switch the Aryl Hydrocarbon Receptor from a Transcription Factor to an E3 Ubiquitin Ligase.* Mol Cell Biol, 2017. 37(13).
248. Guyot, E., A. Chevallier, R. Barouki, and X. Coumoul, *The AhR twist: ligand-dependent AhR signaling and pharmaco-toxicological implications.* Drug Discov Today, 2013. 18(9-10): p. 479-86.
249. Mitchell, K.A. and C.J. Elferink, *Timing is everything: consequences of transient and sustained AhR activity.* Biochem Pharmacol, 2009. 77(6): p. 947-56.
250. Furness, S.G., M.J. Lees, and M.L. Whitelaw, *The dioxin (aryl hydrocarbon) receptor as a model for adaptive responses of bHLH/PAS transcription factors.* FEBS Lett, 2007. 581(19): p. 3616-25.
251. Haarmann-Stemmann, T. and J. Abel, *The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): structure, expression, and function.* Biol Chem, 2006. 387(9): p. 1195-9.
252. Mimura, J., M. Ema, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama, *Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function.* Genes Dev, 1999. 13(1): p. 20-5.
253. Ikuta, T., Y. Kobayashi, and K. Kawajiri, *Phosphorylation of nuclear localization signal inhibits the ligand-dependent nuclear import of aryl hydrocarbon receptor.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. 317(2): p. 545-50.
254. Pollenz, R.S., *The mechanism of AH receptor protein down-regulation (degradation) and its impact on AH receptor-mediated gene regulation.* Chem Biol Interact, 2002. 141(1-2): p. 41-61.
255. Song, Z. and R.S. Pollenz, *Ligand-dependent and independent modulation of aryl hydrocarbon receptor localization, degradation, and gene regulation.* Mol Pharmacol, 2002. 62(4): p. 806-16.
256. Nguyen, L.P. and C.A. Bradfield, *The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor.* Chem Res Toxicol, 2008. 21(1): p. 102-16.

257. Phelan, D., G.M. Winter, W.J. Rogers, J.C. Lam, and M.S. Denison, *Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin*. Arch Biochem Biophys, 1998. 357(1): p. 155-63.
258. Bjeldanes, L.F., J.Y. Kim, K.R. Grose, J.C. Bartholomew, and C.A. Bradfield, *Aromatic hydrocarbon responsiveness-receptor agonists generated from indole-3-carbinol in vitro and in vivo: comparisons with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(21): p. 9543-7.
259. Moyer, B.J., I.Y. Rojas, J.S. Kerley-Hamilton, H.F. Hazlett, K.V. Nemani, H.W. Trask, R.J. West, L.E. Lupien, A.J. Collins, C.S. Ringelberg, B. Gimi, W.B. Kinlaw, 3rd, and C.R. Tomlinson, *Inhibition of the aryl hydrocarbon receptor prevents Western diet-induced obesity. Model for AHR activation by kynurenine via oxidized-LDL, TLR2/4, TGFbeta, and IDO1*. Toxicol Appl Pharmacol, 2016. 300: p. 13-24.
260. Zang, X., X. Zheng, Y. Hou, M. Hu, H. Wang, X. Bao, F. Zhou, G. Wang, and H. Hao, *Regulation of proinflammatory monocyte activation by the kynurenine-AhR axis underlies immunometabolic control of depressive behavior in mice*. FASEB J, 2018. 32(4): p. 1944-1956.
261. Rothhammer, V., I.D. Maccanfroni, L. Bunse, M.C. Takenaka, J.E. Kenison, L. Mayo, C.C. Chao, B. Patel, R. Yan, M. Blain, J.I. Alvarez, H. Kebir, N. Anandasabapathy, G. Izquierdo, S. Jung, N. Obholzer, N. Pochet, C.B. Clish, M. Prinz, A. Prat, J. Antel, and F.J. Quintana, *Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor*. Nat Med, 2016. 22(6): p. 586-97.
262. Seok, S.H., Z.X. Ma, J.B. Feltenberger, H. Chen, H. Chen, C. Scarlett, Z. Lin, K.A. Satyshur, M. Cortopassi, C.R. Jefcoate, Y. Ge, W. Tang, C.A. Bradfield, and Y. Xing, *Trace derivatives of kynurenine potently activate the aryl hydrocarbon receptor (AHR)*. J Biol Chem, 2018. 293(6): p. 1994-2005.
263. Thomson, C.A., E. Ho, and M.B. Strom, *Chemopreventive properties of 3,3'-diindolylmethane in breast cancer: evidence from experimental and human studies*. Nutr Rev, 2016. 74(7): p. 432-43.
264. Lu, L., J. Dong, D. Li, J. Zhang, and S. Fan, *3,3'-diindolylmethane mitigates total body irradiation-induced hematopoietic injury in mice*. Free Radic Biol Med, 2016. 99: p. 463-471.
265. Del Priore, G., D.K. Gudipudi, N. Montemarano, A.M. Restivo, J. Malanowska-Stega, and A.A. Arslan, *Oral diindolylmethane (DIM): pilot evaluation of a nonsurgical treatment for cervical dysplasia*. Gynecol Oncol, 2010. 116(3): p. 464-7.
266. Heath, E.I., L.K. Heilbrun, J. Li, U. Vaishampayan, F. Harper, P. Pemberton, and F.H. Sarkar, *A phase I dose-escalation study of oral BR-DIM (BioResponse 3,3'- Diindolylmethane) in castrate-resistant, non-metastatic prostate cancer*. Am J Transl Res, 2010. 2(4): p. 402-11.

267. Thomson, C.A., H.H.S. Chow, B.C. Wertheim, D.J. Roe, A. Stopeck, G. Maskarinec, M. Altbach, P. Chalasani, C. Huang, M.B. Strom, J.P. Galons, and P.A. Thompson, *A randomized, placebo-controlled trial of diindolylmethane for breast cancer biomarker modulation in patients taking tamoxifen*. *Breast Cancer Res Treat*, 2017. 165(1): p. 97-107.
268. De Miranda, B.R., J.A. Miller, R.J. Hansen, P.J. Lunghofer, S. Safe, D.L. Gustafson, D. Colagiovanni, and R.B. Tjalkens, *Neuroprotective efficacy and pharmacokinetic behavior of novel anti-inflammatory para-phenyl substituted diindolylmethanes in a mouse model of Parkinson's disease*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013. 345(1): p. 125-38.
269. Huang, Z., Y. Jiang, Y. Yang, J. Shao, X. Sun, J. Chen, L. Dong, and J. Zhang, *3,3'-Diindolylmethane alleviates oxazolone-induced colitis through Th2/Th17 suppression and Treg induction*. *Mol Immunol*, 2013. 53(4): p. 335-44.
270. Jayakumar, P., K.V. Pugalendi, and M. Sankaran, *Attenuation of hyperglycemia-mediated oxidative stress by indole-3-carbinol and its metabolite 3, 3'- diindolylmethane in C57BL/6J mice*. *J Physiol Biochem*, 2014. 70(2): p. 525-34.
271. Kim, H.W., J. Kim, J. Kim, S. Lee, B.R. Choi, J.S. Han, K.W. Lee, and H.J. Lee, *3,3'-Diindolylmethane inhibits lipopolysaccharide-induced microglial hyperactivation and attenuates brain inflammation*. *Toxicol Sci*, 2014. 137(1): p. 158-67.
272. Rzemieniec, J., A. Wnuk, W. Lason, W. Bilecki, and M. Kajta, *The neuroprotective action of 3,3'-diindolylmethane against ischemia involves an inhibition of apoptosis and autophagy that depends on HDAC and AhR/CYP1A1 but not ERalpha/CYP19A1 signaling*. *Apoptosis*, 2019.
273. Dzeletovic, N., J. McGuire, M. Daujat, J. Tholander, M. Ema, Y. Fujii-Kuriyama, J. Bergman, P. Maurel, and L. Poellinger, *Regulation of dioxin receptor function by omeprazole*. *J Biol Chem*, 1997. 272(19): p. 12705-13.
274. Tsuji, G., M. Takahara, H. Uchi, T. Matsuda, T. Chiba, S. Takeuchi, F. Yasukawa, Y. Moroi, and M. Furue, *Identification of ketoconazole as an AhR-Nrf2 activator in cultured human keratinocytes: the basis of its anti-inflammatory effect*. *J Invest Dermatol*, 2012. 132(1): p. 59-68.
275. Mandal, P.K., *Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology*. *J Comp Physiol B*, 2005. 175(4): p. 221-30.
276. Jacob, A., A.M. Hartz, S. Potin, X. Coumoul, S. Yousif, J.M. Scherrmann, B. Bauer, and X. Decleves, *Aryl hydrocarbon receptor-dependent upregulation of Cyp1b1 by TCDD and diesel exhaust particles in rat brain microvessels*. *Fluids Barriers CNS*, 2011. 8: p. 23.
277. Nannelli, A., F. Rossignolo, R. Tolando, P. Rossato, V. Longo, and P.G. Gervasi, *Effect of beta-naphthoflavone on AhR-regulated genes (CYP1A1, IA2, IBI, 2SI, Nrf2, and GST) and antioxidant enzymes in various brain regions of pig*. *Toxicology*, 2009. 265(3): p. 69-79.

278. Yeager, R.L., S.A. Reisman, L.M. Aleksunes, and C.D. Klaassen, *Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery"*. *Toxicol Sci*, 2009. 111(2): p. 238-46.
279. Saw, C.L., M. Cintron, T.Y. Wu, Y. Guo, Y. Huang, W.S. Jeong, and A.N. Kong, *Pharmacodynamics of dietary phytochemical indoles I3C and DIM: Induction of Nrf2-mediated phase II drug metabolizing and antioxidant genes and synergism with isothiocyanates*. *Biopharm Drug Dispos*, 2011. 32(5): p. 289-300.
280. Tonelli, C., I.I.C. Chio, and D.A. Tuveson, *Transcriptional Regulation by Nrf2*. *Antioxid Redox Signal*, 2018. 29(17): p. 1727-1745.
281. Ma, Q., K. Kinneer, Y. Bi, J.Y. Chan, and Y.W. Kan, *Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction*. *Biochem J*, 2004. 377(Pt 1): p. 205-13.
282. Lo, R. and J. Matthews, *The aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor alpha differentially modulate nuclear factor erythroid-2-related factor 2 transactivation in MCF-7 breast cancer cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2013. 270(2): p. 139-48.
283. Miao, W., L. Hu, P.J. Scrivens, and G. Batist, *Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes*. *J Biol Chem*, 2005. 280(21): p. 20340-8.
284. Shin, S., N. Wakabayashi, V. Misra, S. Biswal, G.H. Lee, E.S. Agoston, M. Yamamoto, and T.W. Kensler, *NRF2 modulates aryl hydrocarbon receptor signaling: influence on adipogenesis*. *Mol Cell Biol*, 2007. 27(20): p. 7188-97.
285. Radjendirane, V. and A.K. Jaiswal, *Antioxidant response element-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression*. *Biochem Pharmacol*, 1999. 58(10): p. 1649-55.
286. Marchand, A., R. Barouki, and M. Garlatti, *Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity*. *Mol Pharmacol*, 2004. 65(4): p. 1029-37.
287. Anwar-Mohamed, A., O.H. Elshenawy, A.A. Soshilov, M.S. Denison, X. Chris Le, L.O. Klotz, and A.O. El-Kadi, *Methylated pentavalent arsenic metabolites are bifunctional inducers, as they induce cytochrome P450 1A1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase through AhR- and Nrf2-dependent mechanisms*. *Free Radic Biol Med*, 2014. 67: p. 171-87.
288. Bonnesen, C., I.M. Eggleston, and J.D. Hayes, *Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both*

- stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines.* Cancer Res, 2001. 61(16): p. 6120-30.
289. Kohle, C. and K.W. Bock, *Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention.* Biochem Pharmacol, 2006. 72(7): p. 795-805.
290. Ernst, I.M., C. Schuemann, A.E. Wagner, and G. Rimbach, *3,3'-Diindolylmethane but not indole-3-carbinol activates Nrf2 and induces Nrf2 target gene expression in cultured murine fibroblasts.* Free Radic Res, 2011. 45(8): p. 941-9.
291. Gutierrez-Vazquez, C. and F.J. Quintana, *Regulation of the Immune Response by the Aryl Hydrocarbon Receptor.* Immunity, 2018. 48(1): p. 19-33.
292. Nuti, R., M. Gargaro, D. Matino, D. Dolciemi, U. Grohmann, P. Puccetti, F. Fallarino, and A. Macchiarulo, *Ligand binding and functional selectivity of L-tryptophan metabolites at the mouse aryl hydrocarbon receptor (mAHR).* J Chem Inf Model, 2014. 54(12): p. 3373-83.
293. Tian, Y., S. Ke, M.S. Denison, A.B. Rabson, and M.A. Gallo, *Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity.* J Biol Chem, 1999. 274(1): p. 510-5.
294. Bordon, Y., *AHR ensures cells rest in peace.* Nat Rev Immunol, 2018. 18(7): p. 419.
295. Lee, Y.H., C.H. Lin, P.C. Hsu, Y.Y. Sun, Y.J. Huang, J.H. Zhuo, C.Y. Wang, Y.L. Gan, C.C. Hung, C.Y. Kuan, and F.S. Shie, *Aryl hydrocarbon receptor mediates both proinflammatory and anti-inflammatory effects in lipopolysaccharide-activated microglia.* Glia, 2015. 63(7): p. 1138-54.
296. Iu, M., M. Zago, A. Rico de Souza, M. Bouttier, S. Pareek, J.H. White, Q. Hamid, D.H. Eidelman, and C.J. Baglolle, *RelB attenuates cigarette smoke extract-induced apoptosis in association with transcriptional regulation of the aryl hydrocarbon receptor.* Free Radic Biol Med, 2017. 108: p. 19-31.
297. Larigot, L., L. Juricek, J. Dairou, and X. Coumoul, *AhR signaling pathways and regulatory functions.* Biochim Open, 2018. 7: p. 1-9.
298. Fernandez-Salguero, P., T. Pineau, D.M. Hilbert, T. McPhail, S.S. Lee, S. Kimura, D.W. Nebert, S. Rudikoff, J.M. Ward, and F.J. Gonzalez, *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor.* Science, 1995. 268(5211): p. 722-6.
299. Schmidt, J.V., G.H. Su, J.K. Reddy, M.C. Simon, and C.A. Bradfield, *Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(13): p. 6731-6.
300. Esser, C. and A. Rannug, *The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology.* Pharmacol Rev, 2015. 67(2): p. 259-79.

301. Sakakibara, Y., M. Katoh, Y. Kondo, and M. Nadai, *Effects of beta-Naphthoflavone on Ugt1a6 and Ugt1a7 Expression in Rat Brain*. Biol Pharm Bull, 2016. 39(1): p. 78-83.
302. Rothhammer, V., D.M. Borucki, E.C. Tjon, M.C. Takenaka, C.C. Chao, A. Ardura-Fabregat, K.A. de Lima, C. Gutierrez-Vazquez, P. Hewson, O. Staszewski, M. Blain, L. Healy, T. Neziraj, M. Borio, M. Wheeler, L.L. Dragin, D.A. Laplaud, J. Antel, J.I. Alvarez, M. Prinz, and F.J. Quintana, *Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites*. Nature, 2018. 557(7707): p. 724-728.
303. Degner, S.C., A.J. Papoutsis, O. Selmin, and D.F. Romagnolo, *Targeting of aryl hydrocarbon receptor-mediated activation of cyclooxygenase-2 expression by the indole-3-carbinol metabolite 3,3'-diindolylmethane in breast cancer cells*. J Nutr, 2009. 139(1): p. 26-32.
304. Salter, M., R. Hazelwood, C.I. Pogson, R. Iyer, and D.J. Madge, *The effects of a novel and selective inhibitor of tryptophan 2,3-dioxygenase on tryptophan and serotonin metabolism in the rat*. Biochem Pharmacol, 1995. 49(10): p. 1435-42.
305. Koblish, H.K., M.J. Hansbury, K.J. Bowman, G. Yang, C.L. Neilan, P.J. Haley, T.C. Burn, P. Waeltz, R.B. Sparks, E.W. Yue, A.P. Combs, P.A. Scherle, K. Vaddi, and J.S. Fridman, *Hydroxyamidine inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase potently suppress systemic tryptophan catabolism and the growth of IDO-expressing tumors*. Mol Cancer Ther, 2010. 9(2): p. 489-98.
306. Urenjak, J. and T.P. Obrenovitch, *Kynurenine 3-hydroxylase inhibition in rats: effects on extracellular kynurenic acid concentration and N-methyl-D-aspartate-induced depolarisation in the striatum*. J Neurochem, 2000. 75(6): p. 2427-33.
307. Kozak, R., B.M. Campbell, C.A. Strick, W. Horner, W.E. Hoffmann, T. Kiss, D.S. Chapin, D. McGinnis, A.L. Abbott, B.M. Roberts, K. Fonseca, V. Guanowsky, D.A. Young, P.A. Seymour, A. Dounay, M. Hajos, G.V. Williams, and S.A. Castner, *Reduction of brain kynurenic acid improves cognitive function*. J Neurosci, 2014. 34(32): p. 10592-602.
308. Kim, S.H., E.C. Henry, D.K. Kim, Y.H. Kim, K.J. Shin, M.S. Han, T.G. Lee, J.K. Kang, T.A. Gasiewicz, S.H. Ryu, and P.G. Suh, *Novel compound 2-methyl-2H-pyrazole-3-carboxylic acid (2-methyl-4-o-tolylazo-phenyl)-amide (CH-223191) prevents 2,3,7,8-TCDD-induced toxicity by antagonizing the aryl hydrocarbon receptor*. Mol Pharmacol, 2006. 69(6): p. 1871-8.
309. Fan, S., Q. Meng, J. Xu, Y. Jiao, L. Zhao, X. Zhang, F.H. Sarkar, M.L. Brown, A. Dritschilo, and E.M. Rosen, *DIM (3,3'-diindolylmethane) confers protection against ionizing radiation by a unique mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(46): p. 18650-5.
310. Schreiber, E., P. Matthias, M.M. Muller, and W. Schaffner, *Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells*. Nucleic Acids Res, 1989. 17(15): p. 6419.

311. Thomsen, C. and L. Helboe, *Regional pattern of binding and c-Fos induction by (R)- and (S)-citalopram in rat brain*. Neuroreport, 2003. 14(18): p. 2411-4.
312. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. 193(1): p. 265-75.
313. Miller, C.L., I.C. Llenos, J.R. Dulay, M.M. Barillo, R.H. Yolken, and S. Weis, *Expression of the kynurenine pathway enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase is increased in the frontal cortex of individuals with schizophrenia*. Neurobiol Dis, 2004. 15(3): p. 618-29.
314. Ball, H.J., F.F. Jusof, S.M. Bakmiwewa, N.H. Hunt, and H.J. Yuasa, *Tryptophan-catabolizing enzymes - party of three*. Front Immunol, 2014. 5: p. 485.
315. Thomas, S.R. and R. Stocker, *Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway*. Redox Rep, 1999. 4(5): p. 199-220.
316. Amori, L., P. Guidetti, R. Pellicciari, Y. Kajii, and R. Schwarcz, *On the relationship between the two branches of the kynurenine pathway in the rat brain in vivo*. J Neurochem, 2009. 109(2): p. 316-25.
317. Yin, X.F., J. Chen, W. Mao, Y.H. Wang, and M.H. Chen, *A selective aryl hydrocarbon receptor modulator 3,3'-Diindolylmethane inhibits gastric cancer cell growth*. J Exp Clin Cancer Res, 2012. 31: p. 46.
318. Sugihara, K., T. Okayama, S. Kitamura, K. Yamashita, M. Yasuda, S. Miyairi, Y. Minobe, and S. Ohta, *Comparative study of aryl hydrocarbon receptor ligand activities of six chemicals in vitro and in vivo*. Arch Toxicol, 2008. 82(1): p. 5-11.
319. Chen, I., A. McDougal, F. Wang, and S. Safe, *Aryl hydrocarbon receptor-mediated antiestrogenic and antitumorigenic activity of diindolylmethane*. Carcinogenesis, 1998. 19(9): p. 1631-9.
320. Rouse, M., R. Rao, M. Nagarkatti, and P.S. Nagarkatti, *3,3'-diindolylmethane ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting cell cycle arrest and apoptosis in activated T cells through microRNA signaling pathways*. J Pharmacol Exp Ther, 2014. 350(2): p. 341-52.
321. Chung, K.T. and G.S. Gadupudi, *Possible roles of excess tryptophan metabolites in cancer*. Environ Mol Mutagen, 2011. 52(2): p. 81-104.
322. Dell'Osso, L., C. Carmassi, F. Mucci, and D. Marazziti, *Depression, Serotonin and Tryptophan*. Curr Pharm Des, 2016. 22(8): p. 949-54.
323. Berger, U.V., X.F. Gu, and E.C. Azmitia, *The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine*. Eur J Pharmacol, 1992. 215(2-3): p. 153-60.

324. Gudelsky, G.A. and J.F. Nash, *Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions*. J Neurochem, 1996. 66(1): p. 243-9.
325. Johnson, M.P., A.J. Hoffman, and D.E. Nichols, *Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [3H]serotonin and [3H]dopamine release from superfused rat brain slices*. Eur J Pharmacol, 1986. 132(2-3): p. 269-76.
326. Crespi, D., T. Mennini, and M. Gobbi, *Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine*. Br J Pharmacol, 1997. 121(8): p. 1735-43.
327. Stone, D.M., K.M. Merchant, G.R. Hanson, and J.W. Gibb, *Immediate and long-term effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on serotonin pathways in brain of rat*. Neuropharmacology, 1987. 26(12): p. 1677-83.
328. Schmidt, C.J. and V.L. Taylor, *Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine*. Biochem Pharmacol, 1987. 36(23): p. 4095-102.
329. Deguchi, T. and J. Barchas, *Regional distribution and developmental change of tryptophan hydroxylase activity in rat brain*. J Neurochem, 1972. 19(3): p. 927-9.
330. Ruddick, J.P., A.K. Evans, D.J. Nutt, S.L. Lightman, G.A. Rook, and C.A. Lowry, *Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications*. Expert Rev Mol Med, 2006. 8(20): p. 1-27.
331. Mc, M.R. and J.L. Oncley, *The specific binding of L-tryptophan to serum albumin*. J Biol Chem, 1958. 233(6): p. 1436-47.
332. McMenemy, R.H., *Binding of indole analogues to human serum albumin. Effects of fatty acids*. J Biol Chem, 1965. 240(11): p. 4235-43.
333. Curzon, G., J. Friedel, and P.J. Knott, *The effect of fatty acids on the binding of tryptophan to plasma protein*. Nature, 1973. 242(5394): p. 198-200.
334. Chaouloff, F., G.A. Kennett, B. Serrurier, D. Merino, and G. Curzon, *Amino acid analysis demonstrates that increased plasma free tryptophan causes the increase of brain tryptophan during exercise in the rat*. J Neurochem, 1986. 46(5): p. 1647-50.
335. Sprague, J.E., X. Yang, J. Sommers, T.L. Gilman, and E.M. Mills, *Roles of norepinephrine, free Fatty acids, thyroid status, and skeletal muscle uncoupling protein 3 expression in sympathomimetic-induced thermogenesis*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. 320(1): p. 274-80.
336. Smith, Q.R., S. Momma, M. Aoyagi, and S.I. Rapoport, *Kinetics of neutral amino acid transport across the blood-brain barrier*. J Neurochem, 1987. 49(5): p. 1651-8.
337. Boxler, M.I., M.E. Liechti, Y. Schmid, T. Kraemer, and A.E. Steuer, *First Time View on Human Metabolome Changes after a Single Intake of 3,4-*

- Methylenedioxymethamphetamine in Healthy Placebo-Controlled Subjects.* J Proteome Res, 2017. 16(9): p. 3310-3320.
338. Kanai, M., H. Funakoshi, H. Takahashi, T. Hayakawa, S. Mizuno, K. Matsumoto, and T. Nakamura, *Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice.* Mol Brain, 2009. 2: p. 8.
339. Badawy, A.A., A.N. Welch, and C.J. Morgan, *Tryptophan pyrrolase in haem regulation. The mechanisms of enhancement of rat liver 5-aminolaevulinate synthase activity by starvation and of the glucose effect on induction of the enzyme by 2-allyl-2-isopropylacetamide.* Biochem J, 1982. 206(3): p. 441-9.
340. Nash, J.F., Jr., H.Y. Meltzer, and G.A. Gudelsky, *Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine.* J Pharmacol Exp Ther, 1988. 245(3): p. 873-9.
341. Knox, W.E. and A.H. Mehler, *The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. I. The coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine.* J Biol Chem, 1950. 187(1): p. 419-30.
342. Badawy, A.A. and M. Evans, *Animal liver tryptophan pyrrolases: Absence of apoenzyme and of hormonal induction mechanism from species sensitive to tryptophan toxicity.* Biochem J, 1976. 158(1): p. 79-88.
343. Hwu, P., M.X. Du, R. Lapointe, M. Do, M.W. Taylor, and H.A. Young, *Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation.* J Immunol, 2000. 164(7): p. 3596-9.
344. Pilotte, L., P. Larrieu, V. Stroobant, D. Colau, E. Dolusic, R. Frederick, E. De Plaen, C. Uyttenhove, J. Wouters, B. Masereel, and B.J. Van den Eynde, *Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(7): p. 2497-502.
345. Dostal, C.R., M. Carson Sulzer, K.W. Kelley, G.G. Freund, and R.H. McCusker, *Glial and tissue-specific regulation of Kynurenine Pathway dioxygenases by acute stress of mice.* Neurobiol Stress, 2017. 7: p. 1-15.
346. Dang, Y., W.E. Dale, and O.R. Brown, *Comparative effects of oxygen on indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase of the kynurenine pathway.* Free Radic Biol Med, 2000. 28(4): p. 615-24.
347. Lestage, J., D. Verrier, K. Palin, and R. Dantzer, *The enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is induced in the mouse brain in response to peripheral administration of lipopolysaccharide and superantigen.* Brain Behav Immun, 2002. 16(5): p. 596-601.
348. Zheng, X., A. Kang, C. Dai, Y. Liang, T. Xie, L. Xie, Y. Peng, G. Wang, and H. Hao, *Quantitative analysis of neurochemical panel in rat brain and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Anal Chem, 2012. 84(22): p. 10044-51.
349. O'Connor, J.C., M.A. Lawson, C. Andre, M. Moreau, J. Lestage, N. Castanon, K.W. Kelley, and R. Dantzer, *Lipopolysaccharide-induced*

- depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice.* Mol Psychiatry, 2009. 14(5): p. 511-22.
350. Liu, X., N. Shin, H.K. Koblish, G. Yang, Q. Wang, K. Wang, L. Leffet, M.J. Hansbury, B. Thomas, M. Rupar, P. Waeltz, K.J. Bowman, P. Polam, R.B. Sparks, E.W. Yue, Y. Li, R. Wynn, J.S. Fridman, T.C. Burn, A.P. Combs, R.C. Newton, and P.A. Scherle, *Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity.* Blood, 2010. 115(17): p. 3520-30.
351. Torres, E., M.D. Gutierrez-Lopez, A. Mayado, A. Rubio, E. O'Shea, and M.I. Colado, *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.
352. 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.
353. Li, I.H., W.S. Huang, C.Y. Shiue, Y.Y. Huang, R.S. Liu, S.C. Chyueh, S.H. Hu, M.H. Liao, L.H. Shen, J.C. Liu, and K.H. Ma, *Study on the neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA-induced neurotoxicity on the serotonin transporter in rat brain using micro-PET.* Neuroimage, 2010. 49(2): p. 1259-70.
354. Yu, C.P., Z.Z. Pan, and D.Y. Luo, *TDO as a therapeutic target in brain diseases.* Metab Brain Dis, 2016. 31(4): p. 737-47.
355. Uwai, Y., H. Honjo, and K. Iwamoto, *Interaction and transport of kynurenic acid via human organic anion transporters hOAT1 and hOAT3.* Pharmacol Res, 2012. 65(2): p. 254-60.
356. Vecsei, L., J. Miller, U. MacGarvey, and M.F. Beal, *Kynurenine and probenecid inhibit pentylenetetrazol- and NMDLA-induced seizures and increase kynurenic acid concentrations in the brain.* Brain Res Bull, 1992. 28(2): p. 233-8.
357. Sprague, J.E., X. Huang, A. Kanthasamy, and D.E. Nichols, *Attenuation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) induced neurotoxicity with the serotonin precursors tryptophan and 5-hydroxytryptophan.* Life Sci, 1994. 55(15): p. 1193-8.
358. Peyrot, F. and C. Ducrocq, *Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species.* J Pineal Res, 2008. 45(3): p. 235-46.
359. Johansson, A.S., B. Owe-Larsson, L. Asp, T. Kocki, M. Adler, J. Hetta, R. Gardner, G.B. Lundkvist, E.M. Urbanska, and H. Karlsson, *Activation of kynurenine pathway in ex vivo fibroblasts from patients with bipolar disorder or schizophrenia: cytokine challenge increases production of 3-hydroxykynurenine.* J Psychiatr Res, 2013. 47(11): p. 1815-23.

360. Carvalho, M., H. Pontes, F. Remiao, M.L. Bastos, and F. Carvalho, *Mechanisms underlying the hepatotoxic effects of ecstasy*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2010. 11(5): p. 476-95.
361. Gimenez-Gomez, P., M. Perez-Hernandez, M.D. Gutierrez-Lopez, R. Vidal, C. Abuin-Martinez, E. O'Shea, and M.I. Colado, *Increasing kynurenine brain levels reduces ethanol consumption in mice by inhibiting dopamine release in nucleus accumbens*. *Neuropharmacology*, 2018. 135: p. 581-591.
362. Xu, G., X. Liu, and Y. Wang, *The cerebral protective effect and mechanism of action of vitamin B6 adjuvant ceftriaxone in experimental pneumococcal meningitis*. *Brain Res*, 2018. 1695: p. 53-64.
363. Zwillig, D., S.Y. Huang, K.V. Sathyaikumar, F.M. Notarangelo, P. Guidetti, H.Q. Wu, J. Lee, J. Truong, Y. Andrews-Zwillig, E.W. Hsieh, J.Y. Louie, T. Wu, K. Scarce-Levie, C. Patrick, A. Adame, F. Giorgini, S. Moussaoui, G. Laue, A. Rassoulpour, G. Flik, Y. Huang, J.M. Muchowski, E. Masliah, R. Schwarcz, and P.J. Muchowski, *Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration*. *Cell*, 2011. 145(6): p. 863-74.
364. Koshy Cherian, A., H. Gritton, D.E. Johnson, D. Young, R. Kozak, and M. Sarter, *A systemically-available kynurenine aminotransferase II (KAT II) inhibitor restores nicotine-evoked glutamatergic activity in the cortex of rats*. *Neuropharmacology*, 2014. 82: p. 41-8.
365. Houlahan, K.E., S.D. Prokopec, I.D. Moffat, J. Linden, S. Lensu, A.B. Okey, R. Pohjanvirta, and P.C. Boutros, *Transcriptional profiling of rat hypothalamus response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-rho-dioxin*. *Toxicology*, 2015. 328: p. 93-101.
366. Rannug, A., U. Rannug, H.S. Rosenkranz, L. Winqvist, R. Westerholm, E. Agurell, and A.K. Grafstrom, *Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances*. *J Biol Chem*, 1987. 262(32): p. 15422-7.
367. Heath-Pagliuso, S., W.J. Rogers, K. Tullis, S.D. Seidel, P.H. Cenijn, A. Brouwer, and M.S. Denison, *Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites*. *Biochemistry*, 1998. 37(33): p. 11508-15.
368. Reyes, H., S. Reisz-Porszasz, and O. Hankinson, *Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor*. *Science*, 1992. 256(5060): p. 1193-5.
369. Liu, Y., X. Liang, W. Dong, Y. Fang, J. Lv, T. Zhang, R. Fiskesund, J. Xie, J. Liu, X. Yin, X. Jin, D. Chen, K. Tang, J. Ma, H. Zhang, J. Yu, J. Yan, H. Liang, S. Mo, F. Cheng, Y. Zhou, H. Zhang, J. Wang, J. Li, Y. Chen, B. Cui, Z.W. Hu, X. Cao, F. Xiao-Feng Qin, and B. Huang, *Tumor-Repopulating Cells Induce PD-1 Expression in CD8(+) T Cells by Transferring Kynurenine and AhR Activation*. *Cancer Cell*, 2018. 33(3): p. 480-494 e7.
370. Schroeder, J.C., B.C. Dinatale, I.A. Murray, C.A. Flaveny, Q. Liu, E.M. Laurenzana, J.M. Lin, S.C. Strom, C.J. Omiecinski, S. Amin, and G.H. Perdew, *The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist*

- for the human aryl hydrocarbon receptor*. *Biochemistry*, 2010. 49(2): p. 393-400.
371. Wang, Z., H. Yang, A. Ramesh, L.J. Roberts, 2nd, L. Zhou, X. Lin, Y. Zhao, and Z. Guo, *Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase accelerates benzo(a)pyrene detoxification by upregulation of the aryl hydrocarbon receptor in mouse endothelial cells*. *Free Radic Biol Med*, 2009. 47(8): p. 1221-9.
372. Lecoq, A.L., S. Viengchareun, M. Hage, J. Bouligand, J. Young, A. Boutron, P. Zizzari, M. Lombes, P. Chanson, and P. Kamenicky, *AIP mutations impair AhR signaling in pituitary adenoma patients fibroblasts and in GH3 cells*. *Endocr Relat Cancer*, 2016. 23(5): p. 433-43.
373. Hayashi, S., J. Watanabe, K. Nakachi, H. Eguchi, O. Gotoh, and K. Kawajiri, *Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes*. *Carcinogenesis*, 1994. 15(5): p. 801-6.
374. Lin, P., S.W. Hu, and T.H. Chang, *Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes*. *Toxicol Sci*, 2003. 71(1): p. 20-6.
375. Pierre, S., A. Chevallier, F. Teixeira-Clerc, A. Ambolet-Camoit, L.C. Bui, A.S. Bats, J.C. Fournet, P. Fernandez-Salguero, M. Aggerbeck, S. Lotersztajn, R. Barouki, and X. Coumoul, *Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of liver fibrosis by dioxin*. *Toxicol Sci*, 2014. 137(1): p. 114-24.
376. Sanchez-Martin, F.J., P.M. Fernandez-Salguero, and J.M. Merino, *Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in cerebellar granule cells from mouse*. *J Neurochem*, 2011. 118(1): p. 153-62.
377. Gutierrez, M.A., S.S. Davis, A. Rosko, S.M. Nguyen, K.P. Mitchell, S. Mateen, J. Neves, T.Y. Garcia, S. Mooney, G.H. Perdew, T.D. Hubbard, D.A. Lamba, and A. Ramanathan, *A novel AhR ligand, 2AI, protects the retina from environmental stress*. *Sci Rep*, 2016. 6: p. 29025.
378. Potapovich, A.I., D. Lulli, P. Fidanza, V.A. Kostyuk, C. De Luca, S. Pastore, and L.G. Korkina, *Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NFkappaB and AhR and EGFR-ERK pathway*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011. 255(2): p. 138-49.
379. Parkin, D.R. and D. Malejka-Giganti, *Differences in the hepatic P450-dependent metabolism of estrogen and tamoxifen in response to treatment of rats with 3,3'-diindolylmethane and its parent compound indole-3-carbinol*. *Cancer Detect Prev*, 2004. 28(1): p. 72-9.
380. Busbee, P.B., M. Rouse, M. Nagarkatti, and P.S. Nagarkatti, *Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders*. *Nutr Rev*, 2013. 71(6): p. 353-69.

381. Murray, I.A., A.D. Patterson, and G.H. Perdew, *Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe*. *Nat Rev Cancer*, 2014. 14(12): p. 801-14.
382. Huang, Z., L. Zuo, Z. Zhang, J. Liu, J. Chen, L. Dong, and J. Zhang, *3,3'-Diindolylmethane decreases VCAM-1 expression and alleviates experimental colitis via a BRCA1-dependent antioxidant pathway*. *Free Radic Biol Med*, 2011. 50(2): p. 228-36.
383. Hajra, S., A. Basu, S. Singha Roy, A.R. Patra, and S. Bhattacharya, *Attenuation of doxorubicin-induced cardiotoxicity and genotoxicity by an indole-based natural compound 3,3'-diindolylmethane (DIM) through activation of Nrf2/ARE signaling pathways and inhibiting apoptosis*. *Free Radic Res*, 2017. 51(9-10): p. 812-827.
384. Wu, T.Y., Y. Huang, C. Zhang, Z.Y. Su, S. Boyanapalli, T.O. Khor, H. Wang, H. Lin, M. Gounder, L. Kagan, I.P. Androulakis, and A.N. Kong, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 3,3'-diindolylmethane (DIM) in regulating gene expression of phase II drug metabolizing enzymes*. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2015. 42(4): p. 401-8.
385. Colado, M.I., E. O'Shea, R. Granados, B. Esteban, A.B. Martin, and A.R. Green, *Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Agouti rats following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or 'ecstasy') administration*. *Br J Pharmacol*, 1999. 126(4): p. 911-24.
386. Broening, H.W., J.F. Bowyer, and W. Slikker, Jr., *Age-dependent sensitivity of rats to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. 275(1): p. 325-33.

