

DEPARTAMENT DE PSICOBIOLOGIA

EFFECTOS CONDUCTUALES Y NEUROQUÍMICOS DEL
CONSUMO DE ÉXTASIS Y COCAÍNA EN RATONES
ADOLESCENTES.

MANUEL DAZA LOSADA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 16 de juny de 2009 davant un tribunal format per:

- Dra. Olga Valverde Granados
- Dra. María Isabel Colado Megia
- Dra. Magi Farre Albadalejo
- Dra. Consuelo Guerri Sirera
- Dra. Maria Asunción Aguilar Calpe

Va ser dirigida per:

Dr. José Miñarro López

Dra. Marta Rodríguez Arias

©Copyright: Servei de Publicacions
Manuel Daza Losada

Dipòsit legal: V-4158-2010

I.S.B.N.: 978-84-370-7639-3

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITATĬ VALÈNCIA

FACULTAD DE PSICOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PSICOBIOLOGÍA

Unidad de Investigación “Psicobiología de las Drogodependencias”
www.uv.es/%7epsidroga

**EFFECTOS CONDUCTUALES Y NEUROQUÍMICOS
DEL CONSUMO DE ÉXTASIS Y COCAÍNA
EN RATONES ADOLESCENTES**

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en “Psicobiología”
(689 268F)

Presentada por

D. Manuel Daza Losada

Dirigida por

Dr. José Miñarro López
Dra. Marta Rodríguez-Arias



La Doctora Dña. Marta Rodríguez Arias y el Doctor D. José Miñarro López, Profesores Titulares de Psicobiología de la Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias del Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universitat de Valencia,

CERTIFICAN

Que la Tesis Doctoral presentada por D. Manuel Daza Losada, con el título “Efectos Conductuales y Neuroquímicos del Consumo de Éxtasis y Cocaína en Ratones Adolescentes” ha sido realizada bajo su dirección. Tras haberla examinado hacen constar su autorización para que se realicen los trámites conducentes a su defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia a 21 de Enero de 2009.

Fdo.: Dra. Marta Rodríguez Arias

Fdo.: Dr. José Miñarro López

AGRADECIMIENTOS

Nunca pensé que este apartado de la tesis fuera a resultarme tan difícil, puesto que en ocasiones cavilaba sobre las frases que utilizaría para dedicar este trabajo a las personas que quiero y admiro, pero aún así es complicado. Ya he perdido la cuenta de las veces que he redactado este apartado, ya que lo que escriba ahora no se acercará ni a la milésima parte de lo que en verdad quiero expresar.

En principio, quisiera agradecer al Dr. José Miñarro (Pepe) por brindarme la oportunidad de trabajar en la Unidad de Investigación “Psicobiología de las Drogodependencias” de la Universidad de Valencia. Sin tu ayuda, consejo, apoyo, protección, entre muchas cosas más, no sería posible la realización de este trabajo. Como persona te admiro, como amigo te aprecio, como maestro no se que decir, cada día aprendo más de ti, GRACIAS POR TODO.

A la Dra. Asunción Aguilar (Sunsi), ya que tu dulzura y humildad hacen de ti una persona única y fantástica, una mujer bella en todos los aspectos. De ti aprendí a dar equilibrio a las cosas, y un simple gesto de tu parte daba alivio a los momentos de tensión. GRACIAS POR TODO.

A mis compañeros de laboratorio: Carmen, Concha, Kontxin, Bruno y Ferrán. Han sido mi punto de apoyo, mis consejeros y confidentes, son mi paño de lágrimas y mi muro de los lamentos, no hay palabras que puedan agradecer todo lo que han hecho por mí, son los mejores compañeros de equipo. (Ferrán, este documento no lo escribí en tu ordenador, jeje).

He querido dejar este lugar a una persona muy especial para mí, puesto que la quiero y aprecio tanto que sólo mi madre y mi abuela están por encima de ella. Una mujer que confió en mí sin conocerme, me dió la oportunidad que muchos me negaron, ocupó un lugar que muchas personas hubieran rehusado, me ha dado amor maternal cuando lo he necesitado, cariño y afecto cuando ambos han escaseado, y para ser sincero es la razón por la cual yo he decidido quedarme en Valencia. Me ha dado fortaleza, sabiduría, alegría, tantas cosas que en verdad, nunca pude llegar a imaginar recibir. Marta (Dra. Marta Rodríguez-Arias), me es imposible describir lo mucho que te aprecio y sólo me basta decirte que el final de esta página es el único lugar en el que estarás en último, puesto que para mí siempre serás la primera. TE QUIERO MOGOLLÓN.



Marta



Pepe



Sunsi



Carmen



Kontxin



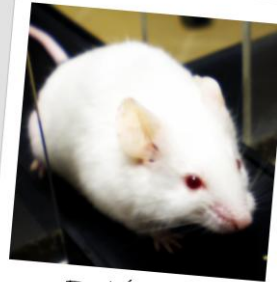
Concha



Ferrán



Bruno



Ratón OF1



Mis padres, hermanos y familiares son conscientes que los amo, siempre les he dedicado mi trabajo y esfuerzo, este trabajo no es la excepción pero creo que es momento de hacer un paréntesis, y estoy seguro que entenderán mi decisión. Por otra parte, es complicado para mí agradecer a todas las personas que me han apoyado incondicionalmente durante mi formación profesional. No soy filósofo y mucho menos hombre de letras, mi cabeza es incapaz de formular palabra alguna cuando los sentimientos están de por medio y en ocasiones un simple “gracias” se convierte en tortura. Sangre, sudor y lágrimas son la comida diaria de un investigador, pero los frutos de su trabajo son su mejor recompensa la cual, es infinita cuando cuenta con amigos como con los que cuento yo.

Mi vida dio un giro inesperado en Diciembre de 2007, pues mi “abue” Enrique inició su viaje hacia la vida eterna. A él no le gustaban las despedidas, por eso creo que algún día volveremos a encontrarnos y espero, que cuando llegue ese día pueda decirle todo lo que es y fue para mí. Mi abuelo es uno de los pilares de mi vida, fue mi guía y protector, fue padre y amigo, pero sobre todas las cosas es y será siempre para mí, el hombre que aspiro llegar a ser.

Esta tesis doctoral esta dedicada de forma especial a D. Enrique Lozada González, mi abuelo. Su imagen esta conformada por todas las fotos que he realizado y he recibido de familiares y amigos desde mi llegada a Valencia, en septiembre de 2003.

La realización de la Presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a las siguientes Becas y Ayudas:

- Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud “Carlos III” (FIS), RETICS, Red de Trastornos Adictivos, RTA (G03/005 y RD06/001/0016).
- Ministerio de Ciencia e Innovación. Dirección General de Investigación y FEDER Proyectos de Investigación I+D+I. (SEJ2005-00316/PSIC y PSI2008-00101/PSIC)
- Generalitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, Agencia Valenciana de Salud. Dirección General de Drogodependencias (FEPAD).

RESUMEN

La 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), una sustancia popularmente conocida como éxtasis, es una droga ilícita consumida habitualmente por adolescentes y adultos jóvenes. Además, el policonsumo es una práctica habitual entre los usuarios de la MDMA, siendo la cocaína una de las drogas más frecuentemente asociadas a esta sustancia. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos a corto y largo plazo que se producen tras la administración de la MDMA (5, 10, o 20 mg/kg) sola o en combinación con cocaína (25 mg/kg) en ratones adolescentes. En el estudio sobre el efecto agudo, observamos que ambas drogas administradas individual o simultáneamente incrementan la actividad motora. La dosis alta de MDMA disminuye de los contactos sociales en la prueba de la interacción social afectando igualmente el test de retención de la evitación pasiva. Sin embargo, sólo la co-administración de MDMA en combinación con cocaína produjo un efecto ansiolítico caracterizado por un aumento del tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz. Igualmente, el análisis neuroquímico reveló que los ratones que recibieron MDMA en combinación con cocaína mostraron un incremento en el turnover de DA en el estriado, pero una disminución del de serotonina en la corteza. Los estudios de los efectos a largo plazo, realizados tres semanas después de haber finalizado un tratamiento con MDMA sola o en combinación con cocaína (2 administraciones por día durante 3 días consecutivos), mostraron que los ratones expuestos a la MDMA, sola o más cocaína, incrementaron el tiempo dedicado a las conductas sociales, aunque los que también habían recibido cocaína presentaban además conductas de amenaza. Observamos un efecto neurotóxico en los ratones tratados únicamente con 20 mg/kg de MDMA que mostraron un decremento de la concentración de DA en el estriado, no observándose este deterioro en los tratados además con cocaína. Por otra parte, mediante el condicionamiento de la preferencia de lugar (CPL) confirmamos que la MDMA posee efectos reforzantes y que esta sustancia es capaz de reinstaurar la preferencia de lugar una vez que esta se ha extinguido. La expresión y la reinstauración del CPL inducido por la MDMA dependen de la pauta de condicionamiento que condiciona los efectos neurotóxicos producidos por esta droga. Para finalizar, el tratamiento con MDMA sola o en combinación con cocaína durante la adolescencia favorece los efectos reforzantes de la MDMA durante el periodo adulto. Además, la exposición previa a la cocaína aumenta el tiempo necesario para extinguir la preferencia de lugar inducida por la MDMA.

Palabras Clave: MDMA, cocaína, ratones, adolescencia, serotonina, dopamina, reinstauración, CPL, actividad motora, laberinto elevado en cruz, interacción social, evitación pasiva, DOPAC, HVA, 5-HIAA.

ABSTRACT

3,4-methylene-dioxy-methamphetamine (MDMA), commonly known as ecstasy, is an illicit recreational drug consumed by teenagers and young adults. The poly-drug pattern is the most common among those observed in MDMA users, with cocaine being a frequently associated drug. The aim of the present study was to evaluate the short- and long-term effects of exposure to MDMA (5, 10, or 20 mg/kg), alone or plus cocaine (25 mg/kg), on adolescent mice. In the acute phase, both drugs produced hyperactivity whether administered alone or concurrently. The highest MDMA dose decreased social contacts and affected the passive avoidance task. However, an anxiolytic effect, studied by means of the elevated plus maze and expressed as an increase in the time spent on the open arms, was observed only in animals treated with both cocaine and MDMA. Neurochemical analyses revealed an increase in striatal DA turnover and a decrease in serotonin cortical turnover in mice treated with MDMA plus cocaine. The studies conducted to establish long-term effects, which were performed 3 weeks after a 3-day treatment of two daily injections of MDMA alone or plus cocaine (6 administrations) during the adolescent period, showed that mice treated with MDMA alone and plus cocaine spent more time engaged in social contact, although those also treated with cocaine exhibited threat behaviors. Furthermore, we observed a neurotoxic effect in mice exposed to 20 mg/kg of MDMA, evident in a decrease in DA levels in the striatum, but this effect was not detected in mice additionally treated with cocaine. On the other hand, using the conditioned place preference (CPP), we have confirmed the rewarding effects of MDMA. In addition, we also show that MDMA can produce reinstatement of place preference after the extinction of this response. The expression and reinstatement of MDMA-induced CPP depend on the conditioning protocol, which conditions the neurotoxic effects produced by this drug. Finally, exposure during adolescence to MDMA alone or plus cocaine facilitates the rewarding effects of MDMA in adulthood. Moreover, previous experience of cocaine increases the time required to extinguish the MDMA-induced CPP.

Keywords: MDMA, cocaine, mice, adolescence, serotonin, dopamine, reinstatement, CPP, motor activity, elevated plus maze, social interaction, passive avoidance task, DOPAC, HVA, 5-HIAA.

ÍNDICE

1.-Introducción	25
2.-Antecedentes	31
2.1.-Historia	31
2.2.-Epidemiología del consumo del éxtasis	33
3.-Adolescencia y drogodependencia: El éxtasis y su uso como droga recreativa	43
3.1.-La adolescencia como periodo crítico del desarrollo	43
3.1.1.-Cambios morfológicos en el cerebro adolescente	49
3.2.-Uso y abuso	53
3.3.-Dependencia y adicción	63
4.-Farmacología de la MDMA	73
5.-Efectos de la MDMA sobre diferentes sistemas de neurotransmisión	79
5.1.-Serotonina	80
5.2.-Dopamina	82
5.3.-MDMA y neurotoxicidad	85
5.3.1.-Neurotoxicidad serotoninérgica	85
5.3.1.1.-Ratas	85
5.3.1.2.-Primates	97
5.3.2.-Neurotoxicidad dopaminérgica	101
5.3.2.1.-Ratas	101
5.3.2.2.-Ratones	101
6.-Efectos agudos de la MDMA	109
6.1.-Efectos en los seres humanos	109
6.2.-Efectos en animales de laboratorio	117
6.2.1.-Efectos de la MDMA sobre la temperatura corporal	117
6.2.2.-Efectos de la MDMA sobre la conducta	121
6.2.2.1.-Actividad locomotora	122

6.2.2.2.-Ansiedad	126
6.2.2.3.-Memoria	132
6.2.2.4.-Efectos reforzantes	133
7.-Efectos a largo plazo de la MDMA	139
7.1.-Efectos en los seres humanos	139
7.2.-Efectos en animales de laboratorio	147
7.2.1.-Efectos de la MDMA sobre la temperatura corporal y otras funciones	147
7.2.2.-Efectos de la MDMA sobre la conducta	149
7.2.2.1.-Actividad locomotora	149
7.2.2.2.-Ansiedad	154
7.2.2.3.-Memoria	160
7.2.2.4.-Efectos reforzantes	162
8.-Policonsumo	167
8.1.-Cocaína	169
9.-Hipótesis y objetivos	179
9.1.-Hipótesis	179
9.2.-Objetivos	180
9.2.1.-Objetivos del estudio 1	180
9.2.2.-Objetivos del estudio 2	181
9.2.3.-Objetivos del estudio 3	181
9.2.4.-Objetivos del estudio 4	182
10.-Estudio 1. Efectos conductuales y neurotóxicos de la MDMA sola o en combinación con cocaína en ratones adolescentes	185
10.1.-Introducción	185
10.2.-Material y Métodos	187
10.2.1.-Sujetos	187
10.2.2.-Tratamiento farmacológico y diseño experimental	187
10.2.3.-Aparatos y procedimiento	188
10.2.3.1.-Actividad locomotora	188
10.2.3.2.-Laberinto elevado en cruz	188
10.2.3.3.-Prueba de interacción social	189
10.2.3.4.-Evitación pasiva	190

10.2.3.5.-Análisis de monoaminas cerebrales	191
10.3.-Análisis estadístico	192
10.4.-Resultados	194
10.4.1.-Actividad locomotora	194
10.4.2.-Laberinto elevado en cruz	198
10.4.3.-Prueba de interacción social	201
10.4.4.-Evitación pasiva	203
10.4.5.-Análisis de monoaminas cerebrales	205
10.5.-Discusión	208
11.-Estudio 2. Efectos conductuales y neurotóxicos a largo plazo de la MDMA, sola o en combinación con cocaína, en ratones adolescentes	219
11.1.-Introducción	219
11.2.-Material y Métodos	221
11.2.1.-Sujetos	221
11.2.2.-Tratamiento farmacológico y diseño experimental	221
11.2.3.-Aparatos y procedimiento	222
11.2.3.1.-Prueba de interacción social	222
11.2.3.2.-Análisis de monoaminas cerebrales	222
11.2.3.3.-Determinación de la temperatura rectal	223
11.3.-Análisis estadístico	223
11.4.-Resultados	224
11.4.1.-Prueba de interacción social	224
11.4.2.-Efecto de la administración <i>binge</i> de MDMA sobre la temperatura rectal	227
11.4.3.-Peso corporal	229
11.4.4.-Análisis de monoaminas cerebrales	231
11.5.-Discusión	234
12.-Estudio 3. Efectos reforzantes y reinstauración del CPL inducido por la MDMA en ratones adolescentes	247
12.1.-Introducción	247
12.2.-Material y Métodos	250
12.2.1.-Sujetos	250
12.2.2.-Tratamiento farmacológico	250
12.2.3.-Aparatos y procedimiento	251

12.2.3.1.-Condicionamiento de la preferencia de lugar	251
12.2.3.2.-Análisis de monoaminas cerebrales	255
12.3.-Análisis estadístico	255
12.4.-Resultados	256
12.4.1.-Experimento 1. Efectos de la MDMA sobre la adquisición, la extinción y la reinstauración de la preferencia de lugar utilizando un protocolo de dos sesiones/día durante la adquisición del CPL	256
12.4.2.-Experimento 2. Efectos de la MDMA sobre la adquisición, la extinción y la reinstauración de la preferencia de lugar utilizando un protocolo de días alternos durante la adquisición del CPL	259
12.4.3.-Análisis de monoaminas cerebrales	262
12.5.-Discusión	270
13.-Estudio 4. Efectos reforzantes y reinstauración del CPL inducido por la MDMA o cocaína en ratones adolescentes con experiencia previa en ambas drogas	279
13.1.-Introducción	279
13.2.-Material y Métodos	284
13.2.1.-Sujetos	284
13.2.2.-Tratamiento farmacológico	284
13.2.3.-Aparatos y procedimiento	285
13.2.3.1.-Condicionamiento de la preferencia de lugar	285
13.3.-Análisis estadístico	287
13.4.-Resultados	288
13.5.-Discusión	298
14.-DISCUSIÓN GENERAL	315
15.-CONCLUSIONES	327
15.1-Conclusión general	333
ANEXOS	335
16.-BIBLIOGRAFIA	387

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

2,3-DHBA	Ácido 2,3-dihidroxibenzoico
2,5-DHBA	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
5,7-DHT	5,7-dihidroxitriptamina
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5-HTTLPR	Región polimórfica ligado al gen del SERT
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AA	Auto-administración
ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ATV	Área tegmental ventral
Ca²⁺	Calcio
CAL	Condicionamiento aversivo de lugar
CAR	Cuestionario Anual de Informes
COMT	Catecol-O-metiltransferasa
Core	Núcleo o centro del núcleo <i>Accumbens</i>
CPF	Corteza prefrontal
CPL	Condicionamiento de la preferencia de lugar
CREB	Factor de transcripción del AMPc que responde a la proteína de unión
CYP2D6	Citocromo P450 2D6
DA	Dopamina
DAT	Transportador dopaminérgico
DEA	<i>Drug Enforcement Administration</i>
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
DSM-4 TR	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Desórdenes Mentales TR
DSP-4	N-(2-cloretil)-N-etil-2-bromobencilamina
EC	Estímulo condicionado
EDADES	Encuesta Domiciliaria sobre Abuso de Drogas
ESTUDES	Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias
EXT	Extinción
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
HHA	3,4-dihidroxianfetamina
HHMA	3,4-dihidroximetanfetamina
HMA	4-hidroxi-3-metoxianfetamina
HMMA	4-hidroxi-3-metoximetanfetamina
HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión
HVA	Ácido homovalínico
IMD	Informe Mundial sobre las Drogas
KO	<i>Knock out</i>
LCBF	Flujo sanguíneo cerebral

LCMRglu	Utilización cerebral de glucosa
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LEC	Laberinto elevado en cruz
MAO	Monoaminoxidasa
mCPP	meta-clorofenilpiperazina
MDA	3,4-metilendioxfanfetamina
MDBD	N-metil-1-(3,4-metilendioxfanil)-2-butanamina
MDEA	Metilendioxiétanfetamina
MDMA, éxtasis	3,4-metilendioxi metanfetamina
NA	Noradrenalina
Nacc	Núcleo <i>Accumbens</i>
NAT	Transportador noradrenergico
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NOS	Sintetasa del óxido nítrico
NSD-1015	3-hidroxibenzilhidrazina
ONU	Organización de las Naciones Unidas
ONUDD	Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
PBN	α -fenil-N-terbutil nitrona
PCA	p-cloroanfetamina
PMA	p-metoxianfetamina
Post-C	Post-condicionamiento
Pre-C	Pre-condicionamiento
REINST	Reinstauración
RMf	Resonancia magnética funcional
SERT	Transportador serotoninérgico
Shell	Corteza o cubierta del núcleo <i>Accumbens</i>
SNC	Sistema Nervioso Central
SPECT	Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones
TEP	Tomografía por emisión de positrones
THC	delta-9-tetrahidrocannabinol
VMAT	Transportador vesicular
WT	<i>Wild type</i>

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

La 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA o éxtasis) es un derivado anfetamínico, con propiedades euforizantes y entactógenas, que favorece la comunicación y la apertura emocional del sujeto. Es muy probable que estas propiedades hayan favorecido el incremento del consumo de esta sustancia en las dos últimas décadas, muy especialmente entre adultos jóvenes y adolescentes, principalmente en las denominadas fiestas “*rave*”.

En general, tanto en España como en el resto de los países, los sujetos usuarios de éxtasis también consumen otras drogas. De hecho, en un alto porcentaje los sujetos se inician con otro tipo de drogas, como son el cannabis o la cocaína y paralelamente amplían su consumo con la MDMA. Es probable que el contexto social en el que se consumen estas drogas y la baja percepción del riesgo, facilite el acceso a la misma y por tanto su consumo. En Estados Unidos se considera que la cocaína es consumida por el 43% de los consumidores de éxtasis (datos del año 2004 y 2006) y en España también se estima que la cocaína es consumida por el 75% de los consumidores de esta droga (ESTUDES 2007).

Diferentes estudios nos indican que los policonsumidores, en este caso de éxtasis y de cocaína, describen problemas de ansiedad, alteraciones de la memoria, diferentes problemas emocionales y psiquiátricos, incluso después de estar un tiempo, más o menos prolongado, sin consumir estas sustancias. En general, son escasos los estudios que han evaluado las consecuencias de la MDMA cuando se combina con otro psicoestimulante, como es la cocaína, y este consumo se realiza durante la adolescencia.

La adolescencia constituye un periodo evolutivo especialmente relevante, durante el cual diferentes procesos neuroanatómicos, neuroquímicos y neurofisiológicos, cambian y modulan la plasticidad del sistema nervioso central. Estos procesos de maduración se traducen en un cambio y en una serie de transiciones en las funciones cognitivas, psicológicas y sociales, así como por alteraciones conductuales e incluso farmacológicas propias de esta edad. De hecho, la adolescencia es un periodo de gran vulnerabilidad

Introducción

biológica a las propiedades adictivas de los psicoestimulantes y otras drogas de abuso. Por ejemplo, los roedores periadolescentes muestran un perfil conductual propio, y son muy sensibles a la administración de psicoestimulantes, por ello estos animales son considerados con un modelo útil para el estudio de los factores de riesgo asociados con la vulnerabilidad a los trastornos del comportamiento adolescente en los seres humanos. Existen numerosos estudios sobre los efectos neuroquímicos y conductuales de la MDMA en roedores, sin embargo no muchos evalúan las consecuencias de esta droga cuando se combina con la cocaína (poliabuso), siendo todavía más escasos los estudios enfocados a discernir si este policonsumo se sitúa en un periodo crítico del desarrollo, como es la adolescencia.

Por ello en la presente “Tesis Doctoral” y como objetivo general, nos hemos planteado estudiar los efectos conductuales y neuroquímicos de la administración de la MDMA y la cocaína en ratones adolescentes. En primer lugar se analizan con cierto detalle aspectos históricos y farmacológicos de la MDMA, así como los principales sistemas de neurotransmisión que están implicados en sus efectos. Además, se describen los resultados más significativos de diferentes estudios, realizados tanto en seres humanos como con diferentes especies de animales, observando los efectos agudos y a largo plazo de esta droga. Igualmente, en esta parte de la “Tesis Doctoral” también se analiza la adolescencia como un periodo crítico del desarrollo, así como los cambios morfológicos en el cerebro adolescente y su relación con la adicción a las drogas, finalizando esta parte describiendo el cambio progresivo de patrones de consumo hasta el denominado “policonsumo” haciendo más hincapié en el consumo combinado de cocaína y MDMA.

En la segunda parte de la presente “Tesis Doctoral” se presentan los cuatro estudios experimentales que contestan al objetivo general planteado y a los objetivos concretos señalados más adelante. En el primer estudio hemos pretendido observar los efectos agudos de la administración de MDMA en ratones adolescentes, sola o en combinación con la cocaína, sobre la actividad locomotora espontánea, la ansiedad (mediante el laberinto elevado en cruz y la interacción social) y la memoria (mediante la evitación pasiva). Además hemos pretendido determinar la concentración de monoaminas cerebrales en

diferentes estructuras, concretamente se estudiaron los niveles de serotonina (5-HT), y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el estriado, la corteza y el hipocampo, y los niveles de dopamina (DA), del ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), y del ácido homovalínico (HVA) fueron analizados en el estriado, todo ello después de la administración de estas dos drogas.

En el segundo estudio hemos evaluado los efectos a largo plazo de la administración en ratones adolescentes de MDMA, igualmente sola o en combinación con la cocaína. En este segundo estudio pretendimos en primer lugar observar si la cocaína modificaba a largo plazo los efectos producidos por la administración de la MDMA, durante el periodo adolescente, concretamente sobre la ansiedad, evaluada mediante la prueba de interacción social. En segundo lugar nuestro interés se centró en determinar si los posibles cambios comportamentales, a largo plazo, producidos por la exposición a estas drogas durante la adolescencia podría estar relacionado con un daño neurotóxico, para lo cual se analizaron las concentraciones cerebrales de la DA y la 5-HT, así como también la de sus metabolitos, en diferentes estructuras como el estriado, el hipocampo, y la corteza, después de tres semanas de la administración de las drogas.

En el tercer estudio hemos observado, igualmente en ratones adolescentes, el efecto reforzante de la MDMA. Además, hemos analizado los efectos a largo plazo de esta droga sobre la conducta de extinción y reinstauración en estos roedores. Tanto el efecto reforzante, como la extinción y la reinstauración se han determinado mediante el modelo del Condicionamiento de la Preferencia de Lugar (CPL). En este tercer estudio, y teniendo en cuenta que el protocolo de condicionamiento podría influir en la adquisición del CPL, se realizaron dos estudios con protocolos diferentes durante la fase de adquisición de la preferencia de lugar. Después de la adquisición del CPL inducido por la MDMA, todos los animales fueron sometidos a sesiones de extinción y posteriormente de reinstauración mediante la re-exposición a la MDMA. Igualmente, se estudiaron los niveles de 5-HT, y 5-HIAA en el estriado, la corteza y el hipocampo y los niveles de DA, DOPAC, y HVA fueron analizados en el estriado, con los distintos protocolos de administración utilizados.

Introducción

Una vez que habíamos observado los efectos reforzantes de la MDMA, los procesos de extinción y reinstauración, e identificado el mejor protocolo de adquisición en el CPL, en el cuarto y último estudio pretendimos observar los efectos reforzantes y la reinstauración del CPL inducido por la MDMA o la cocaína en ratones adolescentes con experiencia previa en ambas drogas. Concretamente pretendimos observar la relación existente entre la exposición temprana a estas drogas y la respuesta de los animales, a los efectos reforzantes, extinción y reinstauración de ambas drogas, en la edad adulta, como un modelo para estudiar la vulnerabilidad a la recaída.

En general, los resultados de estos estudios nos pueden ayudar a comprender mejor por qué la adolescencia es un periodo de particular vulnerabilidad en el desarrollo de la adicción a las drogas, y las consecuencias a largo plazo del consumo en estas edades de diferentes drogas, como la MDMA y la cocaína, apoyando la idea de que dicha exposición puede cambiar o modificar los sustratos neurobiológicos y que estos cambios pueden perdurar incluso en la edad adulta.

ANTECEDENTES



2. ANTECEDENTES

2.1. Historia

La 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) es el principio activo de una droga popularmente conocida como éxtasis. Este compuesto es considerado como un derivado anfetamínico cuyas propiedades euforizantes y entactógenas favorecen la comunicación interpersonal, permiten la apertura emocional del individuo, y reducen los pensamientos negativos y las inhibiciones (Nichols, 1986). Estas propiedades son posiblemente la causa del incremento en el consumo de MDMA en últimas dos décadas, especialmente entre los adolescentes y adultos jóvenes, situándola en la actualidad como una de las drogas de abuso de mayor consumo en Europa (Cole y Sumnall, 2003a).

La MDMA fue sintetizada en 1912 por la compañía farmacéutica Merck en Darmstadt, Alemania (Shulgin, 1986). Este compuesto fue desarrollado con la intención de comercializarlo como un supresor del apetito, sin embargo, algunas publicaciones refieren que la MDMA fue empleada principalmente como un precursor, o como un intermediario químico en la fabricación de sustancias hemostáticas (Freudenmann y cols., 2006). En 1976, Alexander Shulgin propuso nuevos mecanismos para la síntesis química de la MDMA, y publicó los primeros informes sobre los efectos psicoactivos de éste compuesto (Shulgin y Nichols, 1978; López-Muñoz y cols., 2004). Además, por recomendación del propio Shulgin, el psicoterapeuta Leo Zoff empleó este psicoestimulante como coadyuvante en sus sesiones de psicoterapia, mejorando así la relación con sus pacientes (Greer y Tolbert, 1990; Corral y Alonso y Sopolana-Rodríguez, 1998; Sáiz y cols., 2003; López-Muñoz y cols., 2004).

La MDMA produce una intensificación de la comunicación y permite la exploración de las relaciones interpersonales, características por las cuales en un principio le caracterizaron como un compuesto “empatógeno” (generador de empatía). No obstante, algunos sujetos describían que el consumo de este psicoestimulante les permitía entrar en contacto con uno

Antecedentes

mismo y les facilitaba la comunicación de sus emociones más internas, por lo que la MDMA fue clasificada como una sustancia “entactógena”, término de raíces latinas que significa “permitir un contacto interior” (López-Muñoz y cols., 2004).

La incorporación de la MDMA en la psicoterapia permitió que este compuesto se diera a conocer rápidamente, lo cual, benefició su consumo como droga recreacional. Asimismo, la creación del movimiento “Nueva Era” (*New Age*) a principios de la década de los años 80 favoreció el uso este psicoestimulante (López-Muñoz y cols., 2004). En las calles, la MDMA era, y sigue siendo, identificada bajo distintas denominaciones: “*emphaty*”, “*lovedrug*”, “*essence*”, “*Adam*”, “*clarity*”, “*XTC*”, “*zen*”, “*banana Split*”, “*M&M*”, pero al final se ha consagrado con el nombre de “éxtasis” (López-Muñoz y cols., 2004). En los Estados Unidos, la producción y la distribución del éxtasis se localizaba en Boston y Texas (Beck y Rosenbaum, 1994), mientras que su consumo, cada vez más común, se producía entre la comunidad estudiantil universitaria que solía asistir a eventos dentro del marco de la cultura psicodélica, *underground* o a fiestas del tipo *dance* o “*tecno*” (Corral y Alonso y Sopelana-Rodríguez, 1998; Sáiz y cols., 2003; López-Muñoz y cols., 2004).

La súbita expansión del consumo de éxtasis alertó a algunos sectores del Gobierno Americano, quienes tomaron todas las medidas necesarias para tratar de controlar el uso de esta sustancia. La similitud del éxtasis con la MDA (3,4-metilendioxiánfetamina) que también posee propiedades alucinógenas y, por otro lado, el potencial neurotóxico avalado mediante estudios con animales, propiciaron que la DEA (Drug Enforcement Administration) prohibiera su consumo en 1985 mediante la incorporación de la MDMA, y sus derivados, en la Lista I del Convenio de Sustancias Psicotrópicas bajo control Internacional. Por otro lado, en España, el éxtasis quedó incluido en su correspondiente lista de acuerdo a la Orden Ministerial del 6 de junio de 1986 (Sáiz y cols., 2003).

La incorporación de la MDMA en la lista I de la DEA causó una enorme polémica, ya que tuvo lugar sin que se hubieran realizado estudios específicos sobre ésta droga en seres humanos, y se basó fundamentalmente en la neurotoxicidad provocada en el ratón por su

análogo MDA. El debate fue constante, existiendo grupos favorables al consumo, que empleaban como elemento de comunicación la red de Internet, frente a autores que consideran que el consumo suponía un alto riesgo, o los que señalan que no existían evidencias tangibles de neurotoxicidad (Corral y Alonso y Sopolana-Rodríguez, 1998; Sáiz y cols., 2003; López-Muñoz y cols., 2004).

2.2. Epidemiología

A pesar de la prohibición, el consumo del éxtasis mostró un aumento vertiginoso durante la década de los 90; sin embargo, los últimos datos aportados la Organización de las Naciones Unidas (ONU) a través de su Informe Mundial sobre las Drogas (IMD) sugieren que el uso de este psicoestimulante se está estabilizando, o incluso se ha observado una ligera tendencia hacia la disminución de su consumo (IMD, 2007). Valoraciones recientes estiman que 200 millones de personas (5% de la población mundial entre 15 y 64 años de edad) han consumido drogas al menos una vez durante el último año. El IMD, el cual, es elaborado por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDD), informó en el 2006 (periodo 2004-2005) que aproximadamente 10 millones de personas consumían éxtasis a nivel mundial. Sin embargo, un año después (2007), el IMD informó que la prevalencia (proporción de personas que sufren una enfermedad con respecto al total de la población en estudio) anual del consumo de éxtasis (periodo 2005-2006) ha disminuido considerablemente, estimando en 9 millones las personas (0.2 % de la población de 15-64 años de edad) que emplean este psicoestimulante.

El IMD se elabora a partir de datos aportados mediante el Cuestionario Anual de Informes (CAR), los cuales, son enviados por Gobiernos de distintos países a la ONUDD. No obstante, este informe muestra dos limitaciones de gran importancia: (1) los informes CAR carecen de una organización sistemática debido al número de países que contribuyen con sus datos y al contenido de los mismos y, (2) la mayor parte de los países carecen de adecuados sistemas de monitorización para elaborar datos fiables, completos y que puedan compararse internacionalmente (IMD, 2006; 2007). No obstante, los datos aportados por el

Antecedentes

Informe de la ONUDD permiten darnos una idea de la situación actual de las drogas a nivel mundial.

En España, los Informes Nacionales se elaboran principalmente de los datos aportados por la Encuesta Domiciliaria sobre Abuso de Drogas (EDADES), promovida por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas en colaboración con los gobiernos autonómicos, y que comenzó a aplicarse en 1995. La muestra lo constituye la población de 15 a 64 años residente en España, y el tamaño se ha mantenido en torno a 12,000 individuos. La Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias (ESTUDES) también aporta datos a los Informes Nacionales, y es promovida también por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, en colaboración con los gobiernos autonómicos (planes autonómicos sobre drogas y consejerías de educación) y con el Ministerio de Educación y Ciencia, y se realizó por primera vez en 1994. La muestra la componen los estudiantes españoles de 14 a 18 años que cursan Enseñanzas Secundarias y en cada una de la encuestas participan en torno a 20,000-25,000 estudiantes (Observatorio Español sobre Drogas, 2007).

De acuerdo con el IMD (2007), los resultados más significativos obtenidos durante el último año se observaron en América del Norte, donde continúa registrándose una tendencia descendiente en el consumo de éxtasis. Esto resultados pueden deberse al éxito de las estrategias emprendidas para contener la oferta y sensibilizar a la población acerca de los riesgos asociados al consumo de esta sustancia (IMD, 2006; 2007). Después del fuerte incremento a finales de los años 90, las encuestas escolares y domiciliarias realizadas en Ontario, Canadá, así como también en los Estados Unidos, mostraron un decremento significativo en el consumo de éxtasis desde el comienzo del nuevo milenio. Sólo en Estados Unidos se observó un descenso en el uso de este psicoestimulante desde un 1.3% (2002), hasta un 0.8% de la población de 15 a 64 años de edad (2005). Mientras tanto, en la provincia de Ontario en Canadá, se observó un decremento del 55% (del 2001 al 2006) en el consumo de éxtasis entre los estudiantes de nivel secundaria.

Por otra parte, en Europa se localizan el 36% de los consumidores de éxtasis a nivel mundial (ver Figura 1), de los cuales, el 90% se concentran en Europa Central y Occidental. Además, se estima que el 0.9% de la población europea de 15-64 años de edad ha consumido éxtasis durante el último año, lo cual, excede los niveles de América del Norte (0.8%). No obstante, a pesar de los datos mostrados anteriormente, se ha observado que durante los últimos años el consumo de éxtasis se ha estabilizado en varios países de Europa Occidental; aunque continúa observándose un aumento en la tendencia de consumo en varios países del Sur y del Este de Europa (IMD, 2007).

La estabilización, o la tendencia de reducción, observada en el consumo de éxtasis en Europa Central y Occidental, podría estar relacionada con los esfuerzos y las campañas de prevención llevados a cabo en estas regiones, destinadas a informar a los adolescentes y adultos jóvenes sobre los daños potenciales del consumo del éxtasis. Otros factores que podrían contribuir incluyen la caída en la popularidad de la cultura “rave”, así como también a un mayor control sobre la regulación y distribución de los precursores del éxtasis (IMD, 2007).

La ONUDD, en su último IMD (2007), destacó los resultados obtenidos en España y en el Reino Unido. En este sentido, en la población de 16-59 años de edad de Inglaterra y Gales, se observó un aumento en el consumo anual de éxtasis desde el 1% en 1994, hasta un 2.2% durante el 2002. Recientemente, las tasas de prevalencia anual del uso de este psicoestimulante han caído hasta un 1.6% (2006), llegando a igualar los resultados obtenidos en 1998 (1.5%). Por otro lado, mediante las encuestas domiciliarias realizadas en España se estimó que la prevalencia de consumo anual de éxtasis cayó del 1.9% (población de 15-64 años de edad) registrado en el 2001, hasta un 1.2% reportado en el 2005 (ver Figura 2).

Cabe destacar que cuando se reduce el rango poblacional en estudio, las estimaciones de consumo de éxtasis aumentan. De acuerdo con el Informe Anual del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2006), los Estados Unidos han registrado niveles de

Antecedentes

consumo de drogas notablemente más elevados que los países europeos, pero la comparación de los datos de consumo reciente (prevalencia del año anterior) indica que algunos países europeos registran niveles de consumo de éxtasis entre los adultos jóvenes (15-34 años de edad) similares a los existentes en los Estados Unidos (ver Figura 3). Sin embargo, en términos generales, la media poblacional europea sigue siendo inferior a la media estadounidense en todos los indicadores (Informe Anual del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2006).

En la mayoría de países que disponen de información obtenida a partir de estudios consecutivos, las encuestas de población muestran un incremento del consumo reciente de éxtasis entre la población de 15 a 34 años de edad (ver Figura 4). Si bien, las excepciones son Alemania y Grecia, donde los niveles no han aumentado, y el Reino Unido, donde el consumo de estas drogas se ha estabilizado recientemente (2002/2003), aunque a niveles relativamente elevados (Informe Anual del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, 2006).

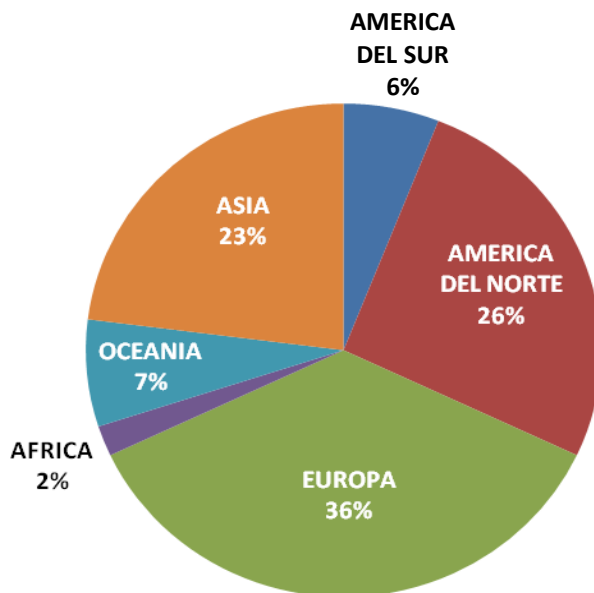


Figura 1. Distribución mundial del consumo de éxtasis durante el periodo 2005-2006 (total: 8.6 millones de personas). Modificado del IMD, 2007. Fuentes: Cuestionario Anual de Reportes, Informes Gubernamentales, Reportes Regionales y Estimaciones de la ONUDD.

Antecedentes

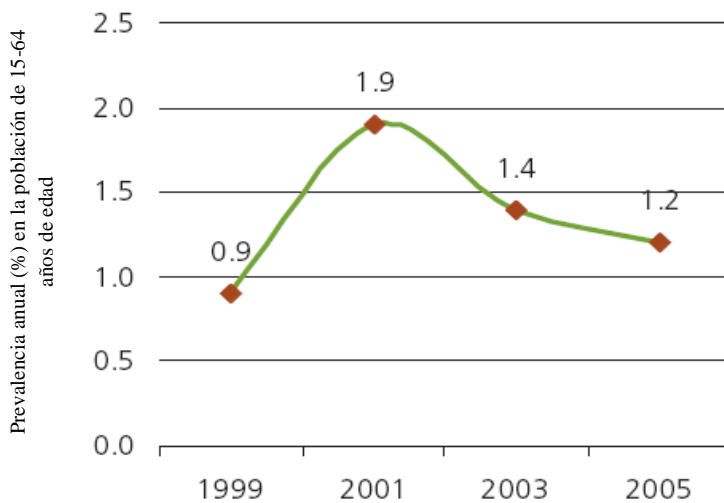


Figura 2. Prevalencia anual del consumo de éxtasis en España en la población de 15-64 años de edad (1999-2005). Modificado del IMD, 2007.

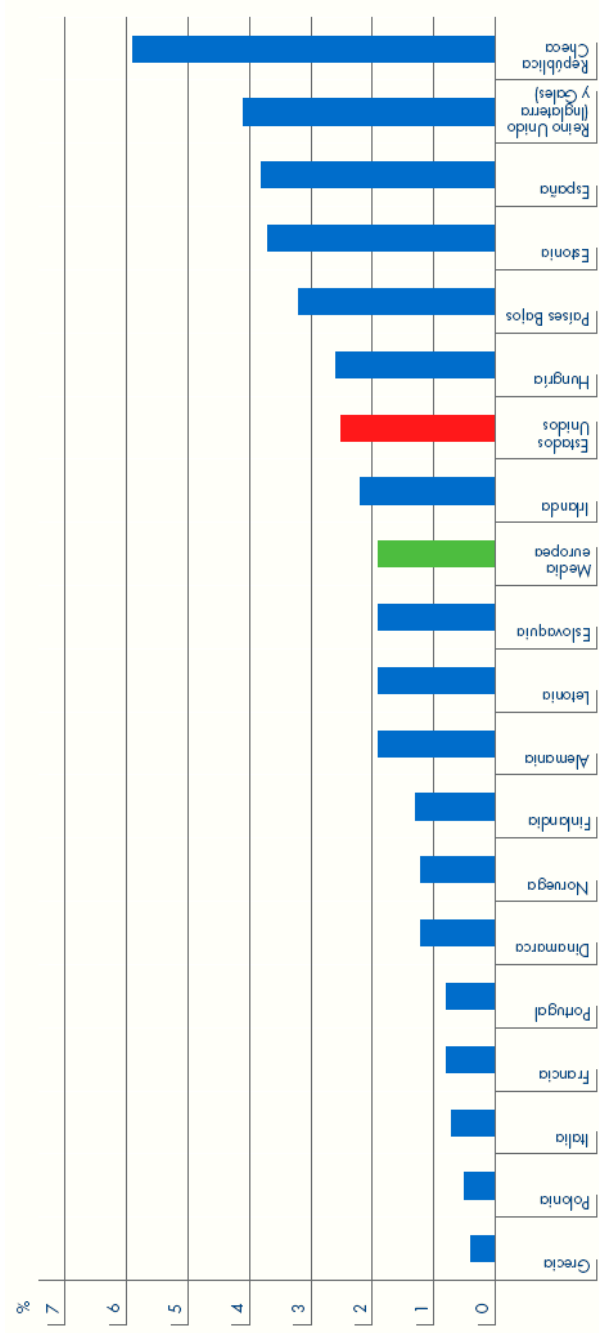


Figura 3. Porcentaje de la prevalencia anual del consumo de éxtasis entre adultos jóvenes (de 15 a 34 años). Informe Anual del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías del 2006.

Antecedentes

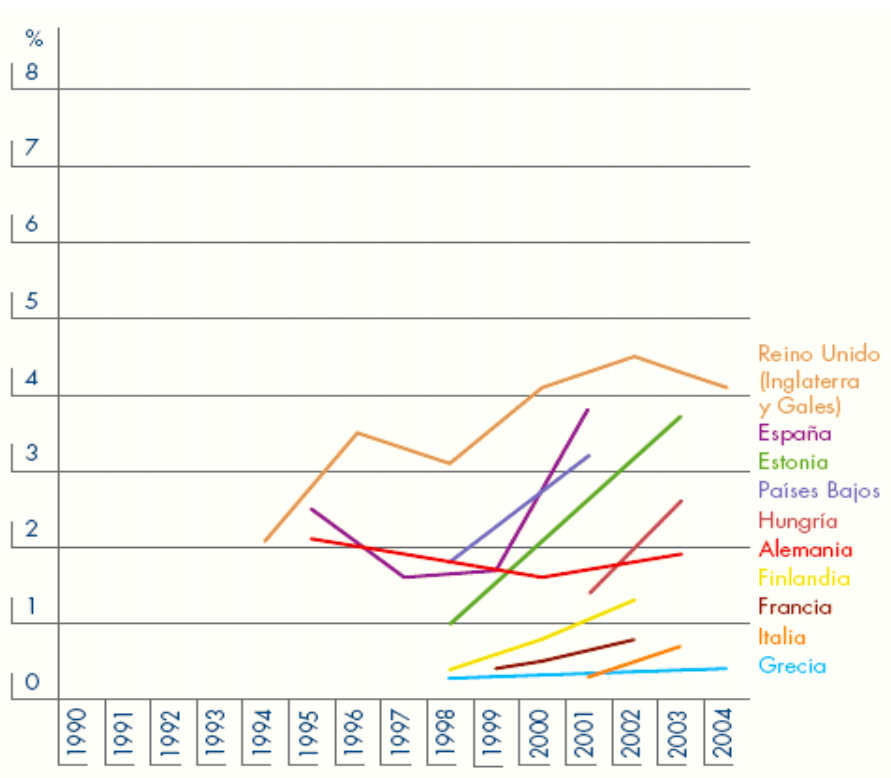
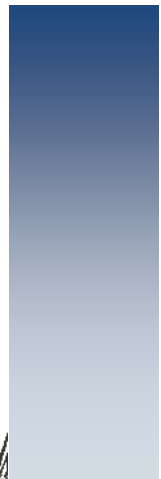
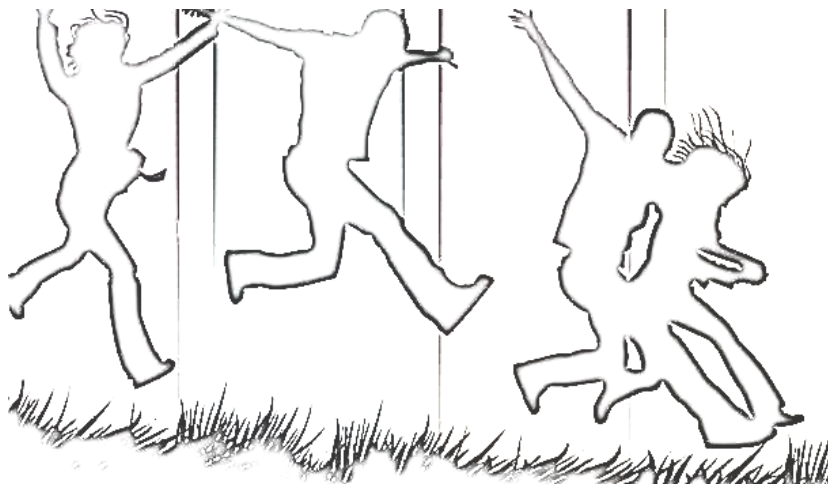


Figura 4. Tendencias de la Prevalencia anual del consumo de éxtasis entre adultos jóvenes (de 15 a 34 años), obtenidas a través de encuestas de población. Informe Anual del Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías del 2006.

Adolescencia y drogodependencia: El éxtasis y su uso como droga recreativa



3. ADOLESCENCIA Y DROGODEPENDENCIA: EL ÉXTASIS Y SU USO COMO DROGA RECREATIVA

3.1. La adolescencia como periodo crítico del desarrollo

La adolescencia representa un periodo de gran vulnerabilidad biológica a las propiedades adictivas de los psicoestimulantes. Asimismo, se ha observado que la progresión del consumo de drogas es más rápida durante esta fase del desarrollo en comparación con la edad adulta (Estroff y cols., 1989; Warner, 1995).

La adolescencia es un periodo ontogénico único durante el cual, diversos procesos neuroanatómicos, neuroquímicos y neurofisiológicos, modulan la plasticidad del cerebro en desarrollo. Los cambios inducidos durante la maduración cerebral se caracterizan por una serie de transiciones de las funciones cognitivas, psicológicas y sociales, así como también, por alteraciones conductuales y farmacológicas específicas de la edad (Spear y Brake, 1983; Witt, 1994; Adriani y Laviola, 2000). Los factores ambientales son capaces de interactuar con las funciones psicológicas y neurobiológicas del individuo, y de esta forma podrían predisponerlo o protegerlo del abuso y/o la dependencia a las drogas (Laviola y cols., 1999). Por lo tanto, los patrones de consumo, el riesgo de progresar del uso al abuso, y la posibilidad de desarrollar dependencia, quizás están relacionados con el acercamiento temprano a las drogas (Newcomb, 1995; Anthony y Petronis, 1995; Breslau y Peterson, 1996). De esta forma, los procesos del desarrollo que se expresan durante la adolescencia, y que conducen a la adaptación del individuo, podrían ser afectados por la exposición a las sustancias psicoactivas a una edad temprana. En consecuencia, la exposición aguda o crónica a las drogas durante la adolescencia, podrían interferir con el crecimiento satisfactorio, la maduración, y con el correcto desarrollo cognitivo y psicosocial del individuo (Laviola y cols., 1999).

La adolescencia no es sinónimo de pubertad, y puede ser considerada como una transición entre la infancia y la edad adulta. La pubertad es un periodo más discreto, y se le relaciona con alteraciones neuroendocrinas y fisiológicas asociadas a la madurez sexual (Spear,

Adolescencia

2002). Por el contrario, la adolescencia incluye factores psicológicos y sociales, y sus límites temporales no están definidos con exactitud. Durante este periodo, los individuos desarrollan habilidades de supervivencia, que les permiten alcanzar una independencia parental. En los seres humanos, la adolescencia es definida habitualmente como el rango de edad comprendido entre los 9 y los 18 años aproximadamente. No obstante, algunos autores consideran que el periodo adolescente podría abarcar más allá de los 25 años (adolescencia tardía) (Spear, 2000a). En los animales, los límites temporales de la adolescencia también son tema de controversia. La periadolescencia puede ser considerada como las edades en las que se hace patente la madurez sexual, donde se observan cambios conductuales y fisiológicos específicos. Se ha sugerido que en las ratas y en los ratones, la adolescencia comprende desde el periodo del destete (21 días de edad) hasta el periodo adulto (60 días de edad aproximadamente), y diversos autores han propuesto su empleo como un modelo animal en el estudio de las características psicobiológicas de la adolescencia humana (Laviola y cols., 2002; 2003; Smith, 2003; Brent, 2004a; 2004b; Leslie y cols., 2004; Izenwasser, 2005; Crews y cols., 2007). En definitiva, la adolescencia en los roedores puede clasificarse en 3 intervalos de edad: adolescencia temprana (prepuberal o juvenil, 21 a 34 días de edad), adolescencia media (periadolescencia, 34 a 46 días de edad), y adolescencia tardía (adultos jóvenes, 46 a 59 días de edad) (Laviola y cols., 2003).

Durante la adolescencia, las zonas cerebrales de la recompensa sufren diversos cambios que podrían favorecer el uso continuo de una droga (Laviola y cols., 1995; 1999; Adriani y cols., 1998; Bolanos y cols., 1998). Asimismo, los factores genéticos, la experiencia, o elementos fortuitos relacionados con la edad, modulan la variabilidad individual en la respuesta a los efectos de las sustancias psicoactivas (Spear y cols., 1985; Deminiere y cols., 1989; Laviola y cols., 1992; 1994; Koff y cols., 1994; Laviola y Dell'Olmo, 1997). Por ejemplo, en comparación con los adultos, se ha observado que los adolescentes muestran una mayor resistencia a los efectos psicoestimulantes de la cocaína esnifada, por lo que estos sujetos podrían consumir una mayor cantidad de esta droga. (Weiss y cols., 1994). Además, la progresión del consumo de la cocaína es más rápida en los adolescentes, y en consecuencia, el potencial adictivo de la cocaína podría aumentar en estos sujetos (Estroff y cols., 1989). Igualmente, es necesario destacar que el primer contacto con las

drogas se observa durante la adolescencia, alcanzando un nivel máximo de consumo en torno a los 20 años de edad (Johanson y Fishman, 1989).

Por otro lado, los adolescentes también muestran alteraciones en la respuesta a los estímulos motivacionales. En estos individuos, se ha observado un aumento en el afecto negativo y del estado de ánimo depresivo. En comparación con individuos más jóvenes o de mayor edad, se ha sugerido que los adolescentes muestran cierto grado de anhedonia, y los valores incentivos moderados o bajos ejercen un menor impacto positivo, por lo que las situaciones positivas son menos placenteras para estos sujetos (Larson y cols., 2002). Asimismo, las sensaciones de felicidad pueden disminuir hasta en un 50% en la infancia tardía, incluso cuando se refieren a las mismas actividades los adolescentes las perciben menos agradables que los adultos (Larson y Richards, 1994). Por lo tanto, los adolescentes pueden estar dispuestos a obtener nuevos reforzadores apetitivos mediante el aumento de conductas de asunción de riesgos y búsqueda de novedades, incluyendo el uso de drogas.

La exploración del ambiente representa un aspecto fundamental del repertorio conductual del individuo, y tiene una gran importancia tanto desde el punto de vista ontogénico como filogenético. Los mamíferos son capaces de coordinar la información obtenida mediante sus sentidos para crear un modelo en su cerebro del mundo que les rodea (Jerison, 1988). Esta representación de la realidad se establece durante la infancia, y requiere una revisión regular debido a los cambios que ocurren con la experiencia del individuo y en el ambiente. Por lo tanto, los mamíferos son buscadores de información, y a nivel biológico están destinados a poner más atención a toda la información novedosa, por lo que esta clase de animales es atraída por los estímulos novedosos, así como también por las variaciones del entorno, o por la intensidad de la información familiar (Wilz y Bolton, 1971; Renner y Seltzer, 1991).

La búsqueda de nuevas sensaciones es una conducta que se caracteriza por la necesidad constante de experimentar diferentes emociones de carácter novedoso, y que se cree son reforzantes (Zuckerman, 1994). Habitualmente los sujetos que muestran altos índices de búsqueda de sensaciones suelen estar implicados en actividades de riesgo, así como

Adolescencia

también con el consumo de drogas ilícitas (Wills y cols., 1994). En comparación con los adultos, los adolescentes muestran una mayor motivación para la búsqueda de sensaciones novedosas. Por lo tanto, estos individuos pueden ser más susceptibles al primer acercamiento a las drogas (Laviola y cols., 1999).

Estudios llevados a cabo en ratas, han demostrado que la novedad ambiental induce un aumento de la concentración de DA en el núcleo *Accumbens* (NAcc) (Rebec y cols., 1997). Por el contrario, la lesión del sistema dopaminérgico mesolímbico mediante la administración de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), impide la expresión de la conducta de la búsqueda de novedades (Fink y Smith, 1980; Pierce y cols., 1990). De la misma forma, las recompensas proporcionadas de forma repetida e intermitente, aleatoria o de modo inesperado, tienen la capacidad de inducir la liberación de DA en el NAcc, de mantener el “*firing*” (disparo) de las neuronas dopaminérgicas, y la conducta condicionada recompensante (Waelti y cols., 2001). En consecuencia, se producen cambios en los mecanismos celulares implicados en las vías de señalización intracelular, en la expresión genética, y en la arquitectura celular, los cuales, podrían modular algunos fenómenos como la sensibilización conductual, dando lugar a que los estímulos placenteros tengan un mayor impacto en el individuo (Nestler y cols., 2001).

Las alteraciones dopaminérgicas mesocorticolímbicas son un sello característico del cerebro adolescente (Spear, 2002). En animales, se ha demostrado que los adolescentes muestran alteraciones en la sensibilidad psicofarmacológica, lo que indica una hiposensibilidad temporal del sistema dopaminérgico durante la adolescencia. En las ratas adolescentes, se ha observado una menor sensibilidad a los efectos estimulantes de la amfetamina y la cocaína, así como al antagonista dopaminérgico haloperidol, en comparación con ratas adultas o más jóvenes (Spear y Brake, 1983).

Por otra parte, se ha demostrado que la preferencia por la novedad favorece los efectos psicoestimulantes de las drogas (Klebaur y cols., 2001a; 2001b). Se ha observado que los adolescentes (animales y humanos) que muestran una alta preferencia por los estímulos novedosos, son más susceptibles al uso/abuso de drogas (Spear, 2000a; Zuckerman, 1996). En este sentido, los animales adolescentes que muestran una menor latencia de aproximación a un objeto novedoso, muestran una mayor respuesta dopaminérgica a un *challenge* de cocaína (Stansfield y Kirstein, 2005).

La cocaína, la anfetamina, y el metilfenidato producen una activación conductual dependiente de la dosis (Heffner y Seiden, 1982; Gerasimov y cols., 2000; Schramm-Sapyta y cols., 2004). No obstante, el efecto de las sustancias psicoestimulantes puede variar con la edad de los animales. Mediante el procedimiento de la auto-administración (AA), se ha demostrado que la cocaína tiene un menor efecto reforzante en ratas de 31 días de edad, en comparación con animales adultos de 41 y 95 días de edad (Leslie y cols., 2004). Asimismo, las ratas periadolescentes muestran una menor respuesta motora tras la administración de cocaína o anfetamina (Spear y Brake, 1983; Laviola y cols., 1999; Adriani y Laviola, 2000).

Los ratones recién destetados muestran una mayor sensibilidad a la respuesta motora de la anfetamina, y una mayor actividad estereotipada en comparación con ratones lactantes (Cirulli y Laviola, 2000). No obstante, tras la administración de metilfenidato, cocaína o anfetamina, los ratones recién destetados muestran una menor actividad locomotora y estereotipada que los animales periadolescentes y adultos (Niculescu y cols., 2005). Además, tras la administración repetida de cocaína y metilfenidato, los ratones adultos desarrollan sensibilización conductual a ambas drogas, mientras que los ratones periadolescentes sólo exhiben sensibilización a los efectos motores de la cocaína (aunque en menor grado que los animales adultos). Por lo tanto, se sugiere que a través de los diferentes estados de la ontogenia postnatal se observan diferentes patrones de sensibilización conductual, los cuales, podrían jugar un papel importante en la adicción a las drogas (Niculescu y cols., 2005).

Adolescencia

Las variaciones metabólicas entre los ratones adolescentes y los adultos podrían estar implicadas en las diferencias en las respuestas a los psicoestimulantes. Tras la administración de cocaína, los ratones periadolescentes CD1 y C57BL/6 muestran menores concentraciones cerebrales de esta droga, en comparación con animales adultos. En consecuencia, se ha sugerido que estos animales quizás metabolizan más rápido la cocaína (McCarthy y cols., 2004). Sin embargo, se ha observado que a pesar de las diferencias en el metabolismo de las drogas, los ratones adolescentes muestran respuestas conductuales similares a los animales adultos (Niculescu y cols., 2005).

La búsqueda de sensaciones novedosas y la impulsividad son rasgos que aumentan durante la adolescencia y disminuyen con la edad (Arnett, 1992; Spear, 2000b). En 1938, Murray postuló que la impulsividad era una tendencia a responder rápidamente sin reflexionar sobre las consecuencias. Actualmente, la impulsividad es descrita como un constructo multidimensional, que incluye una orientación hacia una recompensa, incapacidad para retardar la gratificación, desinhibición conductual, factores de riesgo, búsqueda de sensaciones, propensión al aburrimiento, sensibilidad a las recompensas, falta de perseverancia, y poca planificación (Gerbing y cols., 1987; Malle y Neubauer, 1991; Moeller y cols., 2001; Petry, 2001; Semple y cols., 2005). Por lo tanto, la impulsividad puede ser considerada como una conducta que se caracteriza por una falta de juicio en el momento de obtener una recompensa, como las drogas, el sexo, alimento, el poder social (por medio de la violencia), el dinero, u otras fuentes donde predominan elecciones de alto riesgo/poco beneficio, o una selección de recompensas inmediatas de menor impacto sobre grandes recompensas que requieran de un mayor esfuerzo (Petry y Casarella, 1999; Evenden, 1999a; 1999b; Moeller y cols., 2001; Bechara, 2001).

En un estudio, se evaluaron los niveles de impulsividad entre ratones adolescentes y adultos mediante cámaras operantes con 2 agujeros para *nose-poke*. La ejecución de un *nose-poke* en un agujero determinado provocaba la entrega inmediata de una pequeña cantidad de comida, mientras que la realización del *nose-poke* en el segundo agujero proporcionaba una cantidad mayor de alimento, aunque con retraso. La duración de la demora fue aumentando progresivamente durante varios días (desde 0 hasta 100 segundos), y a medida que

aumentaba, los ratones adolescentes, en comparación con los adultos, mostraban un cambio más marcado en la preferencia hacia el refuerzo inmediato. Por lo tanto, se ha sugerido que los animales adolescentes son menos tolerantes que los adultos al retraso en la entrega de un refuerzo dado. Este perfil conductual es considerado como un índice de elevada impulsividad (Laviola y cols., 2003).

En el mismo experimento, durante el intervalo de tiempo que precedía a la entrega de la comida, no se requería ninguna respuesta conductual y los animales sólo tenían que esperar. Sin embargo, se observó que algunos animales exhibían conducta *nose-poke*. Debido a que esta conducta no tenía repuestas programadas, su expresión representa una respuesta “inadecuada” o “impulsividad motora”. Curiosamente, los ratones adolescentes mostraron más respuestas inadecuadas que los adultos, por lo que este parámetro podría ser un índice de inquietud incrementada (Laviola y cols., 2003).

Los patrones de la respuesta impulsiva han sido asociados con desórdenes del control de impulsos y los trastornos adictivos (Bechara y cols., 2001). Las teorías sobre el consumo de drogas han propuesto una relación entre las conductas de riesgo y la impulsividad. Asimismo, se considera que el policonsumo en si mismo podría aumentar la propensión al riesgo y la pérdida del control de los impulsos (Plant y Plant, 1992; De Wit y cols., 2002).

3.1.1. Cambios morfológicos en el cerebro adolescente

La eficacia funcional del sistema dopaminérgico mesolímbico disminuye temporalmente durante la adolescencia. Los mamíferos experimentan una reducción importante de los niveles de motivación. Por lo tanto, los cambios que experimenta el sistema mesolímbico modulan posiblemente las alteraciones conductuales, como aburrimiento e insatisfacción, que caracterizan esta etapa del desarrollo humano. Quizás, la búsqueda constante de estímulos salientes represente una estrategia conductual, lo que conlleva a un aumento de la curiosidad, y por consiguiente del riesgo y de la vulnerabilidad del individuo (Laviola y cols., 2003; Crews y cols., 2007).

Adolescencia

La respuesta incentiva a la novedad afecta los mismos substratos neuronales implicados en la recompensa. La búsqueda de novedades ha sido relacionada con una mayor actividad eléctrica en el área tegmental ventral (ATV), produciendo en consecuencia un aumento de la concentración de DA en el NAcc. Por ello, la novedad podría representar una recompensa incentiva por sí misma. Los ratones periadolescentes son buscadores natos de la novedad. Igualmente, el ser humano adolescente busca constantemente sensaciones novedosas, pero esta conducta disminuye al alcanzar la edad adulta. Los mecanismos neurobiológicos implicados podrían estar relacionados con menores niveles de DA en la hendidura sináptica, y la hipoactividad dopaminérgica justifica quizás la búsqueda persistente de estímulos reforzantes. Puesto que la activación de los receptores dopaminérgicos del tipo D₁ es esencial en la regulación de la conducta de búsqueda de novedades, la alta densidad de estos receptores durante la adolescencia podría estar implicada en el aumento de la búsqueda de nuevas sensaciones. Además, a pesar de la hipoactividad dopaminérgica basal durante la adolescencia, se puede alcanzar un alto nivel de DA extracelular en respuesta a un estímulo novedoso. Las ratas adolescentes tienen mayores reservas de DA, en comparación con las adultas, y a pesar de la reducida liberación de este neurotransmisor en condiciones basales, el sistema dopaminérgico adolescente es capaz de liberar mucha más DA si se estimula al máximo, en respuesta a estímulos ambientales o farmacológicos. Por lo tanto, se hipotetiza que algunos acontecimientos específicos naturales, particularmente reforzantes a esta edad, producen una mayor liberación de DA en comparación con la edad adulta (Laviola y cols., 2003; Crews y cols., 2007).

Antes de la pubertad, los receptores dopaminérgicos cerebrales están sobreexpresados, pero su densidad disminuye posteriormente hasta alcanzar los valores que habitualmente se observan en adultos. Con el inicio de la pubertad, estos receptores pueden sufrir una poda programada, un proceso implicado en la maduración neuronal. La corteza prefrontal (CPF) y el sistema mesolímbico sufren una reorganización neuronal durante la adolescencia. El volumen de la CPF disminuye durante este periodo en los seres humanos (Sowell y cols., 1999; 2001) y en las ratas (van Eden y cols., 1990). En esta misma estructura, durante el periodo adolescente en los seres humanos y en los primates no humanos se observa una

pérdida substancial de las sinapsis, especialmente en los *inputs* excitatorios glutamatérgicos que alcanzan la CPF, (Huttenlocher, 1984; Zecevic y cols., 1989). En contraste, los *inputs* dopaminérgicos y serotoninérgicos hacia la CPF aumentan durante este periodo del desarrollo hasta niveles muy por encima de los observados a edad temprana o tardía (Kalsbeek y cols., 1988; Rosenberg y Lewis, 1994). La inervación colinérgica de la CPF también aumenta en la adolescencia hasta alcanzar los niveles observados en las ratas (Gould y cols., 1991) y en los seres humanos adultos (Kostovic, 1990). En el hipocampo (Swann y cols., 1999), la amígdala medial (Zehr y cols., 2006), el NAcc (Teicher y cols., 1995; Tarazi y cols., 1998b) y el hipotálamo (Choi y Kellogg, 1992; Choi y cols., 1997), los axones excitatorios y las sinapsis también sufren una remodelación morfológica durante la adolescencia, y finaliza cuando el individuo alcanza la edad adulta. En contraste, se ha observado que la expresión de los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos en las ratas, alcanzan niveles máximos durante la adolescencia temprana (28 días de edad), y posteriormente se pierde un 33% de los receptores durante el periodo que comprende de los 35 hasta los 60 días de edad (Tarazi y cols., 1998a). En términos de la función hipotalámica, las ratas adolescentes muestran un incremento persistente de la respuesta del cortisol inducida por el estrés (Walker y cols., 2001). A los 28 días de edad, estos animales también muestran una menor inmunoreactividad Fos como respuesta al estrés en la corteza y en la amígdala (Kellogg y cols., 1998). Sin embargo en el hipocampo, se produce una gran activación del Fos en respuesta a la novedad durante este periodo (Waters y cols., 1997). Por lo tanto, se ha sugerido que las alteraciones ambientales en la transcripción genética son únicas durante la adolescencia, y probablemente impactan en la remodelación activa de las conexiones sinápticas.

La transmisión dopaminérgica contribuye a la atención, la recompensa, el movimiento, la regulación hormonal y a múltiples procesos fisiológicos de gran importancia. La reorganización postnatal de la neurotransmisión dopaminérgica es específica de algunas zonas cerebrales y de ciertos tipos de receptores. En la CPF, la corteza entorrinal, y el hipocampo de la rata, los receptores dopaminérgicos D₁, D₂, y D₄ aumentan significativamente durante la adolescencia (desde los 7 hasta los 35 días de edad), y se estabilizan posteriormente hasta la edad adulta (Tarazi y Baldessarini, 2000). En el estriado

Adolescencia

y el NAcc, los receptores dopaminérgicos son sobreexpresados y posteriormente se pierde un tercio de su densidad durante la adolescencia, lo que caracteriza la remodelación de la maduración de las vías motoras y de la recompensa (Teicher y cols., 1995; Tarazi y Baldessarini, 2000). Además, los receptores D₃ alcanzan su nivel máximo en la edad adulta (60 días de edad) en el estriado, el NAcc y el tubérculo olfatorio (Stanwood y cols., 1997). En contraste, la densidad de los transportadores dopaminérgicos (DAT) aumenta hasta un 700% en el cerebro desde los 7 días de vida hasta los 60 días de edad en el estriado (Tarazi y cols., 1998b). Esta remodelación de la neurotransmisión dopaminérgica durante la adolescencia podría contribuir a la estabilización de las conductas que se establecen en este periodo del desarrollo. El consumo de drogas podría alterar la maduración de la neurotransmisión dopaminérgica durante la adolescencia, alterando en consecuencia el correcto desarrollo de actitudes, acciones, y recompensas sociales.

Por otra parte, la neurotransmisión serotoninérgica también sufre una reorganización morfológica durante el desarrollo, la cual, es importante para el estado de ánimo, el sueño, la ansiedad y muchas otras conductas complejas del individuo. En los seres humanos y en las ratas, las neuronas serotoninérgicas se generan antes del nacimiento (Lauder y Bloom, 1974; Lauder, 1990). Los niveles máximos se alcanzan en la edad temprana, y disminuye hasta alcanzar la edad adulta (Hedner y cols., 1986; Toth y Fekete, 1986). La reorganización postnatal de las proyecciones serotoninérgicas en desarrollo, es ejemplificada por fluctuaciones en el número de las sinapsis, las cuales, alcanzan los valores adultos a los 14 días de edad. En el cerebro anterior de la rata, los niveles decaen significativamente durante la adolescencia temprana (Dinopoulos y cols., 1997; Dori y cols., 1998). La reorganización de los receptores serotoninérgicos también es pronunciada durante el desarrollo, y probablemente está relacionada con los cambios en los patrones de la inervación serotoninérgica. Por ejemplo, los receptores 5-HT_{2A} de la corteza de la rata y el mono, alcanzan su máximo nivel de expresión justo antes de la adolescencia, y disminuye progresivamente hasta valores adultos, lo que se correlaciona con el incremento en la inervación y la poda de los axones serotoninérgicos (Morilak y Ciaranello, 1993). En los seres humanos, los gatos, y los roedores, hay una sobreexpresión de los receptores 5-HT_{1A} durante el nacimiento, pero declina dramáticamente durante la adolescencia (Daval y

cols., 1987; Bar-Peled y cols., 1991; Dillon y cols., 1991; Dyck y Cynader, 1993; Burnet y cols., 1994; del Olmo y cols., 1998). El *turnover* de 5-HT en el NAcc es aproximadamente un 400% más bajo en las ratas adolescentes (de 30 a 40 días de edad) en comparación con ratas jóvenes (de 10 a 15 días de edad) o adultas (de 60 a 80 días de edad) (Teicher, 1999). Es interesante indicar que la baja actividad serotoninérgica en la adolescencia podría contribuir con las conductas comúnmente observadas en los adolescentes, como hipersensibilidad a estresores moderados, incremento en la ansiedad y un mayor consumo de drogas (Depue y Spoont, 1986). En contraste, la densidad de los transportadores serotoninérgicos (SERT) en la rata se mantiene elevada desde los 7 días de vida hasta el periodo adulto, sin una pérdida significativa en el estriado y el NAcc (Tarazi y cols., 1998b). Los estudios que modelan en consumo de alcohol en “*binge*” (atracones) han demostrado incrementos considerables en los valores adultos de los SERT (Monti y cols., 2005). Así, la neurotransmisión serotoninérgica sufre una dramática remodelación desde la juventud a través de la adolescencia hasta alcanzar la edad adulta, siendo sensible a alteraciones inducidas por las drogas. En resumen, la maduración de los sistemas de neurotransmisión continúa durante la adolescencia, observándose una remodelación pronunciada en las regiones límbica y frontal.

3.2. Uso y abuso

El consumo de éxtasis suele ser recreacional o esporádico, y habitualmente es consumida por adolescentes y adultos jóvenes durante los fines de semana (Meilman y cols., 1990; Solowij y cols., 1992). Se ha descrito que el consumidor típico es una persona de unos 20 años con un estilo de vida “normal” durante la semana, que estudia y/o trabaja, pero que los fines de semana le gusta “transgredir” consumiendo de 0.5 a 4 pastillas de éxtasis cuando sale de fiesta (Dughiero y cols., 2001; El-Mallakh y Abraham, 2007). Por lo regular, un sujeto sin experiencia consume una o media pastilla de MDMA durante su primera vez, aunque las mujeres suelen ser más conservadoras e ingieren solo la mitad de esas dosis (Hansen y cols., 2001, Parrott, 2005; Outslay, 2006). Aunque la mayor parte de los usuarios de éxtasis prefieren el consumo oral, un alto porcentaje recurre a diferentes métodos (y

Adolescencia

diferentes cantidades), así la MDMA puede ser esnifada, fumada, inyectada, o administrada incluso mediante supositorios (Outslay, 2006).

Cabe destacar que regularmente se asocia el consumo de éxtasis con las personas que asisten a las fiestas del tipo *rave*. Entre las sustancias psicoactivas que comúnmente se utilizan en este tipo de eventos se mencionan el éxtasis, las anfetaminas y el LSD, aunque también suele describirse el uso de ketamina y cocaína (Dotson y cols., 1996; Forsyth, 1996; Hanson y Luciana, 2004). Por otra parte, se sugiere que existen cuatro componentes clave para distinguir una fiesta *rave*: la música, el lugar, la gente y las drogas, sin restricciones de edad o admisión (Weir, 2000). La música se caracteriza por ser no comercial, y no se asemeja a la que se reproduce en los clubes nocturnos. Muchos de los géneros de la música *rave* son producidos por ordenador e incluyen poco o ningún acompañamiento vocal (básicamente es electrónica). El tipo de música que se emite en este tipo de eventos incluyen “*house*”, “*acid house*”, “*hardcore*”, “*ambient*”, “*faster moving hardcore*” o “*happy hardcore*”, “*jungle*” o “*drum & bass*”, y “*tecno*” o “*trance*”. Como un ejemplo, el *tecno* es descrito como “un sonido extremadamente ruidoso, repetitivo y rápido”, creado por personas identificadas como DJ’s (“*disk jockeys*” o pincha discos) (Weir, 2000). Las fiestas *rave* duran toda la noche, y en ocasiones incluso parte del día siguiente. Este tipo de eventos solían llevarse a cabo de forma clandestina en lugares secretos ubicados por lo regular en campos abiertos, sin embargo, en la actualidad se realizan en áreas públicas como almacenes, salas de conciertos, solares o discotecas donde regularmente se genera una gran cantidad de calor y humedad (Merchant y MacDonald, 1994; Weir, 2000). Regularmente el término *rave* se suele relacionar con “eventos donde la gente baila y consume éxtasis” (Saunders, 1995). No obstante, no todos los *ravers* (termino mediante el cual se identifican a las personas que asisten a las *raves*) consumen drogas, pero si se ha observado que un gran número de jóvenes las utilizan libremente sin tener en consideración los daños potenciales (Gilman, 1991; Weir, 2000).

La mayor parte de las pastillas de éxtasis se distribuyen con diferentes logotipos que facilitan su identificación (ver Figura 5). En este sentido, a pesar de mostrar el mismo diseño, los comprimidos pueden no contener los mismos ingredientes. En Europa, entre

1995 y 1997, se realizó un análisis del contenido de 69 pastillas de éxtasis identificadas con el mismo logo, de las cuales, se encontró que 30 pastillas contenían 91.3 mg de MDMA (rango entre 2 y 149 mg), 19 contenían 106.8 mg de metilendioxietilamfetamina o MDEA (36-167 mg), 8 pastillas contenían una mezcla de sustancias en las que se incluían MDMA, MDEA, anfetamina y cafeína, 1 contenía 184 mg de N-metil-1-(3,4-metilendioxifenil)-2-butanamina o MDD, y 1 pastilla contenía sólo MDMA. En análisis de 46 pastillas sin logo demostró que solo una pastilla no contenía MDMA o MDEA, el 72% contenían entre 80 y 140 mg de MDMA, mientras que el 12% contenían MDEA. Así, se observó que las pastillas sin diseño muestran una alta calidad, en comparación con los comprimidos con diseño. Asimismo, se ha observado que el 10% de las pastillas distribuidas actualmente no contienen ingredientes activos, o en su defecto contienen aspirina o alguna sustancia similar, el 5% de las pastillas podrían contener anfetamina, efedrina y cafeína, el 20% MDEA, el 10% MBDB, mientras que el 60% contiene por lo regular MDMA (Milroy, 1999).

Por otra parte, se ha descrito que los efectos placenteros del éxtasis disminuyen con el uso frecuente. Algunos usuarios manifiestan una disminución de los efectos estimulantes de la MDMA, y con el tiempo tienden a aumentar la dosis, cambian los intervalos de administración, o inclusive recurren a la administración en *binge*. En esta línea, el consumo en *binge* se aprecia con frecuencia en los consumidores de éxtasis con más experiencia, y por lo general se describen dos patrones de consumo: el uso de gran cantidad de pastillas de éxtasis de una vez, o el consumo repetido y prolongado de pastillas a lo largo de una noche o durante varios días sucesivos (Nichols, 1986; Hammersley y cols., 1999; Cole y Sumnall, 2003a; Parrott, 2004a; 2005; Outslay, 2006). Se ha observado que en ocasiones, los grandes usuarios de éxtasis llegan a consumir hasta 25 pastillas en una sola sesión (Parrott, 2005). Por lo tanto, se sugiere que a pesar de que muchos de los usuarios de la MDMA no se adecuan al perfil de un usuario compulsivo, existe un alto grado de variabilidad individual en el patrón de uso de esta droga, por lo que también hay que considerar el posible potencial del éxtasis como una droga de abuso (Soar y cols., 2006).

Adolescencia

La MDMA es única por sus efectos agudos entactogénicos debido a que produce una mezcla de estímulos de características alucinógenas y euforizantes (Nichols, 1986; Cole y Sumnall, 2003a), y también es única en cuanto a su tolerancia, la cual, se desarrolla rápidamente. Algunos consumidores describen su primera experiencia como la “mejor”, disminuyendo los efectos positivos con el uso repetido (Peroutka y cols., 1988). En este sentido, Fantegrossi y cols., (2004) observaron que los efectos reforzantes de la AA de MDMA en los monos Rhesus, disminuyen con el tiempo, mientras que los efectos recompensantes de la cocaína se mantienen sin cambios. Asimismo, Shulgin (1986) sugirió que la MDMA no se convertiría en una droga de abuso debido a la reducción rápida de su eficacia subjetiva. No obstante, muchos usuarios recreacionales incrementan la dosis, aunque los efectos encontrados con el éxtasis son poco usuales, ya que tomar el doble de MDMA no implica obtener el doble de los efectos positivos de la droga, por el contrario, lo que aumentan son los efectos negativos (Peroutka, 1989). Al parecer, el escalamiento de la dosificación ayuda a mantener la experiencia positiva de la droga, pero se observa una disminución de su eficacia psicoactiva. Además, al aumentar la intensidad en el uso del éxtasis, también aumentan los problemas neuropsicobiológicos relacionados (Schifano y cols., 1998; Topp y cols., 1999; Milani y cols., 2000; Parrott y cols., 2000; 2002; Scholey y cols., 2004). Por lo tanto, el consumidor necesita balancear su deseo de obtener una experiencia óptima, con la necesidad de minimizar las consecuencias derivadas del consumo de MDMA. Así, podría explicarse el porqué los consumidores de éxtasis muestran diferentes patrones de consumo (Fox y cols., 2001a; 2001b; Parrott, 2003; Parrott y cols., 2002). Algunos individuos aumentan el consumo para maximizar los efectos de la droga, mientras que otros la usan con moderación para minimizar las consecuencias a largo plazo (Topp y cols., 1999; Hansen y cols., 2001). Igualmente, como ya se ha mencionado anteriormente, conforme aumenta la experiencia del consumo los usuarios exhiben un patrón que incluye el uso de grandes cantidades de la droga (*binge*). Aunque la tolerancia acompaña por lo general al uso regular de MDMA, la tasa de desarrollo puede ser variable, y algunos usuarios pueden incluso no desarrollarla. La evidencia sugiere que los patrones de uso intermitente, y los ambientes con temperatura “normal” (Hansen y cols., 2001; Parrott, 2001; 2002; 2004b) podrían minimizar el desarrollo de tolerancia. En términos de los mecanismos implicados, la inducción enzimática hepática, la neuroadaptación y los

cambios conductuales son las explicaciones tradicionales de la tolerancia a las drogas psicoactivas (Leonard, 1997; Julien, 1998; Parrott, 2005). Se ha sugerido que la neurotoxicidad serotoninérgica podría estar implicada en el desarrollo de tolerancia a los efectos psicoestimulantes del éxtasis. En animales de laboratorio, se ha demostrado que la MDMA induce una pérdida de los terminales axónicos serotoninérgicos en algunas estructuras cerebrales (Schmidt, 1987; Sprague y cols., 1988; Steele y cols., 1994; Green y cols., 1995; Huether y cols., 1997; Ricaurte y cols., 2000; Green y cols., 2003). Sin embargo, en los humanos es imposible estudiar el efecto neurotóxico de la MDMA de forma directa, aunque mediante técnicas de neuroimagen se ha observado que los consumidores de éxtasis muestran déficits de la actividad serotoninérgica (McCann y cols., 1998; Obrocki y cols., 1999, Semple y cols., 1999; Kish y cols., 2000; Reneman y cols., 2001a; 2001b; 2001c; 2002; Kish, 2002). Por lo tanto, se postula que la tolerancia a los efectos subjetivos de la MDMA podría ser resultado, al menos en parte, de una neurotoxicidad serotoninérgica inducida por esta droga (Parrott, 2005).



Figura 5. Colección 2007 representada por noventa y nueve pastillas de éxtasis (foto adquirida de Erowid®)

Adolescencia

Por otro lado, algunos autores han relacionado el consumo recreacional del éxtasis con diversos problemas como déficits de memoria, trastornos psiquiátricos, alteraciones alimenticias, problemas del sueño, y pérdida del interés o del placer sexual (Schifano y cols., 1998; Topp y cols., 1999; McCann y cols., 2000; Parrott, 2000; 2001). En este sentido, en base a comparaciones realizadas entre usuarios de éxtasis y personas que no consumen esta droga (Morgan, 1999; Rodgers, 2000; Heffernan y cols., 2001), o mediante observaciones fundamentadas en el historial de consumo del éxtasis (consumidores ocasionales vs grandes consumidores), se ha observado que existe una asociación entre el número de veces que se ha consumido esta droga y algunos déficits cognitivos (Fox y cols., 2001a; 2001b). Asimismo, la prevalencia de diversos trastornos psicopatológicos como depresión, bulimia y un desorden del control de impulsos, estaría relacionada con la frecuencia de uso de este psicoestimulante (Schifano y cols., 1998). De igual manera, se ha informado que los grandes consumidores de éxtasis muestran una mayor incidencia de problemas psiquiátricos, en comparación con los usuarios moderados y/o los individuos que no consumen esta droga (Parrott y cols., 2000).

No existe un criterio uniforme que relacione los problemas ocasionados por la MDMA con el número de veces que se ha consumido esta sustancia (López-Muñoz y cols., 2004). Por lo tanto, no existe relación directa entre el número de veces en que el sujeto se ha expuesto a la droga y la aparición de alguna sintomatología, lo cual podría sugerir que los efectos adversos atribuidos a la MDMA podrían presentarse incluso tras una exposición mínima (Cohen, 1995). Por su parte, Parrott y cols., (2002) postulan que la incidencia de los problemas atribuidos a la MDMA está directamente relacionada con el número de veces que esta sustancia ha sido consumida (ver Figura 6).

En este sentido, estos autores sugirieron un sistema para clasificar a los usuarios del éxtasis de acuerdo con su historial de consumo, obteniendo así tres tipos de consumidores de éxtasis: “*light*” o “*novice*” para los consumidores ocasionales (1-9 ocasiones), “*moderate*” para los consumidores moderados (10-99 ocasiones), y “*heavy*” para los grandes consumidores o usuarios con mayor experiencia (> 100 ocasiones). De acuerdo con lo anterior, el 19% de los consumidores ocasionales, el 52% de los consumidores moderados,

y el 73% de los grandes consumidores refieren padecer problemas de memoria. Estos resultados también coinciden con diversos estudios (cuestionarios y pruebas prácticas), donde se han informado de una alta prevalencia de déficits cognitivos en los usuarios del éxtasis (Parrott y Lasky, 1998; Parrott y cols., 1998; Morgan, 1999; 2000; Gouzoulis-Mayfrank y cols., 2000; Rodgers, 2000; Heffernan y cols., 2001; Parrott, 2001; Rodgers y cols., 2001).

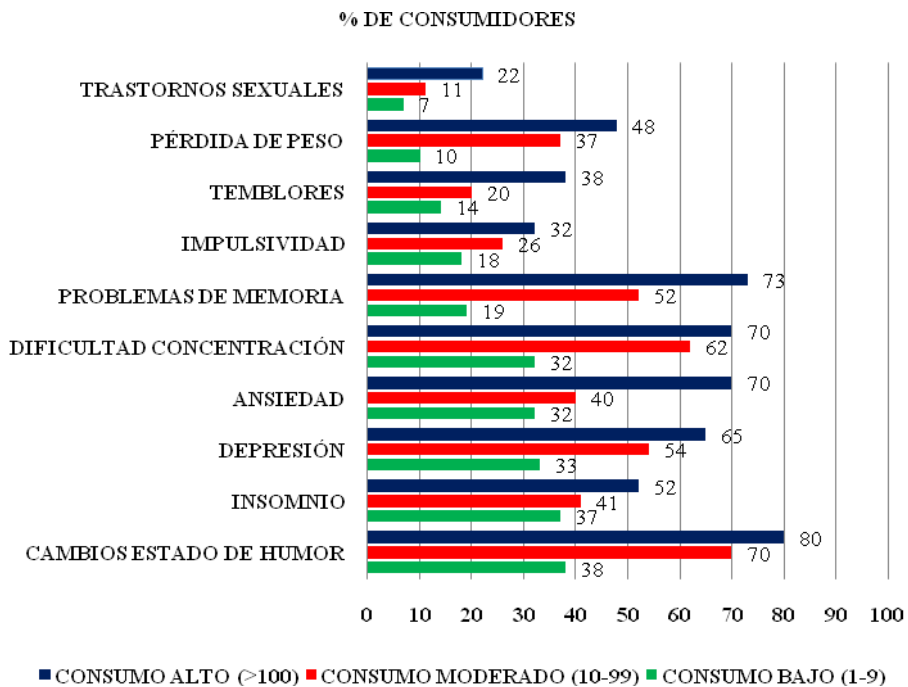


Figura 6. Principales síntomas observados en consumidores de éxtasis, de acuerdo con la frecuencia y la intensidad del consumo (n=282). Modificada de Parrott y cols., 2002, referido en López-Muñoz y cols., 2004).

Adolescencia

Con el fin de determinar los efectos a largo plazo de las drogas en los seres humanos, la evaluación de las funciones psicológicas previas al primer contacto sería lo ideal, para compararse después la de exposición a la droga. Debido a que las limitaciones éticas prohíben este tipo de estudios, los consumidores de MDMA son comparados por lo regular con diversos grupos control, incluyendo sujetos con uso previo de drogas, individuos no consumidores de MDMA (sin experiencia previa con esta droga, pero que si han utilizado otra clase de drogas), o consumidores de alcohol o cannabis que nunca han consumido MDMA. Es decir, personas que muestren niveles similares de uso previo de drogas sin experiencia de consumo de MDMA (Morgan, 1998; 1999; Gouzoulis-Mayfrank y cols., 2000; Parrott y cols., 2000; Croft y cols., 2001a; 2001b; Morgan y cols., 2002). En relación con estos grupos, los descubrimientos neuropsicológicos más consistentes en los consumidores de MDMA son los déficits de la memoria verbal bajo condiciones de demanda inmediata o retardada, en comparación con los consumidores de alcohol, los controles sin consumo de drogas, y los grupos no politoxicómanos, incluyendo los consumidores de cannabis (Curran y Travill, 1997; Bolla y cols., 1998; Parrott y Lasky, 1998; Parrott y cols., 1998; Morgan, 1999; Rodgers, 2000; Bhattachary y Powell, 2001; Fox y cols., 2001a; Reneman y cols., 2001a, 2001b; 2001c; 2001d, 2001e; Morgan y cols., 2002). Asimismo, los consumidores de MDMA muestran problemas para el reconocimiento visual y de la memoria de trabajo (Curran y Travill, 1997; Fox y cols., 2002), de la memoria a corto plazo (McCann y cols., 1999a), y muestran registros deficientes en baterías que evalúan la memoria compuesta (Wilson y cols., 1990).

Los trastornos mnemotécnicos en los usuarios de MDMA pueden estar relacionados con la dosis, puesto que aquellos individuos que tienen una alta experiencia de consumo (que con frecuencia incrementan mensualmente la dosis, y que han consumido esta droga durante más tiempo) muestran más alteraciones en las funciones cognitivas (Bolla y cols., 1998; McCann y cols., 1999a; Gouzoulis-Mayfrank y cols., 2000; Bhattachary y Powell, 2001; Fox y cols., 2001b; Reneman y cols., 2001a; Verkes y cols., 2001; Zakzanis y Young, 2001a; 2001b; Morgan y cols., 2002). Asimismo, se han observado problemas de fluidez verbal, de la función ejecutiva, en el control de los impulsos, en el tiempo de reacción, y en la velocidad de procesamiento de la información (Morgan; 1998; Schifano y cols., 1998;

Dafters y cols., 1999; Wareing y cols., 2000; Bhattachary y Powell, 2001; Heffernan y cols., 2001; Morgan y cols., 2002). Por otro lado, los resultados sobre los problemas en la atención varían dependiendo de la prueba empleada (Parrott y cols., 1998; Vollenweider y cols., 1998; McCann y cols., 1999a; Gouzoulis-Mayfrank y cols., 2000; Rodgers, 2000). De acuerdo a todo lo anterior, la evidencia sugiere que los daños en la memoria observados en los consumidores de MDMA son a largo plazo (Morgan, 1999) y potencialmente irreversibles (Wareing y cols., 2000; Morgan y cols., 2002). Por otra parte, los consumidores de MDMA por lo general abusan de otras drogas, las cuales, podrían producir efectos independientes o interactivos sobre el desempeño cognitivo (Gouzoulis-Mayfrank y cols., 2000; Croft y cols., 2001a; 2001b). Un gran inconveniente es el hecho de que la mayor parte de los estudios dependen de informes retrospectivos, y por lo tanto, es posible que los daños cognitivos se desarrollen, o aparezcan, antes del uso de la MDMA. Así, la relación causa/efecto entre el consumo de la MDMA y los trastornos psicológicos no han sido establecidas definitivamente (Parrott, 2005).

Parrott y cols., (2002) también observaron una relación entre algunos trastornos afectivos como la depresión, la ansiedad y los cambios en el humor, con el grado de consumo del éxtasis. De acuerdo con lo anterior, la sintomatología relacionada con este tipo de problemas emocionales fue identificada en el 60-80% de los grandes consumidores, en el 54-70% de los usuarios moderados, y en el 32-38% de los consumidores ocasionales. Este tipo de sintomatología también se observa con frecuencia en los días posteriores al consumo del éxtasis, y comúnmente se caracteriza por una gran euforia que va declinando hacia tristeza y el aislamiento social conforme transcurren los días sin consumo de la sustancia (Curran y Travill, 1997; Parrott y Lasky, 1998). Se ha sugerido que estos síntomas podrían estar relacionados con la depleción monoaminérgica a largo plazo derivada del uso de este psicoestimulante (Parrott, 2001).

Se ha observado que existen algunos trastornos como la impulsividad, los trastornos del sueño, y algunos problemas sexuales, que no están relacionadas con el historial de consumo de la MDMA. Muchos de los individuos evaluados muestran patrones irregulares de sueño y descanso, por lo cual, no es de sorprender que las alteraciones del sueño observadas en

Adolescencia

algunos usuarios no se relacionan con su historial de consumo. McCann y cols., (2000) observaron que la arquitectura del sueño de los usuarios abstinentes al éxtasis es diferente a la de los sujetos que no consumen esta droga. De la misma forma, mientras que algunos consumidores describen problemas en su actividad sexual, otros mencionan una mejoría en sus experiencias sexuales (Zemishlany y cols., 2001). Sin embargo, algunos consumidores ocasionales del éxtasis han descrito una pérdida del interés y/o placer sexual a largo plazo. En esta línea, Topp y cols., (1999) observaron que el 12% de los usuarios regulares del éxtasis describen una “pérdida del deseo sexual”, estos resultados fueron corroborados por Parrott y cols., (2001) quienes informaron que el 14% de los grandes consumidores muestran una “pérdida del interés y/o del placer sexual”.

La mayor parte de los estudios mencionados anteriormente presentan una serie de limitaciones, como por ejemplo la determinación inadecuada de la psicopatología estudiada. Muchos informes no proporcionan el método mediante el cual evalúan los desórdenes psiquiátricos; mientras que en otros no se realiza una determinación completa. Por otro lado, muchos usuarios cumplen con el criterio para sustancias de abuso y/o dependencia a la MDMA, y la presencia de este diagnóstico debería ser exhaustivamente evaluada (Cottler y cols., 2001). Asimismo, no existe un control preciso sobre las drogas que los individuos han consumido, ni existe conocimiento preciso sobre el contenido de las pastillas referidas como éxtasis (MDMA o una mezcla de otras drogas y/o sustancias sin efecto farmacológico). Al no existir un control sobre las drogas que se consumen, y ante la incertidumbre de la pureza de las pastillas de éxtasis, estos factores son una gran limitación para los estudios que se enfocan a la evaluación de los trastornos psicobiológicos derivados del uso de este psicoestimulante. Los grandes consumidores de éxtasis con frecuencia toman una gran variedad de sustancias psicoactivas, no solo compuestos ilícitos como las anfetaminas, cocaína, o LSD, sino también otras como alcohol y nicotina (Parrott y cols., 2001). Existen por tanto muchos factores que podrían interferir con los resultados obtenidos en un estudio dirigido a evaluar los efectos del consumo del éxtasis. Algunas de las conclusiones obtenidas se postulan en base a referencias realizadas por los mismos usuarios, que pueden reflejar un efecto rebote, aunque otros podrían ser resultado de una

neurodegeneración serotoninérgica a largo plazo (McCann y cols., 2000; Ricaurte y cols., 2000; Reneman y cols., 2001a).

3.3. Dependencia y adicción

La adicción es considerada como un desorden crónico recurrente que se caracteriza por (1) la búsqueda y el consumo compulsivo de una droga, (2) la pérdida del control para limitar el uso de la misma, y (3) la aparición de un estado emocional negativo (por ejemplo disforia, ansiedad, irritabilidad) cuando se suspende su consumo (síndrome de abstinencia) (Koob y Le Moal, 1997). Uno de los principales objetivos de la investigación neurobiológica en la adicción, es comprender los mecanismos neurofarmacológicos y neuroadaptativos, que ocurren en los neurocircuitos que modulan la transición entre el uso ocasional, y la pérdida del control conductual sobre la búsqueda y el consumo de las drogas (Koob y Le Moal, 1997).

Los problemas que usualmente se desarrollan durante el curso de la adicción no desaparecen tras la desintoxicación. Las drogas con potencial adictivo inducen cambios en las vías cerebrales, los cuales, persisten durante mucho tiempo y se mantienen a pesar de que el individuo ha dejado de consumirlas. Estos cambios a largo plazo y los problemas personales y sociales asociados con el consumo de la droga, hacen que el individuo sea más vulnerable a sufrir una recaída (O'Brien y McLellan, 1996). Un riesgo tan alto que el 60% de las personas recaen en el consumo de drogas durante su primer año de abstinencia (Finney y Moos, 1992; Hubbard y cols., 1997; McLellan y McKay, 1998; McLellan y cols., 2000).

Los criterios diagnósticos de la adicción se encuentran descritos en la 4ª edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Desórdenes Mentales TR (DSM-4 TR, ver Tabla 1) (Asociación Americana de Psiquiatría, 1994). Así, para que un individuo sea considerado como un “adicto” a una sustancia psicoactiva deberá cumplir con diversos criterios, los cuales, dependerán del grado de la adicción, del estado del proceso de la adicción, y de la droga en cuestión (Chung y Martin, 2001).

Adolescencia

Históricamente, las definiciones de adicción comenzaron con definiciones de dependencia. En esta línea, Himmelsbach definió la dependencia física como un estado anormalmente adquirido, en donde la administración regular de una droga es, mediante el uso previo prolongado, un requisito indispensable para mantener el equilibrio fisiológico. Debido a la dificultad para diagnosticar la dependencia física de forma objetiva, por lo regular se le relaciona con la presencia de un síndrome de abstinencia característico (Himmelsbach, 1943). Esta definición ha evolucionado hasta enunciarse como: la presencia de alteraciones físicas intensas que se aprecian cuando se suspende el consumo de una droga, como una condición en la cual, una droga produce un sentimiento de satisfacción, y un impulso psíquico que requiere de la administración periódica o continua de la droga para producir placer, o para evitar un malestar (Eddy y cols., 1965). Por lo tanto, la adicción podría definirse como el uso crónico, compulsivo, o incontrolable de una droga, hasta el punto en el que un individuo adicto no puede detener, o no detendrá el uso de una (o varias) droga(s). Lo anterior implica por lo regular, una fuerte dependencia psicológica, y una dependencia física que deriva en un síndrome de abstinencia cuando el uso de la droga es suspendido (Koob y LeMoal, 2005). En resumen, si entendemos por dependencia una manifestación de un síndrome de abstinencia, que se produce tras el cese del consumo de una sustancia, entonces cualquier droga podría producir dependencia. Sin embargo, de acuerdo con los criterios DSM-IV TR, la definición de dependencia va más allá de una simple manifestación de un síndrome de abstinencia. Aun así, para diversos autores la dependencia puede ser un equivalente de la adicción (Koob y LeMoal, 2005).

Existen datos que sugieren que algunos individuos muestran problemas relacionados con el consumo del éxtasis (Topp y cols., 1999), o cumplen con los criterios para dependencia del DSM-IV (Jansen, 1999; Cottler y cols., 2001). Así, en un estudio llevado a cabo en Australia donde participaron 185 consumidores de éxtasis, se observó que el 64% de los individuos evaluados cumplieron los criterios de dependencia a este psicoestimulante (Topp y cols., 1999). En Estados Unidos, Cottler y cols., (2001) encontraron resultados similares en el 43% de los adolescentes y adultos jóvenes estudiados (n=173). Por otra parte, Jansen (1999) describió tres casos en los que observó que sus pacientes (tres consumidores de MDMA) hacían intentos para detener el consumo de éxtasis, pero referían un gran deseo

por seguir utilizando este psicoestimulante, es más, estos sujetos se sentían fatigados, de humor decaído, ansiosos, mostraban alteraciones en el sueño, y también exhibían un “síndrome de abstinencia”. Cabe destacar, que uno de los casos descritos por Jansen (1999), también mostró dependencia para anfetaminas, otro paciente mostró una dependencia a benzodiacepinas y a opiáceos relacionada con una alta ingesta de alcohol, mientras que en el tercer caso se mencionó un consumo diario de alcohol. No obstante, los pacientes acudieron principalmente para tratar los problemas relacionados con el uso de éxtasis. Los grandes consumidores de éxtasis muestran una sintomatología relacionada con un síndrome de abstinencia, o manifiestan un alivio de sus síntomas con el cese del consumo de esta droga. Asimismo, se ha informado que los usuarios de la MDMA exhiben cansancio, somnolencia, o fatiga, y cambios en el apetito durante las primeras horas, o días después de la abstinencia al éxtasis, también describieron problemas de concentración y depresión, los cuales, son síntomas comúnmente descritos durante el cese del uso del éxtasis (Cottler y cols., 2001).

En la actualidad, no se dispone de información suficiente sobre la aparición de dependencia física ni tampoco de consumo compulsivo continuado de éxtasis. Sin embargo, como ya se ha descrito anteriormente, con el uso repetido y una mayor frecuencia de consumo, los efectos psicoestimulantes de la MDMA disminuyen (Peroutka, 1990; Jansen, 1999). Algunos usuarios que alcanzan este estado pierden el interés por la droga, aunque por el contrario, otros podrían incrementar la dosis, e incluso desarrollarían una dependencia por otras drogas. Una posible explicación sería que los consumidores buscan volver a experimentar los efectos iniciales de la droga, siendo atraídos por los efectos estimulantes que ellos recuerdan, y también por los factores sociales y psicológicos asociados con su uso, con lo cual, se incrementaría el riesgo de dependencia (Jansen, 1999). Por otro lado, Solowij y cols., (1992) informaron que el 15% de los usuarios de éxtasis consumen la droga de forma continuada durante varios días, el 43% no cambia la frecuencia de su consumo desde que la probó por primera vez (durante los fines de semana), el 26% disminuye su uso, y el 15% no presenta un patrón fijo de consumo. Así, en humanos es difícil establecer un patrón de dependencia al éxtasis debido a que la mayor parte de los individuos que abusan de la droga lo hacen de forma intermitente (Jansen, 1999). Además, se observa una

Adolescencia

autolimitación de su consumo en el tiempo: muchos deciden abandonarlo ya sea por cansancio, desinterés, tolerancia o debido a algún efecto adverso, un patrón que remeda el del consumo del cannabis (Corral y Alonso y Sopolana-Rodríguez, 1998).

Los individuos que abusan del consumo de una sustancia representan un grupo altamente heterogéneo, donde los patrones de dependencia son diversos. Las diferencias individuales en el temperamento, en el desarrollo social, comorbilidad de desórdenes psiquiátricos, en los factores protectores y genéticos contribuyen al desarrollo de la adicción. Asimismo, se sugiere que el abuso en el consumo de una droga está asociado con factores ambientales y sociales, mientras que el paso del abuso a la adicción está más relacionado con factores neurobiológicos (Glantz y Pickens, 1992). El temperamento y los rasgos en la personalidad podrían contribuir a la vulnerabilidad al consumo de las drogas (Glantz y cols., 1999), e incluyen la desinhibición (activación conductual) (Windle y Windle, 1993), indiferencia, búsqueda de novedades y sensaciones (Wills y cols., 1994), y un temperamento difícil (desorden conductual) (Glantz y cols., 1999). Con respecto a la comorbilidad de los desórdenes psiquiátricos, algunas fuertes asociaciones se encuentran en los trastornos afectivos, desórdenes de ansiedad, desórdenes de personalidad antisocial, y desórdenes conductuales (Glantz y Hartel, 1999). Por otra parte, los factores de desarrollo son importantes componentes de vulnerabilidad, donde la adolescencia juega un papel crítico en el abuso de sustancias, ya que la exposición a las drogas durante esta fase de desarrollo incrementa la probabilidad de dependencia durante el periodo adulto. Asimismo, los factores genéticos podrían contribuir al desarrollo de la adicción, incluso podrían observarse diferencias en el metabolismo que podrían modificar la sensibilidad a las drogas (Koob y LeMoal., 2005). Además, los factores ambientales y los factores genéticos podrían contribuir no solo en la vulnerabilidad, sino también como un mecanismo de protección contra el consumo abusivo de drogas (Dishion y McMahon, 1998).

Por último, indicar que mediante estudios animales se ha demostrado que los efectos reforzantes de la MDMA podrían ser modificados por la interacción con otras drogas. En este sentido, se ha observado que la administración conjunta del delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) y MDMA produce interacciones complejas en el CPL. Así en

los ratones, una dosis sub-umbral de THC (0.3 mg/kg) induce CPL cuando es combinada con una dosis no reforzante de MDMA (3 mg/kg). Por el contrario, cuando la MDMA se administra a una dosis efectiva (10 mg/kg), se observa un decremento de la preferencia de lugar (Robledo y cols., 2007). Estos resultados indican que una dosis baja de TCH podría modificar los efectos conductuales de la MDMA, y sugieren que el sistema cannabinoide está implicado, al menos en parte, en los efectos reforzantes de la MDMA. Asimismo, se ha demostrado que el rimonabant, un antagonista cannabinoide CB1, bloquea el CPL inducido por la administración intra-cerebro ventricular de 10 ng/kg de MDMA en las ratas (Braidá y cols., 2005). Para estudiar si el THC tendría algún efecto similar sobre las propiedades reforzantes de la MDMA, Robledo y cols., (2007) emplearon el modelo de la AA en ratones tratados previamente con una dosis baja de THC (0.3 mg/kg). Bajo estas condiciones, los ratones se auto-administran MDMA a dosis que no producen efectos reforzantes (0.06 mg/kg/infusión). Mientras que la adquisición de una dosis efectiva de MDMA (0.125 mg/kg/infusión) no se ve afectada. Por lo tanto, una dosis sub-efectiva de THC es capaz de disminuir el umbral reforzante de la MDMA. Estos resultados concuerdan con datos obtenidos en el CPL con dosis bajas de MDMA, pero no con los encontrados con una dosis alta de esta droga. Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos observado que la exposición repetida a la MDMA (5, 10 y 20 mg/kg) durante la adolescencia, incrementa la sensibilidad a la reinstauración de la preferencia de lugar inducida por la morfina (40 mg/kg) durante la vida adulta. En contraste, cuando la MDMA se administra de forma repetida en combinación con cocaína (25 mg/kg) durante el periodo adolescente, observamos una disminución de la sensibilidad a la reinstauración del CPL inducido por la morfina durante la edad adulta (Daza-Losada y cols., 2008a). Por lo tanto, podríamos sugerir, que la MDMA sola, o en combinación con otras sustancias psicoactivas, podría modificar los efectos reforzantes a la misma o a otras drogas. En consecuencia, la vulnerabilidad al abuso, a la adicción y a la recaída al consumo del éxtasis (u otros compuestos psicoactivos) podría verse comprometida en sujetos que muestren pautas de policonsumo.

Adolescencia

Tabla 1. Criterios para la dependencia de sustancias (DSM-IV TR, 1994). Un patrón desadaptativo de consumo de la sustancia que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por tres (o más) de los ítems siguientes en algún momento de un período continuado de 12 meses:

Tolerancia	Una necesidad de cantidades marcadamente crecientes de la sustancia para conseguir la intoxicación o el efecto deseado. El efecto de las mismas cantidades de sustancia disminuye claramente con su consumo continuado.
Abstinencia	El síndrome de abstinencia característico para la sustancia (ver criterios A y B de los criterios diagnósticos para la abstinencia de sustancias específicas). Se toma la misma sustancia (o una muy parecida) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

La sustancia es tomada con frecuencia en cantidades mayores o durante un período más largo de lo que inicialmente se pretendía.

Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de la sustancia.

Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia (p. ej., visitar a varios médicos o desplazarse largas distancias), en el consumo de la sustancia (p. ej., fumar un pitillo tras otro), o en la recuperación de los efectos de la sustancia.

Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de la sustancia.

Se continúa tomando la sustancia a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que parecen causados o exacerbados por el consumo de la sustancia (p. ej., consumo de la cocaína a pesar de saber que provoca depresión, o continuada ingesta de alcohol a pesar de que empeora una úlcera).

Especificar si:

Con dependencia fisiológica: signos de tolerancia o abstinencia (p.ej., si se cumplen cualquiera de los puntos 1 o 2).

Sin dependencia fisiológica: no hay signos de tolerancia o abstinencia (p.ej., si no se cumplen los puntos 1 y 2).

Criterios para la abstinencia de sustancias

Presencia de un síndrome específico de una sustancia debido al cese o reducción de su consumo prolongado y en grandes cantidades.

El síndrome específico de la sustancia causa un malestar clínicamente significativo o un deterioro de la actividad laboral y social o en otras áreas importantes de la actividad del individuo.

Los síntomas no se deben a una enfermedad médica y no se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental.

Criterios para el abuso de sustancias

Un patrón desadaptativo de consumo de sustancias que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por uno (o más) de los ítems siguientes durante un período de 12 meses:

Consumo recurrente de sustancias, que da lugar al incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o en casa (p. ej., ausencias repetidas o rendimiento pobre relacionados con el consumo de sustancias; ausencias, suspensiones o expulsiones de la escuela relacionadas con la sustancia; descuido de los niños o de las obligaciones de la casa).

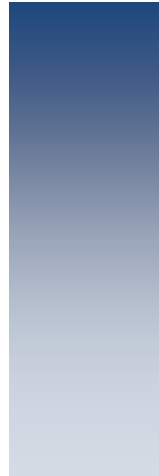
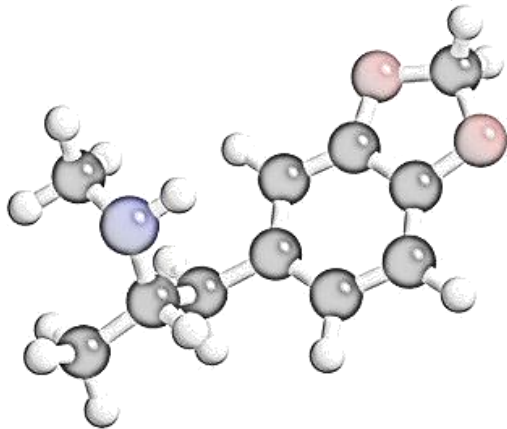
Consumo recurrente de la sustancia en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso (p. ej., conducir un automóvil o accionar una máquina bajo los efectos de la sustancia).

Problemas legales repetidos relacionados con la sustancia (p. ej., arrestos por comportamiento escandaloso debido a la sustancia).

Consumo continuado de la sustancia, a pesar de tener problemas sociales continuos o recurrentes o problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos de la sustancia (p. ej., discusiones con la esposa acerca de las consecuencias de la intoxicación, o violencia física).

Los síntomas no han cumplido nunca los criterios para la dependencia de sustancias de esta clase de sustancia.

FARMACOLOGÍA DE LA MDMA



4. FARMACOLOGÍA DE LA MDMA

Los efectos psicoestimulantes de la MDMA aparecen a los 20-60 minutos de su ingestión, observándose sus efectos máximos después de 60-90 minutos, perdurando al menos de 3 a 5 horas (Green y cols., 2003). La dosis típica de MDMA en un consumidor promedio oscila entre los 75 y 120 mg. (Solowij y cols., 1992; Mas y cols., 1999). El estudio específico de las propiedades farmacocinéticas de la MDMA en el ser humano es muy escaso, dadas las características ilícitas de su consumo y utilización (Cho y cols., 1990). Por tanto, la mayor parte de los datos existentes hasta mediados de los años noventa procedían de estudios sobre la farmacocinética de las feniletilaminas y de algunos estudios sobre su metabolismo en roedores (Lim y Foltz, 1988), aunque posteriormente se realizaron algunos estudios farmacocinéticos específicos en humanos (Tucker y cols., 1994; Helmlin y cols., 1996; Camí y cols., 2000, de la Torre y cols., 2000a; 2000b; 2004; 2005; Farré y cols., 2004). La vía de administración más frecuente de la MDMA es la oral, y los consumidores de esta sustancia suelen hacerlo con el estómago vacío, con objeto de lograr una absorción más rápida. A pesar de que no existen estudios específicos rigurosos, el proceso de absorción debe ser muy rápido (Quinn y cols., 1997), ya que entre los 20-60 minutos se observan los primeros efectos de la sustancia. Si extrapolamos este parámetro al de otras anfetaminas, la absorción podría ser completa a las 3 o 6 h después de la ingesta. Helmlin y cols., (1996) obtuvieron, en un estudio con 2 sujetos, tras la administración oral de éxtasis, una $T_{máx}$ de 2 h para la MDMA y 6,3 h para el metabolito MDA. Su distribución orgánica es amplia y atraviesa la barrera hematoencefálica, con el consiguiente riesgo de acumularse en el sistema nervioso central. Asimismo, se distribuye ampliamente, aunque en menor medida, en el riñón y en los pulmones (López-Muñoz, 2004).

Se desconocen los índices de unión a proteínas plasmáticas, aunque las anfetaminas como grupo, poseen unas tasas de unión muy bajas (15% el metilfenidato, 16% la anfetamina y 34% la fenfluramina). Por su parte, el metabolismo de las anfetaminas es hepático, y se elimina una alta proporción sin metabolizar por la orina. De hecho, en un caso estudiado,

Farmacología

correspondiente a la administración a un solo sujeto de 50 mg de MDMA, un 7% se metabolizó a MDA y un 65% se excretó sin metabolizar (Cabrera y Torrecilla, 1998).

El éxtasis puede ser sometido a dos mecanismos metabólicos (ver figura 7): (1) la N-demetilación de la MDMA conduce a la formación de MDA, mientras que (2) la O-demetilación da lugar a la obtención de 3,4-dihidroxiimetanfetamina (HHA). La MDA es una sustancia que ha sido identificada en el plasma y en el cerebro de la rata tras la administración de la MDMA (Chu y cols., 1996). Igualmente, sus concentraciones plasmáticas han sido determinadas en el mono Rhesus tras la administración repetida de dosis neurotóxicas de la MDMA (Bowyer y cols., 2003). Asimismo, ha sido identificada en el plasma y en la orina de voluntarios que han consumido MDMA (de la Torre y cols., 2000a; 2000b; Segura y cols., 2001).

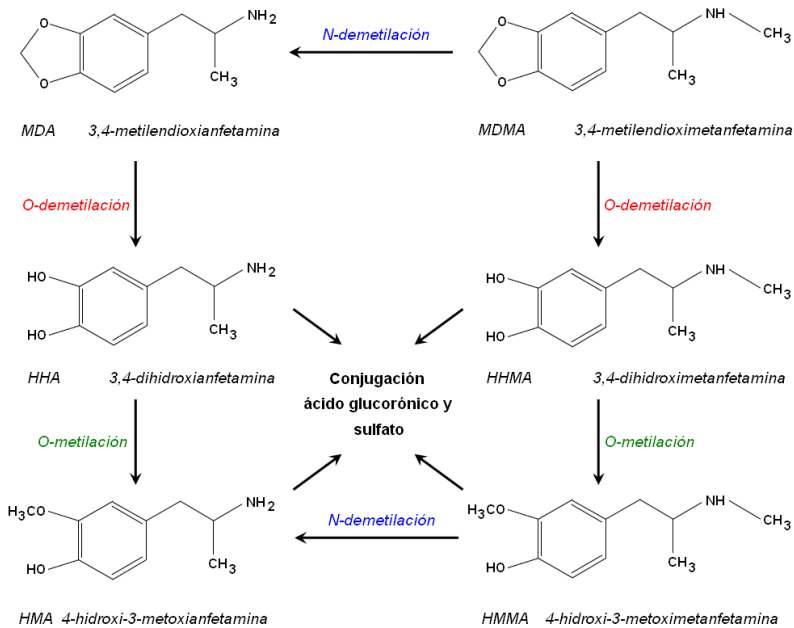


Figura 7. Metabolismo de la MDMA (modificado de de la Torre y cols., 2000a). El metabolismo de la MDMA implica tres reacciones químicas: N-demetilación, O-demetilación y O-metilación.

La O-demetilación de MDA produce 3,4-dihidroxianfetamina (HHA). Tanto la HHMA como la HHA son O-metiladas por la catecol-O-metiltransferasa (COMT), obteniendo 4-hidroxi-3-metoximetanfetamina (HMMA) y 4-hidroxi-3-metoxianfetamina (HMA) respectivamente. Estos 4 metabolitos, particularmente la HMMA y la HMA, son excretados por vía urinaria como conjugados glucoronidos o sulfatos (de la Torre y cols., 2000a; de la Torre y Farré, 2004).

La O-demetilación es catalizada por el citocromo P450 2D6 (CYP2D6), mientras que la O-metilación es modulada por la COMT (de la Torre y cols., 2004). La CYP2D6 y la COMT son polimórficas en los humanos, y la diferencia en la expresión de las isoformas del CYP2D6 conducen a variaciones interindividuales en el metabolismo de medicaciones serotoninérgicas (como los inhibidores de la recaptación de 5-HT) (Charlier y cols., 2003). Las ratas carecen del CYP2D6, aunque expresan un citocromo homólogo funcionalmente distinto: el citocromo P450 2D1 (Malpass y cols., 1999; Maurer y cols., 2000). Por otra parte, la N-demetilación es una vía menor en los humanos para la biotransformación de la MDMA, mientras que en las ratas, representa la vía más importante, y se lleva a cabo principalmente en el hígado, y en menor grado en el cerebro (Hiramatsu y cols., 1990; Lin y cols., 1992; de la Torre y Farré, 2004).

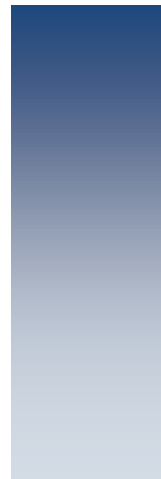
Por otra parte, la MDMA presenta una farmacocinética no lineal (de la Torre y cols., 2000a). Las concentraciones plasmáticas del éxtasis no son proporcionales a la dosis administrada, lo cual, produce una tendencia a la acumulación de MDMA a dosis altas, lo que puede suponer un notable riesgo de intoxicaciones agudas y explicar ciertos casos de muerte por consumo de éxtasis (de la Torre y cols., 1999). Esto se debe a que la MDMA o alguno de sus metabolitos actúan como inhibidores enzimáticos de los citocromos hepáticos (entre ellos el CYP 2D6). Por lo tanto, se inhibe de forma parcial la biotransformación de MDMA a HHMA, como se demuestra al administrar dos dosis consecutivas de MDMA. La primera dosis impide la formación de HHMA tras la segunda, lo que aumenta las concentraciones de MDMA de forma desproporcionada, entre un 20-40%. Es posible que otros inhibidores del CYP2D6 (fluoxetina por ejemplo) modifiquen el metabolismo de la

Farmacología

MDMA (Tucker y cols., 1994; Lin y cols., 1996, 1997a; Wu y cols., 1997; Kalant, 2001).

El porcentaje de eliminación urinaria de la MDMA depende del pH de la orina, de forma que su acidificación incrementa notoriamente la eliminación, de hecho, esta estrategia suele usarse en los casos de intoxicación (López-Muñoz, 2004).

Efectos de la MDMA sobre diferentes sistemas de neurotransmisión



5. EFECTOS DE LA MDMA SOBRE DIFERENTES SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN

Los derivados anfetamínicos aumentan la liberación de los neurotransmisores monoaminérgicos. El perfil farmacológico de la MDMA podría ser resultado de la liberación simultánea de 5-HT, DA, noradrenalina (NA), y quizás también de acetilcolina (ACh), en múltiples regiones cerebrales. La MDMA promueve la liberación y la recaptación de DA mediante mecanismos dependientes de calcio (Ca^{2+}) y del DAT, así como también mediante la participación del sistema serotoninérgico, a través de los receptores 5-HT₂. Habitualmente se menciona al SERT como el principal mecanismo implicado en la liberación de 5-HT inducida por la MDMA. No obstante, esta droga también suprime el metabolismo de este neurotransmisor, lo que en consecuencia produce una acumulación intraneuronal de 5-HT. La MDMA también activa los receptores histaminérgicos H₁, lo que produce un incremento de la concentración extracelular de ACh en varias estructuras como la CPF y el estriado. Asimismo, la liberación de este neurotransmisor también podría ser modulada mediante mecanismos dopaminérgicos (receptores D₁) y serotoninérgicos (receptores 5-HT₄) (Nair y Gudelsky 2006a, 2006b; Gudelsky y Yamamoto, 2008). Muchos psicoestimulantes como la anfetamina, la cocaína, la nicotina, y el metilfenidato, aumentan la concentración de ACh en algunas estructuras cerebrales, como por ejemplo la CPF. Este efecto contribuye al proceso del aprendizaje de las claves ambientales asociadas uso de las drogas, el cual, acompaña a la drogodependencia (Gudelsky y Panamito, 2008).

Los efectos de la MDMA sobre la liberación de DA y 5-HT ha sido bien documentada, y posiblemente la liberación de DA podría estar implicada en las propiedades euforizantes y recompensantes de esta droga, mientras que la liberación de 5-HT quizás regula algunos de los efectos subjetivos de la MDMA. Sin embargo, no se puede excluir la implicación de otros sistemas de neurotransmisión en la psicofarmacología de esta droga de abuso, aunque para efectos de este trabajo, sólo se comentarán algunos de los efectos de la MDMA sobre la 5-HT y la DA.

5.1. Serotonina

La MDMA induce la liberación de 5-HT en las terminales nerviosas serotoninérgicas presinápticas. *In vitro*, se ha demostrado que la MDMA induce la liberación de este neurotransmisor mediante mecanismos independientes del Ca^{2+} (Wichems y cols., 1995), y funciona como un sustrato del SERT (Verrico y cols., 2007). La MDMA que se localiza en el medio extracelular es secuestrada, y posteriormente transportada hacia el interior de la terminal presináptica por el SERT, donde actúa sobre las vesículas presinápticas serotoninérgicas y promueve la liberación del neurotransmisor hacia el medio extracelular. La interacción entre la MDMA y el SERT altera la actividad del transportador, lo que conduce a que el transportador actúe de forma inversa, favoreciendo con ello la liberación de 5-HT (Green y cols., 2003, Lyles y Cadet, 2003; Cole y Sumnall, 2003a; Gudelsky y Yamamoto, 2008).

La acumulación intracelular de MDMA puede ser bloqueada por la administración de fluoxetina, un inhibidor de la recaptación de 5-HT, lo que corrobora la participación del SERT en la liberación de 5-HT inducida esta droga (Wichems y cols., 1995; Mechan y cols., 2002b). No obstante, se ha observado que la MDMA es capaz de interrumpir el almacenamiento presináptico de 5-HT mediante el bloqueo del transportador vesicular (VMAT), encargado del acopio de este neurotransmisor, y promueve el vaciamiento de las reservas vesiculares de 5-HT de la terminal nerviosa presináptica, lo que en consecuencia conduce a un aumento de la concentración extracelular del neurotransmisor (Mlinar y Corradetti., 2003). Por lo tanto, se ha propuesto que el SERT sólo contribuiría con la liberación del neurotransmisor, mientras que el vaciamiento de las vesículas presinápticas y el bloqueo de la VMAT es el proceso esencial que determina el aumento de los niveles de 5-HT tras la administración de la MDMA (Mlinar y Corradetti., 2003; Giannaccini y cols., 2007).

La MDMA también interfiere con el metabolismo de la 5-HT (Leonardi y Azmitia, 1994). De esta forma, se produce un incremento en la acumulación intraneuronal de 5-HT, lo que

podría contribuir con la liberación de 5-HT hacia la hendidura sináptica (Gudelsky y Yamamoto, 2008). La administración de precursores de 5-HT podría favorecer los efectos de la MDMA sobre la liberación de éste neurotransmisor. La inyección de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) produce un aumento modesto de la concentración extracelular de 5-HT (Gartside y cols., 1992), y la magnitud de este efecto se favorece mediante la administración conjunta de un inhibidor de la descarboxilasa o de un inhibidor del SERT (Perry y Fuller, 1993; Gudelsky y Nash, 1996). Aunque la liberación de 5-HT inducida por la 5-HTP implica procesos dependientes de los impulsos (Gartside y cols., 1997), el aumento de la síntesis de 5-HT inducido por este precursor, también podría facilitar la liberación de 5-HT a través del SERT. Gudelsky y Nash (1996) demostraron que la coadministración de carbidopa y 5-HTP produce un incremento significativo en la concentración extracelular de 5-HT, 10 veces mayor que la producida por cualquiera de estos compuestos de forma individual. La contribución de la 5-HT recién sintetizada a la liberación del neurotransmisor inducida por la MDMA, también fue demostrada por Brodtkin y cols., (1993), quienes han descrito que la inhibición de la síntesis de 5-HT atenúa el aumento de los niveles extracelulares de éste neurotransmisor.

La MDMA y la *p*-metoxianfetamina (PMA) facilitan la liberación y previenen la recaptación de 5-HT, aunque esta última también inhibe la monoaminoxidasa A (MAO A). La MAO A es particularmente importante en el catabolismo de monoaminas, y es vital para la inactivación de los neurotransmisores monoaminérgicos. En un estudio reciente, se comparó la capacidad de ambos compuestos para incrementar la concentración extracelular de 5-HT en la sustancia negra de ratas con MAO A funcional, o cuando la actividad de esta enzima fue inhibida mediante la administración de clorgilina. Las muestras fueron obtenidas mediante microdiálisis y las concentraciones extracelulares de 5-HT y del 5-HIAA (metabolito principal de la 5-HT) fueron determinadas mediante HPLC (cromatografía líquida de alta precisión). La MDMA y la PMA incrementaron los niveles de 5HT, pero sólo la MDMA fue capaz de potenciar este efecto cuando se administró en combinación con la clorgilina. Por lo tanto, se ha sugerido que la inhibición de la actividad

de la MAO A podría potenciar la liberación de 5-HT inducida por la MDMA, pero no la producida por la PMA (Hewton y cols., 2007).

5.2. Dopamina

En preparados sinaptosomales, la liberación de DA inducida por la MDMA puede ser modulada parcialmente por mecanismos dependientes de Ca^{2+} , posiblemente a través de exocitosis, así como también por el DAT (Crespi y cols., 1997; Hansen y cols., 2002). La liberación aguda de DA podría ser consecuencia de una interacción selectiva entre el DAT y la MDMA, la cual, funciona como un sustrato para el transportador monoaminérgico (Crespi y cols., 1997; Iravani y cols., 2000; Verrico y cols., 2007). De acuerdo con lo anterior, se ha observado que el incremento de la concentración extracelular de DA producido por la MDMA, puede ser bloqueado mediante inhibidores de la recaptación de DA como el mazindol y el GBR 12909 (Koch y Galloway, 1997; Shankaran y cols., 1999b). En contraste, algunos grupos de investigación sugieren que el DAT quizás no esté implicado en la liberación de DA inducida por esta droga, ya que tanto en ratas como en ratones, se ha observado que el GBR 12909 no suprime la liberación del neurotransmisor inducida por la MDMA (O'Shea y cols., 2001; Mehan y cols., 2002b; Camarero y cols., 2002). En algunos casos incluso, este inhibidor de la recaptación puede favorecer los efectos de la MDMA sobre la liberación de DA (O'Shea y cols., 2001; Camarero y cols., 2002). Asimismo, debido a la liposolubilidad de la MDMA, se ha sugerido que esta droga podría penetrar la terminal nerviosa dopaminérgica mediante difusión pasiva (O'Shea y cols., 2001; Mehan y cols., 2002b; Camarero y cols., 2002), tal y como ocurren en los sinaptosomas (Zaczek y cols., 1990).

La MDMA disminuye el transporte vesicular de DA en preparados del sinaptosomales del estriado (Hansen y cols., 2002). No obstante, en fechas recientes se ha observado que la MDMA funciona como un sustrato para la VMAT, con lo cual, esta droga impediría el almacenamiento del neurotransmisor que se acumula en el citoplasma, favoreciendo como resultado al aumento de la concentración extracelular de DA (Partilla y cols., 2006).

Es posible que la liberación de DA inducida por la MDMA sea regulada por mecanismos serotoninérgicos. El aumento de los niveles de 5-HT en el estriado, producido como consecuencia de la administración de la MDMA, podría afectar la concentración extracelular de DA. Con el empleo de la microdiálisis, se ha observado que la administración de la MDMA incrementa el contenido extracelular de DA en el estriado. Sin embargo, este efecto es considerablemente menor en presencia de fluoxetina. Por lo tanto, se ha sugerido que la liberación de 5-HT inducida por la MDMA contribuye, al menos en parte, a los efectos de esta droga sobre la liberación de DA *in vivo* (Koch y Galloway, 1997). Además, el aumento de la transmisión serotoninérgica en el estriado, no tiene efecto sobre la liberación de DA en condiciones basales. Sin embargo, la movilización de la 5-HT endógena en esta estructura cerebral, sólo favorece el flujo de DA cuando la transmisión dopaminérgica negro-estriada es activada (Lucas y cols., 2000a; 2000b).

Por otra parte, se ha demostrado que la infusión en el estriado de MDL 100907 o de amperozida (antagonistas del receptor 5-HT₂), inhibe la liberación de DA inducida por la administración sistémica de MDMA. En consecuencia, se ha sugerido que la activación de los receptores 5-HT₂ localizados en el estriado favorece la liberación de DA inducida por la MDMA (Schmidt y cols., 1994). Además, la activación de estos receptores disminuye la concentración del GABA en la sustancia negra (Yamamoto y cols., 1995). De acuerdo con lo anterior, se ha observado que tras la administración de la MDMA se produce una estimulación de los receptores 5-HT₂ en el estriado y la sustancia negra, la cual, contribuye desinhibiendo la liberación de DA en el estriado a través de una atenuación del control del GABA (Yamamoto y cols., 1995). En contraste, el aumento de los niveles de GABA en el ATV, y la subsecuente activación de los receptores 5-HT_{2B/2C}, limita al parecer la liberación de DA en el NAcc (Bankson y Yamamoto, 2004). Por lo tanto, el decremento a largo plazo de la transmisión serotoninérgica originado como consecuencia de un tratamiento neurotóxico de MDMA, podría causar un descenso de la actividad de los receptores 5-HT_{2C}, conduciendo a una pérdida del control inhibitorio GABAérgico sobre la transmisión dopaminérgica mesolímbica, y de forma importante a un incremento en la vulnerabilidad a los efectos recompensantes de esta droga, u otros psicoestimulantes

Sistemas de Neurotransmisión

(Bankson y Yamamoto, 2004). Cabe destacar que el aumento de la temperatura ambiente favorece la liberación de DA en el NAcc, pero no en el estriado (O'Shea y cols., 2006). En consecuencia, los efectos de la MDMA sobre la liberación de DA (así como también de 5-HT) en el NAcc, sugiere que las propiedades reforzantes de esta droga podrían ser potenciadas a una elevada temperatura ambiente, en consecuencia, la magnitud de los efectos psicoactivos de la MDMA podría ser mayor en los individuos que consumen esta droga en lugares de elevada temperatura y con muchedumbre (O'Shea y cols., 2006).

A pesar de que el hipocampo muestra una pobre inervación dopaminérgica, la administración de la MDMA induce un aumento considerable de los niveles extracelulares de DA en la región ventral (Shankaran y Gudelsky, 1998). El incremento de la liberación de DA en el hipocampo, pero no en el estriado, puede ser bloqueado mediante la administración de desipramina (inhibidor de la recaptación de NA), así como también, mediante una lesión de la neuronas noradrenérgicas inducida por la inyección de DSP-4 (N-(2-cloretíl)-N-etil-2-bromobencilamina). Por consiguiente, se ha propuesto que las terminales nerviosas noradrenérgicas son la fuente de la DA extracelular que se libera en el hipocampo tras la administración de la MDMA (Shankaran y Gudelsky, 1998).

Un mecanismo adicional mediante el cual la MDMA podría aumentar los niveles extracelulares de DA en el hipocampo, es a través del incremento de tirosina (Breier y cols., 2006). No obstante, este efecto quizás no sea consecuencia de la activación de la tirosina hidroxilasa, sino de la hidroxilación no enzimática de la tirosina (para obtener DOPA) llevada a cabo por los radicales hidroxilo que se forman tras la administración de la MDMA (Colado y cols., 1997; Shankaran y cols., 1999a, 1999b). Por lo tanto, la L-DOPA que se produce mediante este mecanismo podría ser convertida a DA en las neuronas serotoninérgicas. Esta formación aberrante de DA dentro, presumiblemente, de las neuronas serotoninérgicas, podría no solo contribuir a la liberación de DA inducida por la MDMA en el hipocampo, sino también, con el daño oxidativo de las neuronas serotoninérgicas (Breier y cols., 2006).

5.3. MDMA y neurotoxicidad

Generalmente, los estudios enfocados a discernir los efectos neurotóxicos de la MDMA en especies animales se basan en investigaciones realizadas en ratas. Como veremos más adelante, la MDMA muestra diferentes patrones de neurotoxicidad dependiendo de la especie animal empleada. Por ejemplo, la MDMA induce efectos neurotóxicos a largo plazo especialmente serotoninérgicos en las ratas, las cobayas (*guinea pigs*), y los primates. Sin embargo en los ratones, la mayor parte de los estudios sugieren que esta droga afecta principalmente al sistema dopaminérgico. Por lo tanto, para describir los efectos neurotóxicos de la MDMA en animales, se ha dividido este tema en dos apartados: el primero, abordará algunos de los principales resultados obtenidos en el estudio de la neurotoxicidad serotoninérgica en ratas y primates. Mientras que el segundo apartado, se describen algunos antecedentes relacionados con los efectos neurotóxicos dopaminérgicos obtenidos principalmente en ratas y ratones.

5.3.1 Neurotoxicidad serotoninérgica

5.3.1.1. Ratas

La mayor parte de los estudios enfocados a estudiar los efectos tóxicos y degenerativos de la MDMA, sobre las terminales nerviosas serotoninérgicas, se basan en experimentos realizados en ratas. Diversas estructuras cerebrales se ven afectadas tras la administración de esta droga, por lo general la CPF, el hipocampo y el estriado. La administración de una dosis única de 10 o 15 mg/kg de MDMA, es capaz de reducir, una semana después, hasta un 40% las concentraciones de 5-HT y de 5-HIAA en la corteza y el hipocampo de las ratas Dark Agouti (Colado y Green, 1995; O'Shea y cols., 1998, Colado y cols., 1998; 1999a; Sanchez y cols., 2001). Asimismo, los sitios de unión entre la [³H] paroxetina y las terminales nerviosas serotoninérgicas presinápticas disminuyen aproximadamente un 30% (Colado y Green, 1995; O'Shea y cols., 1998, Colado y cols., 1998; 1999a; Sanchez y cols., 2001). La determinación de los efectos neurotóxicos serotoninérgicos inducidos por la

Sistemas de Neurotransmisión

MDMA, regularmente se efectúan a nivel central, pero Kovács y cols., (2007) también demostraron que la MDMA induce efectos significativos sobre los marcadores serotoninérgicos en la médula espinal, caracterizados por una disminución de la triptófano hidroxilasa y de la densidad del SERT.

Schmidt (1987) evaluó el curso temporal del descenso cortical de 5-HT tras la administración de una dosis de 10 mg/kg de MDMA, y observó 2 fases de respuesta: en primer lugar, la concentración de 5-HT disminuye considerablemente durante las primeras 3 horas posteriores al tratamiento, llegando a alcanzar valores del 16% con respecto a los niveles control entre 3 y 6 horas tras administración de la droga. No obstante, de 6 a 24 horas después, los niveles de 5-HT retornan a los valores observados antes del tratamiento. La segunda fase se manifiesta una semana después, y se caracteriza por un descenso gradual de la concentración de 5-HT en un periodo comprendido entre 1 y 7 días, donde los valores del neurotransmisor disminuyen hasta el 74% de los valores control.

A nivel neuroanatómico, la MDMA causa una degeneración selectiva de los axones serotoninérgicos de diámetro fino, y promueve la formación de varicosidades y pequeños segmentos intervaricosos (fibras en forma de “abalorio”) que se originan principalmente en el núcleo del rafe medial, y alcanzan el cerebro anterior (O’Hearn y cols., 1988; Wilson, 1989; Molliver y cols., 1990). Los terminales axónicos serotoninérgicos se deforman y se fragmentan entre uno y tres días después de la administración de múltiples dosis de MDMA (White y cols., 1996). Sin embargo, los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe en el tallo cerebral permanecen intactos (Hatzidimitriou y cols., 1999). Estos efectos pueden persistir semanas o incluso años tras la administración esta droga, y podrían depender de diversos factores como el área cerebral afectada, de las especies estudiadas, y de las dosis de MDMA empleadas (Ricaurte y McCann, 1992; Scanzello y cols., 1993; Fischer y cols., 1995; Hatzidimitriou y cols., 1999).

Los mecanismos neurotóxicos de la MDMA podrían implicar la formación de radicales libres y fenómenos de estrés oxidativo. Es posible que tras la administración de un *binge* de

MDMA, se produzcan daños a nivel central como consecuencia del agotamiento de los procesos de captación de radicales libres endógenos (Colado y cols., 2001; Davidson y cols., 2001; Shankaran y cols., 2001; Hanson y cols., 2004). No obstante, si el tiempo que transcurre entre las administraciones de las drogas es adecuado, es posible que los procesos de captación de radicales libres tengan oportunidad de recuperarse, con lo cual, los mecanismos de protección se restablecen y se preparan para poder reaccionar ante cualquier daño posterior (O'Shea y cols., 1998). Las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas tienen la capacidad de inactivar compuestos altamente inestables, como los radicales libres, pero en condiciones particulares como el régimen de MDMA empleado, la capacidad endógena del tejido comprometido para inactivar los radicales libres, o la respuesta hipertérmica, podrían vulnerar la resistencia de estas neuronas (Sanchez y cols., 2001, Saadat y cols., 2004). Además, la administración repetida de dosis bajas de MDMA, produce una respuesta hipertérmica mayor que la observada con una sola dosis alta de esta droga. La administración de 3 inyecciones de 2 mg/kg de MDMA en un periodo de 6 horas, produce un notable incremento de la respuesta hipertérmica tras la segunda y la tercera inyección. Los efectos observados con este tratamiento fueron más severos que los observados con una sola administración de 5 mg/kg de MDMA, una dosis que tiene un efecto marginal sobre la temperatura corporal (Green y cols., 2004a; 2004b). Debido a la relación entre la respuesta hipertérmica y los efectos neurotóxicos inducidos por la MDMA, es posible que la potenciación de la hipertermia producida por la administración repetida de esta droga, origine efectos neurotóxicos más severos que los que se producen tras la inyección única de una dosis alta de MDMA.

La MDMA aumenta la conversión del ácido salicílico al ácido 2,3-dihidroxi benzoico (2,3-DHBA), una reacción que sólo ocurre en presencia de una alta concentración de radicales libres (Shankaran y cols., 1999a; 1999b; Colado y cols., 1997; 1999a; 1999b; 2001; Camarero y cols., 2002). La formación de 2,3-DHBA es un indicador confiable de la formación de radicales libres, ya que el 2,5-DHBA también puede ser obtenido mediante actividad enzimática (Halliwell y cols., 1991). De esta forma, se ha observado que tras la administración de la MDMA (15 mg/kg) en las ratas Dark Agouti, aumentan los niveles del

Sistemas de Neurotransmisión

2,3-DHBA, pero no del 2,5-DHBA. Una semana después de la administración de esta droga, las concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA disminuyen alrededor del 50% en la corteza, el hipocampo, y el estriado. Igualmente, no se observan cambios en las concentraciones de DA o del DOPAC (principal metabolito de la DA) en el estriado de estos animales (Colado y cols., 1997). Por otro lado, la fenfluramina también disminuye los marcadores serotoninérgicos a largo plazo, pero no incrementa la formación de 2,3-DHBA. De acuerdo con lo anterior, cuando las ratas son tratadas una semana antes con fenfluramina, la MDMA no induce un aumento de los niveles del 2,3-DHB en el hipocampo, lo que indica que el incremento en la formación de radicales libres es resultado de la captación de la MDMA por las neuronas serotoninérgicas, y que la formación de radicales libres se lleva a cabo en las terminales presinápticas de estas neuronas (Colado y cols., 1997). Además, la administración del α -fenil-N-terbutil nitrona (PBN), un captador de radicales libres, previene la producción de 2,3-DHB inducida tras la administración de la MDMA, y atenúa el daño a largo plazo de las neuronas serotoninérgicas hipocampales (Colado y cols., 1997). En conjunto, estos datos indican que el principal mecanismo mediante el cual, la MDMA afecta las neuronas serotoninérgicas en el cerebro de la rata, se basa en un incremento de la formación de radicales libres, probablemente como consecuencia de la degradación de los metabolitos catecol y quinona derivados del metabolismo de la MDMA (Colado y cols., 1997).

La administración de clometiazol previene la respuesta hipertérmica aguda y la producción de 2,3-DHB inducida por la MDMA (Colado y cols., 1999b). Cuando la temperatura corporal de las ratas tratadas con MDMA en combinación con clometiazol se mantiene elevada, a la misma temperatura que la observada en las ratas tratadas sólo con MDMA mediante una manta térmica, no se inhibe la producción de 2,3-DHB, pero siguen manifestándose los efectos protectores del clometiazol. Por lo tanto, se ha sugerido que la formación de radicales libres es inhibida cuando se previene la respuesta hipertérmica durante la fase aguda, y que el clometiazol no es un captador de radicales libres (Colado y cols., 1999b).

Shankaran y cols., (1999a) observaron que la administración de fluoxetina reduce la formación de 2,3-DHBA, y atenúa el decremento de los niveles de 5-HT producidos por la MDMA. Por lo tanto, estos autores apoyan la idea de que la MDMA promueve la formación de radicales hidroxilo, y que los efectos a largo plazo sobre la concentración de 5-HT podrían depender, al menos en parte, de la activación del SERT (Shankaran y cols., 1999a). El efecto neuroprotector de la fluoxetina podría deberse a la presencia de algún derivado o de su metabolito activo norfluoxetina en el cerebro, ya que la fluoxetina y la norfluoxetina son capaces de bloquear el SERT, lo que podría impedir la entrada de la MDMA (o de algún metabolito neurotóxico) al interior de la terminal nerviosa presináptica (Sanchez y cols., 2001).

La prevención de la respuesta hipertérmica atenúa los efectos neurotóxicos serotoninérgicos inducidos por la MDMA. Diversos compuestos como los antagonistas de la NMDA, el clometiazol, y la pentobarbitona, previenen los efectos neurotóxicos de la MDMA mediante mecanismos que implican la inducción de una respuesta hipotérmica (Colado y cols., 1998; 1999b, 1999c). Sin embargo, el (S)-(-)-AR-A008055, un compuesto que permite la apertura de los canales cloro de los receptores GABA_A, posee una farmacología similar a la del clometiazol y, al igual que este, es capaz de prevenir los efectos neurotóxicos de la MDMA, independientemente de una respuesta sobre la temperatura corporal de los animales (Colado y cols., 2001). Por lo tanto, ambos compuestos serían capaces de interactuar con el receptor GABA_A, inhibiendo como consecuencia la isquemia inducida por la liberación de glutamato, quizás mediante la apertura de los canales de cloro en ausencia de GABA endógeno (Nelson y cols., 2000).

Esteban y cols., (2001) observaron que la administración local de MDMA induce la liberación de 5-HT, sin producir los daños neurotóxicos serotoninérgicos a largo plazo. Estos autores han sugerido que la MDMA debe ser metabolizada a nivel periférico para promover la formación de radicales libres hidroxilo (Esteban y cols., 2001). Recientemente, estudios *in vitro* han demostrado que los metabolitos reactivos tioéter de la MDMA, originan especies reactivas al oxígeno y al nitrógeno, así como también oxidación tóxica.

Sistemas de Neurotransmisión

Por lo tanto, estos compuestos podrían jugar un papel importante en los efectos neurotóxicos producidos por esta droga (Capela y cols., 2007a). Del mismo modo, la estimulación directa de los receptores 5-HT_{2A} también induce estrés oxidativo intracelular, el cual, conduce a la apoptosis neuronal (Capela y cols., 2007b).

En las cobayas, se ha observado un gran decremento (72%) de los niveles de 5-HT y 5-HIAA una semana después de la administración de la MDMA, mientras que el contenido dopaminérgico en el estriado de estos animales no se ve afectado. Al parecer, los cobayos son altamente susceptibles a los efectos neurotóxicos de esta droga, ya que pérdida del contenido serotoninérgico en el estriado de estos animales es incluso mayor a la observada con frecuencia en las ratas (Saadat y cols., 2004).

Sprague y Nichols (1995) propusieron que el exceso de DA, originado como consecuencia de la administración de la MDMA, podría ser capturado e introducido a la terminal serotoninérgica, donde el neurotransmisor podría ser deaminado por la MAO B, lo que en consecuencia originaría especies reactivas al oxígeno. Shankaran y cols., (1999b) apoyan la teoría de que la DA podría estar implicada en la generación de radicales hidroxilo, ya que estos autores encontraron que el mazindol atenúa el incremento extracelular de la concentración de este neurotransmisor y el aumento extracelular de los niveles de 2,3-DHB. Estos efectos sugieren que la formación de 2,3-DHB producidos tras la administración de MDMA, podrían depender del incremento de la concentración extracelular de DA (Shankaran y cols; 1999b). Igualmente, Jones y cols., (2004) demostraron que los metabolitos de la MDMA no solo estimulan la recaptación de DA en las células humanas que expresan el SERT, sino que también estimulan la generación de radicales libres en estas células, probablemente mediante la deaminación y la autooxidación de la propia DA (Sprague y Nichols., 2005). Por el contrario, Colado y cols., (1999a) observaron que el haloperidol bloquea la respuesta hipertérmica de la MDMA, y atenúa los efectos neurotóxicos serotoninérgicos inducidos por esta droga sólo cuando es capaz de revertir la respuesta hipertérmica, ya que cuando la temperatura rectal de los animales se mantiene elevada, los efectos preventivos de este antagonista dopaminérgico no se observan (Colado

y cols., 1999a). Por otra parte, la administración de L-DOPA no afecta los niveles de 2,3-DHB inducidos por la MDMA (Colado y cols., 1999a). En consecuencia, se ha sugerido que los efectos neuroprotectores del haloperidol, es resultado de un efecto sobre la respuesta hipertérmica de la MDMA, y que el metabolismo dopaminérgico no está implicado en los daños neurodegenerativos serotoninérgicos inducidos por esta droga (Colado y cols., 1999a). Estas observaciones fueron apoyadas más tarde por los estudios realizados por Yuan y cols., (2002), quienes encontraron que cuando se revierte la respuesta hipotérmica, los efectos neuroprotectores de la reserpina y la α -metil-p-tirosina no se expresan. La reserpina y la α -metil-p-tirosina se emplearon con la finalidad de agotar las reservas vesiculares y citoplasmáticas de DA. Por lo tanto, estos autores han concluido que la DA por sí misma, no es esencial para la expresión de los efectos neurotóxicos inducidos por la MDMA.

Los efectos neurodegenerativos producidos por la MDMA podrían estar relacionados con la dosis y la frecuencia de administración de la droga. La exposición a una dosis única de 4 mg/kg de MDMA, o el tratamiento diario con esta misma dosis durante 4 días consecutivos, no induce daños neurodegenerativos sobre las terminales nerviosas serotoninérgicas una semana después de haber finalizado el tratamiento. Sin embargo, cuando esta misma dosis se administra dos veces al día durante 4 días consecutivos, se produce una pérdida considerable de los enlaces de la [³H] paroxetina (O'Shea y cols., 1998).

Los efectos neurotóxicos producidos por la MDMA a largo plazo también podrían depender de la cepa animal empleada. Se ha observado que las ratas Dark Agouti requieren una sola dosis de MDMA para causar una pérdida considerable de algunos marcadores serotoninérgicos, como las concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA, y la densidad del SERT (Colado y Green, 1995; O'Shea y cols., 1998; Colado y cols., 1998; 1999d; Sanchez y cols., 2001), mientras que en otras cepas como la Sprague-Dawley, la Hooded Lister, o la Wistar, es necesario administrar múltiples dosis de esta droga (por lo regular 20 mg/kg o más) para conseguir los mismos resultados (Colado y cols., 1993; Aguirre y cols., 1998; Shankaran y Gudelsky, 1999).

Sistemas de Neurotransmisión

El tratamiento previo con la MDMA podría afectar la respuesta neuroquímica de los animales cuando estos son re-expuestos a la misma droga. Una semana después de la administración de 10 mg/kg de MDMA (4 inyecciones, una cada dos horas), se produce un decremento significativo (45%) de la concentración extracelular de 5-HT en el estriado, mientras que los niveles de DA en esta misma estructura no se ven afectados (Shankaran y Gudelsky, 1999). La subsecuente administración de una dosis *challenge* de MDMA (7.5 mg/kg), induce un incremento considerable de la concentración de DA en el estriado. Sin embargo, el aumento de los niveles de 5-HT en los animales tratados previamente con el régimen neurotóxico de MDMA, es significativamente menor que el observado en los animales control (Shankaran y Gudelsky, 1999). Por tal motivo, se ha indicado que la experiencia previa a la MDMA altera la función serotoninérgica de tal forma, que la respuesta neuroquímica ante una re-exposición a la misma droga se ve afectada (Shankaran y Gudelsky, 1999).

En ratas Wistar, la administración de 40 mg/kg de MDMA (4x5 mg/kg, una inyección cada hora en un intervalo de 4 horas, durante 2 días consecutivos, 20 mg/kg/día) a una temperatura ambiente de 28°C, disminuye considerablemente los niveles de 5-HT y del 5-HIAA, así como también la densidad del SERT en la corteza, el hipocampo, el estriado, y la amígdala casi tres meses después de haber finalizado el tratamiento (Gurtman y cols., 2002; McGregor y cols., 2003a; 2003b; Thompson y cols., 2004). Este régimen también afecta la densidad de algunos receptores serotoninérgicos como los 5-HT_{1B} y los 5-HT_{2A/2C} (McGregor y cols., 2003b). Aunque se describirán con mayor detalle los efectos conductuales producidos a largo plazo, se ha observado que el tratamiento neurotóxico con la MDMA afecta la ansiedad y produce síntomas depresivos en las ratas. Por lo tanto, se ha sugerido que la exposición a esta droga induce alteraciones neuroquímicas que a largo plazo, podrían repercutir sobre la conducta y la emocionalidad de los animales (McGregor y cols., 2003a; 2003b; Thompson y cols., 2004).

Se ha propuesto que el análisis de la concentración de 5-HT y los niveles del 5-HIAA por sí mismos no son suficientes para demostrar los efectos neurotóxicos de la MDMA a largo

plazo. Uno de los principales inconvenientes radica en el simple hecho de que esta droga inhibe la actividad de la triptófano hidroxilasa, con lo cual, no sólo disminuirían las concentraciones del neurotransmisor, sino también su síntesis (Stone y cols., 1986; 1987b; 1989; Schmidt y Taylor, 1987). Ya que la vida media de la triptófano hidroxilasa se ha establecido entre 2 y 3 días (Meek y Neff, 1972), las acciones de la MDMA sobre estos marcadores serotoninérgicos serían temporales, observándose sólo los días posteriores a su administración. No obstante, se ha demostrado que esta droga es capaz de disminuir, dependiendo de la dosis, la actividad enzimática de la triptófano hidroxilasa entre 14 y 110 días (Schmidt y Taylor, 1987; Stone y cols., 1987b). Por lo tanto, los efectos neurotóxicos inducidos por la MDMA a largo plazo, sobre los niveles de 5-HT y su metabolito, podrían ser consecuencia de una alteración en el metabolismo y en la síntesis de este neurotransmisor, y no como resultado de un daño neurodegenerativo de las terminales nerviosas serotoninérgicas (Stone y cols., 1987b). Además, algunos autores sugieren que la pérdida de 5-HT inmunoreactiva en algunas estructuras cerebrales podría ser reflejo de un descenso de la concentración del neurotransmisor hasta niveles indetectables, en axones y terminales nerviosos serotoninérgicos intactos (Wang y cols., 2004; Baumann y cols., 2007). Por lo tanto, se ha postulado que los déficits serotoninérgicos producidos por la MDMA podrían deberse a cambios adaptativos en la expresión genética o en la función proteica que reflejan un estado de “parálisis” metabólica o de agotamiento, y no un daño neurotóxico (Baumann y cols., 2007).

La muerte celular, las tinciones positivas de plata (argiofilia), y la hipertrofia glial también pueden emplearse como indicadores de neurotoxicidad (Switzer, 2000; Baumgarten y Lachenmayer, 2004; O’Callaghan y Sriram, 2005). Los métodos de tinción de plata se utilizan comúnmente para identificar la degeneración neuronal en el sistema nervioso central (SNC) producida por agentes neurotóxicos (Switzer; 2000). Mediante el uso de estas técnicas, algunas investigaciones han demostrado que la MDMA puede producir daño neuronal en la rata (Commins y cols., 1987; Jensen y cols., 1993). No obstante, hay quien sugiere que estos estudios han empleado dosis totales elevadas (80-600 mg/kg), y que el daño neuronal producido por esta droga no es específico de las neuronas serotoninérgicas,

Sistemas de Neurotransmisión

ya que en algunas estructuras cerebrales como la corteza, los cuerpos neuronales también se tiñen de plata, y los somas serotoninérgicos no se localizan en esta estructura cerebral. Es más, el patrón de tinción de plata producido por la MDMA, no se corresponde con los patrones de inervación serotoninérgica (Baumann y cols., 2007).

La fluoro-Jade B es un derivado de fluoresceína aniónico que permite la tinción selectiva de los cuerpos celulares, los axones, y las terminales neuronales que sufren degeneración (Schmued y Hopkins, 2000). Este compuesto es una herramienta histológica novedosa que también ha sido empleada para determinar los efectos neurotóxicos de la MDMA (Schmued, 2003). Sin embargo, al igual que con las tinciones de plata, muchas de las células dañadas identificadas con la fluoro-Jade B no son serotoninérgicas, y los patrones de tinción no se corresponden con los déficits serotoninérgicos (Baumann y cols., 2007).

La hipertrofia de los astrocitos o “gliosis reactiva” es una reacción universal al daño en el SNC (O’Callaghan y Sriram, 2005). Esta respuesta se acompaña de un aumento en la expresión de proteínas estructurales específicas de la glía, como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Algunos investigadores han observado que los compuestos neurotóxicos incrementan los niveles de la GFAP en el SNC de los roedores, por lo que esta proteína puede ser empleada como un marcador del daño neuronal (O’Callaghan y cols., 1995). No obstante, algunos autores han descrito que la MDMA no altera la expresión de la GFAP, aún cuando se observan decrementos significativos de las concentraciones de 5-HT en la corteza, el hipocampo, y el estriado (O’Callaghan y Miller, 1993). Pubill y cols., (2003) han observado que la MDMA disminuye la densidad del SERT en la rata Sprague-Dawley, pero no afecta ningún marcador de gliosis reactiva. En contraste, Aguirre y cols., (1999) han demostrado que la administración de una sola dosis de MDMA (20 mg/kg), aumenta la tinción histoquímica de la GFAP en el hipocampo de la rata Wistar. Mediante el empleo de técnicas de *western blot* se ha demostrado que la MDMA, a dosis que disminuyen la concentración de 5-HT, no induce cambios significativos en la expresión del SERT o de la GFAP, mientras que la 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT, neurotoxina serotoninérgica) si disminuye ambos factores. Por lo tanto, se ha sugerido que la 5,7-DHT si cumple con un perfil de neurotoxina, pero no así la MDMA (Wang y cols., 2004; 2005).

Wang y cols., (2007) han propuesto el considerar 3 posibles modelos para los efectos de la MDMA sobre las terminales nerviosas serotoninérgicas: (1) el modelo neuroadaptativo, que postula que dichas terminales permanecen intactas tras la administración de la droga, pero que las reservas vesiculares de 5-HT se encuentran agotadas como resultado de la prolongada inhibición de la síntesis del neurotransmisor. (2) El modelo neurotóxico, que establece que alguna fracción de las terminales serotoninérgicas es destruida, mientras que las terminales que permanecen intactas mantienen sus funciones normales. Por último, (3) el modelo mixto postula que alguna fracción de las terminales nerviosas serotoninérgicas es destruida, y que las terminales que permanecen intactas muestran una pobre reserva vesicular de 5-HT. De acuerdo con el modelo neuroadaptativo, tras la administración neurotóxica de MDMA, las terminales nerviosas serotoninérgicas que sobreviven poseen vesículas que contienen VMAT, pero cuyas reservas de 5-HT se encuentran agotadas. Al administrar un precursor serotoninérgico, como el 5-HTP-B a ratas que han sido tratadas con MDMA, se produce un incremento en la disponibilidad citoplasmática de 5-HT, lo que permite que las vesículas presinápticas se abastezcan por completo. Dado que las vesículas normalmente acumulan 5-HT a toda su capacidad, es posible que tras la administración de la MDMA, el contenido de 5-HT citoplasmática decaiga hasta niveles límite, que no permita que las vesículas acumulen este neurotransmisor, es decir, que no exista la suficiente disponibilidad de 5-HT como para promover un nuevo reabastecimiento de las vesículas presinápticas (Wang y cols., 2007).

En contraste, Xie y cols., (2006) han sugerido que los déficits serotoninérgicos producidos por la MDMA no representan una respuesta metabólica neuroadaptativa a los cambios producidos en el SERT, y que esta droga tiene el potencial de producir axotomía distal de las neuronas serotoninérgicas. Estos autores observaron mediante el *western blot*, que la MDMA y la 5,7-DHT reducen las concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA, así como también los sitios de unión de la [³H] paroxetina. Además, encontraron una menor densidad de los axones inmunoreactivos a la triptófano hidroxilasa, lo que indica que los déficits serotoninérgicos observados difieren de los obtenidos en ratones *knock out* SERT (KO SERT), los cuales, muestran niveles normales de esta enzima, pero que al carecer del

Sistemas de Neurotransmisión

transportador monoaminérgico desarrollan al parecer, cambios neuroadaptativos en el metabolismo de la 5-HT.

Por otra parte, O'Shea y cols., (2006) evaluaron en ratas la validez de los parámetros serotoninérgicos como un reflejo de los efectos neurotóxicos y neurodegenerativos inducidos por la MDMA a largo plazo. Estos autores evaluaron el contenido de 5-HT y los sitios de unión de la [³H] paroxetina en la corteza, el hipocampo, y el estriado, y emplearon la NSD-1015 (3-hidroxibenzilhidrazina), un inhibidor de la L-aminoácido descarboxilasa aromática, con la finalidad de determinar la actividad de la triptófano hidroxilasa, y con ello, la tasa de síntesis de 5-HT *in vivo*. O'Shea y cols., (2006) observaron que las ratas Dark Agouti tratadas con una sola dosis de 12.5 mg/kg de MDMA, mostraron un decremento de la concentración de 5-HT y de los sitios de unión de la [³H] paroxetina en la corteza (26 y 53% respectivamente), y en el hipocampo (25 y 74%), hasta 32 semanas después de haber administrado la droga. Asimismo, la MDMA redujo la actividad hidroxilasa durante 8 semanas, aunque esta se recuperó 32 semanas después en estas mismas estructuras. En cambio en el estriado, los niveles de 5-HT y los enlaces de la [³H] paroxetina se recuperaron alrededor de la 4ª semana, mientras que la actividad de la hidroxilasa se restableció 7 días después. Estos autores determinaron que el decremento de la concentración de 5-HT no fue consecuencia de una alteración en la síntesis de la 5-HT en todas las regiones evaluadas. En conclusión, O'Shea y cols., (2006) han sugerido que la MDMA podría dañar las neuronas serotoninérgicas a largo plazo, y que posiblemente no se produce un incremento compensatorio de la síntesis de 5-HT en las terminales nerviosas que permanecen intactas. Además, sugirieron que el análisis de los niveles de 5-HT podría sobreestimar el daño neurotóxico, mientras que la determinación de los sitios de unión de la [³H] paroxetina sería, al menos inicialmente, un buen indicador de los daños neurodegenerativos inducidos por la MDMA a largo plazo.

Hewitt y Green (1994) indicaron que la pérdida de la captación de [³H] 5-HT de alta afinidad en el tejido cerebral, obtenido de a partir de ratas tratadas previamente con MDMA, es un correlato que se aproxima a las estimaciones obtenidas con la [³H]

paroxetina, más que el análisis de la concentración indólica, ya que este éste parámetro puede ser afectado por la actividad de la triptófano hidroxilasa (Green y cols., 2003). Por lo tanto, se ha propuesto que el análisis de los enlaces de la [³H] paroxetina, es un indicador preciso para la evaluación de la pérdida de las terminales nerviosas serotoninérgicas. Esta teoría es apoyada por la evidencia de que la pérdida de los sitios de unión de la [³H] paroxetina inducida por la MDMA, no es resultado de una respuesta neuroadaptativa (Boot y cols., 2002).

5.3.1.2. Primates

Los efectos neurotóxicos que han sido observados en las ratas también han sido descritos en los primates no humanos (Ricaurte y cols., 1988a; 1988b; Slikker y cols., 1988; Insel y cols., 1989; Scheffel y cols., 1998; McCann y cols., 2000). En comparación con las ratas, estos animales son más sensibles a la neurotoxicidad inducida por la MDMA (Ricaurte, 1989; De Souza y cols., 1990). Algunos autores han sugerido que los decrementos de la concentración de 5-HT y de la densidad del SERT en la corteza de los monos, pueden producirse con dosis más bajas que las empleadas en las ratas, es más, las terminales nerviosas serotoninérgicas de los primates pueden ser dañadas con tan sólo la décima parte de la dosis de MDMA requerida para producir neurodegeneración en las ratas (Ricaurte y McCann, 1992). Los niveles de 5-HT y del 5-HIAA, así como también la densidad del SERT (evaluada con [³H] paroxetina) en la rata, se recuperan casi por completo 32 semanas después de haber administrado la MDMA (Scanzello y cols., 1993). En contraste, el decremento de los marcadores serotoninérgicos en la corteza, el hipocampo, y el estriado de los primates, puede observarse hasta 18 meses o incluso 7 años después de la administración de la droga, habiéndose sugerido que estas alteraciones posiblemente sean permanentes (Ricaurte y McCann 1992; Fischer y cols., 1995; Hatzidimitriou y cols., 1999).

Por otro lado, también se han observado alteraciones en la concentración del 5-HIAA en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Ricaurte y cols., 1988b; Insel y cols., 1989). La MDMA

Sistemas de Neurotransmisión

(2.5 o 10 mg/kg), administrada dos veces al día durante 4 días consecutivos, disminuye la concentración de este metabolito serotoninérgico en el LCR, y además los niveles de 5-HT y del 5-HIAA a nivel central en el mono Rhesus. Cabe destacar que la dosis más alta de MDMA también produce un decremento de la densidad del SERT (Insel y cols., 1989).

Mediante la tomografía por emisión de positrones (TEP), se ha observado que el tratamiento con la MDMA (2x5 mg/kg durante 4 días) produce un decremento significativo y persistente de la densidad del SERT en los babuinos (Scheffel y cols., 1998). Los tejidos cerebrales de estos animales, sacrificados 3 semanas después de los estudios TEP y 13 meses después de haber finalizado el tratamiento con la MDMA, muestran una pérdida significativa de los terminales serotoninérgicos (Scheffel y cols., 1998). Asimismo, algunas estructuras como el caudado, el putamen, y la corteza frontal, muestran una disminución de la VMAT, lo cual, podría estar asociado con los efectos producidos sobre los marcadores serotoninérgicos. (Ricaurte y cols., 2000).

Fantegrossi y cols., (2004) describieron que la AA intravenosa crónica de MDMA, a dosis bajas (0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 mg/kg/inyección), no produce efectos neurotóxicos en los monos Rhesus. Estos investigadores observaron que tras 18 meses de AA de la droga, no se aprecian cambios significativos en las concentraciones de 5-HT, del 5-HIAA, la DA, del DOPAC, o la VMAT (evaluada con TEP) en ninguna de las estructuras cerebrales examinadas, como las cortezas frontal, parietal, temporal, occipital, así como también en el hipocampo, el tálamo, el hipotálamo, el núcleo caudado y el globo pálido. A pesar de que no se observaron cambios significativos, los autores encontraron una tendencia descendente en el contenido serotoninérgico. Por ejemplo, algunos animales mostraron decrementos del 40 al 50% en las cortezas temporal, parietal y frontal; mientras que en la corteza occipital, el tálamo y el hipotálamo se observó un descenso del 25% en este parámetro. Estos resultados concuerdan con algunas investigaciones llevadas a cabo en macacos del viejo mundo (*Old World macaques*). De Souza y cols., (1990) demostraron que la concentración de 5-HT disminuye alrededor del 95% en las cortezas frontal, parietal, y temporal, tras un tratamiento con MDMA (2x10 mg/kg/día durante 4 días consecutivos). Del mismo modo,

Taffe y cols., (2002) observaron una disminución de los niveles de 5-HT del 80 al 90% en las mismas estructuras cerebrales y con el mismo tratamiento empleado por De Souza y cols., (1990). Por lo tanto, es posible que Fantegrossi y cols., (2004) no hayan obtenido cambios significativos debido al pequeño tamaño de muestra empleado. Sin embargo, destacan que el hipocampo no muestra alteraciones serotoninérgicas a pesar de la AA crónica de MDMA, ya que en otros estudios, se ha demostrado que el hipocampo exhibe un decremento (60 al 90%) de las concentraciones de 5-HT (Kleven y cols, 1989; Slikker y cols., 1988, 1989; De Souza y cols., 1990; Ali y cols., 1993; Frederick y cols., 1998; Taffe y cols., 2002).

Algunos estudios inmunohistoquímicos también han descrito reducciones significativas de la densidad axónica en el cerebro anterior de primates no humanos tratados con MDMA (2 a 10 mg/kg) (Ricaurte y cols., 1988b; Molliver y cols., 1990). Hatzidimitriou y cols., (1999) observaron una pérdida de los axones serotoninérgicos en la corteza cerebral de monos ardilla, 2 semanas y 7 años después de haber finalizado el tratamiento con la MDMA (2x5 mg/kg/día durante 4 días consecutivos). Es importante mencionar que se ha descrito una reorganización de las proyecciones serotoninérgicas de los primates tratados con esta droga (Fischer y cols., 1995; Scheffel y cols., 1998; Hatzidimitriou y cols., 1999, Ricaurte y cols., 2000). En los monos ardilla lesionados previamente con la MDMA, se observa a largo plazo una regeneración de los axones serotoninérgicos. Sin embargo, 18 meses después de haber administrado la droga, estos patrones de reinervación son anormales (Fischer y cols., 1995). Cabe destacar que algunas estructuras cerebrales en estos animales, como la corteza, se mantienen denervadas, mientras que otras como la amígdala y el hipotálamo muestran reinervación o hiperinervación (Fischer y cols., 1995).

La administración de 5 mg/kg de MDMA, vía intraperitoneal u oral, produce una degeneración substancial de las terminales nerviosas serotoninérgicas (alrededor del 90%) en el cerebro de los monos ardilla, incluso se ha descrito que los cuerpos neuronales del núcleo del rafe dorsal podrían ser dañados, mientras que en las ratas permanecen intactos (Ricaurte y cols., 1988a; Hatzidimitriou y cols., 1999). En las ratas y en los monos, el

Sistemas de Neurotransmisión

hipotálamo sufre un aumento de la inervación anormal que puede observarse a las 52 y 72 semanas (respectivamente) después de la administración de la droga (Fischer y cols., 1995). Estos efectos podrían explicar quizás, las diferencias entre ambas especies en la recuperación de los axones dañados, y en la reinervación satisfactoria de las neuronas serotonérgicas (Ricaurte y McCann, 1992).

Diversos factores podrían influir en la recuperación de los axones serotonérgicos tras las lesiones inducidas por la MDMA, como (1) la distancia entre las terminales axónicas afectadas y el núcleo rostral del rafe, (2) el grado de la lesión axonal serotonérgica, y posiblemente (3) la proximidad de las terminales serotonérgicas afectadas a tractos fibrosos mielinizados (Hatzidimitriou y cols., 1999). En definitiva, podría sugerirse que en comparación con los roedores, los efectos de la MDMA sobre el sistema nervioso central de los primates son más severos, y al parecer no muestran el mismo nivel de recuperación (Fischer y cols., 1995).

Recientemente, Mehan y cols., (2006) examinaron el perfil farmacocinético de la MDMA en el mono ardilla a través de diferentes vías de administración, y evaluaron la relación entre las concentraciones plasmáticas agudas de la MDMA tras el tratamiento repetido por vía oral y los posteriores déficits serotonérgicos. Los investigadores observaron que la administración oral de MDMA induce un perfil plasmático similar al observado en los seres humanos, aunque la vida media de esta droga es más corta en estos animales (3 vs 6-9 horas). Asimismo, demostraron que la MDMA es biotransformada hacia MDA, cuya proporción plasmática es parecida a la encontrada en los seres humanos. La acumulación de la MDMA fue no lineal, y los niveles plasmáticos obtenidos se correlacionaron con los déficits serotonérgicos cerebrales que se observaron 2 semanas después. Por tal motivo, Mehan y cols., (2006) han sugerido que las concentraciones plasmáticas de la MDMA producidas durante la fase aguda, podrían estar relacionadas con los déficits serotonérgicos inducidos a largo plazo en estos animales, aunque las concentraciones plasmáticas de esta droga fueron dos o tres veces más elevadas que las que habitualmente se observan en los individuos que consumen una dosis de 100-150 mg/kg de MDMA.

5.3.2. Neurotoxicidad dopaminérgica

5.3.2.1. Ratas

En las ratas, la toxicidad dopaminérgica ha sido observada sólo ocasionalmente mediante la administración repetida de grandes dosis de MDMA, o alojando los animales tratados en un ambiente con elevada temperatura (Commins y cols., 1987; Yuan y cols., 2002). En ambos casos los animales muestran una respuesta hipertérmica pronunciada y prolongada, y sólo se induce una modesta disminución de la concentración de DA en el estriado (Commins y cols., 1987; Yuan y cols., 2002).

Sanchez y cols., (2003) comprobaron la resistencia del sistema dopaminérgico de la rata ante la neurotoxicidad inducida por la MDMA. Los autores mermaron la actividad antioxidante cerebral de los animales mediante el suministro de una dieta deficiente en selenio. No obstante, el procedimiento empleado fue incapaz de demostrar algún daño de las neuronas dopaminérgicas tras la administración de MDMA. Sin embargo, estos autores obtuvieron una disminución considerable de la actividad de la glutatión peroxidasa, uno de los principales sistemas celulares antioxidantes que actúan contra la formación de radicales libres.

5.3.2.2. Ratones

En el ratón, la MDMA actúa como una neurotoxina especialmente dopaminérgica (Green y cols., 2003, Lyles y Cadet, 2003; Cole y Sumnall, 2003b; Gudelsky y Yamamoto, 2008). Los efectos a largo plazo de la MDMA sobre las neuronas dopaminérgicas del estriado, se ven reflejados por una disminución de la concentración de DA, una menor densidad de los DAT, así como también, por una reducción de la actividad de la tirosina hidroxilasa, y un aumento de la concentración de la GFAP (Mann y cols., 1997; Jayanthi y cols., 1999; Johnson y cols., 2002a).

Sistemas de Neurotransmisión

La edad de los animales podría influir en el impacto neurotóxico de la MDMA. Reveron y cols., (2005) evaluaron los efectos durante y después de un tratamiento con MDMA (4x20 mg/kg) en ratones de 4 y 10 semanas de edad. Ambos grupos de edad mostraron una respuesta hipertérmica, pero este efecto fue mayor en los ratones adultos. Una semana después de haber finalizado el tratamiento, los investigadores observaron una reducción de los niveles de la VMAT y de la tirosina hidroxilasa en los animales adultos, pero no en el grupo más joven, en comparación con los ratones control. La expresión del DAT también fue menor en ambos grupos MDMA. Además, estos grupos también mostraron menores concentraciones de DA y del DOPAC en el estriado, aunque estas alteraciones fueron más pronunciadas en los animales adultos. A pesar de que ambos grupos de edad mostraron evidencia de neurotoxicidad, los autores han sugerido que en comparación con los ratones adolescentes, los animales adultos muestran una gran respuesta hipertérmica a la MDMA, y también son más susceptibles al daño dopaminérgico producido con esta droga.

Los efectos neurotóxicos dopaminérgicos de la MDMA también podrían depender de la cepa de animales empleada. En comparación con los ratones de las cepas BALB/C y C57BL/6, los ratones de la cepa CBA muestran una mayor sensibilidad al efecto neurotóxico dopaminérgico inducido por múltiples dosis de MDMA (Zheng y Laverty, 1993). Además, los ratones CBA también muestran neurotoxicidad serotoninérgica (Zheng y Laverty, 1993). Igualmente, se ha demostrado que los ratones Swiss Webster muestran neurotoxicidad dopaminérgica a largo plazo tras la administración de la MDMA, la cual, no se previene mediante la administración de fluoxetina (O'Shea y cols., 2001).

En las ratas, la administración de una sola inyección de MDMA es suficiente para producir neurodegeneración de las vías serotoninérgicas (Colado y cols., 1997, 1999d). En contraste, para inducir un daño neurotóxico dopaminérgico en los ratones, se requiere la administración de múltiples dosis de esta droga (Colado y cols., 2001). Por tal motivo, se ha sugerido que estas diferencias en el tratamiento de la MDMA entre ratas y ratones, con la finalidad de producir un aumento considerable de la formación de radicales libres, podría modular las diferencias observadas entre ambas especies (Colado y cols., 2001).

La neurotoxicidad en ratones podría ser resultado de procesos de estrés oxidativo, ya que se ha observado que: (1) los inhibidores de la sintetasa del óxido nítrico (NOS) previenen el daño neuronal, y el aumento de la formación de radicales libres hidroxilo inducidos por la MDMA (Colado y cols., 2001); (2) los ratones transgénicos de la superóxido dismutasa CuZn muestran resistencia ante las acciones neurotóxicas de la MDMA (Cadet y cols., 1994; 1995; 2001) y; (3) la MDMA disminuye la actividad de la superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa, así como también un incremento de la peroxidación lipídica en varias estructuras cerebrales como el caudado, el putamen, la corteza frontal, y el hipocampo (Jayanthi y cols., 1999).

Los ratones transgénicos Cu-Zn-superóxido dismutasa (animales que contienen la secuencia completa del gen de la CuZn superóxido dismutasa humana, un potente antioxidante biológico), muestran resistencia ante la neurotoxicidad inducida por la MDMA (Cadet y cols., 1994; 1995; 2001). Además del aumento en la producción de radicales libres, la MDMA reduce la actividad de las principales enzimas antioxidantes cerebrales (como la glutatión peroxidasa, la catalasa, y la Cu-Zn-superóxido dismutasa), y aumenta la peroxidación lipídica en diversas áreas cerebrales, lo cual, podría ser resultado de la existencia de procesos de estrés oxidativo (Jayanthi y cols., 1999; Camarero y cols., 2002). Del mismo modo, la MDMA induce a largo plazo una disminución considerable de la concentración de DA en el estriado de animales deficientes de vitamina E, y en ratones sometidos a una dieta pobre en selenio (Johnson y cols., 2002b; Sanchez y cols., 2003). Cabe destacar que los animales que carecen de selenio, también muestran neurotoxicidad serotoninérgica (Sanchez y cols., 2003). La deficiencia de selenio perjudica el estatus antioxidante celular del cerebro del ratón, y este efecto no solo exacerba la toxicidad dopaminérgica inducida por la MDMA, sino que también facilita el daño de las neuronas serotoninérgicas (Sanchez y cols., 2003). Es más, la dieta deficiente en selenio disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa alrededor del 30% la corteza y el estriado de los ratones, e incrementa el grado de peroxidación lipídica en sinaptosomas corticales inducida por la MDMA. En contraste, las ratas alimentadas con una dieta pobre en selenio, no muestran cambios en la neurotoxicidad inducida por la MDMA de las terminales nerviosas

Sistemas de Neurotransmisión

serotoninérgicas, a pesar de mostrar un decremento de la actividad de la glutatión peroxidasa. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la capacidad antioxidante de las ratas y los ratones difiere entre ambas especies, y conduce a una susceptibilidad diferente ante el estrés oxidativo causado por la MDMA (Sanchez y cols., 2003).

Recientemente, se ha observado que la administración de un régimen neurotóxico de MDMA (3x20 mg/kg, una inyección cada 3 horas) disminuye, una semana después, la expresión de tirosina hidroxilasa en el compartimento estriosomal del estriado de ratones. Este efecto también se acompaña de una reducción de la densidad del DAT (Granado y cols., 2008), un importante marcador funcional de las terminales nerviosas dopaminérgicas (Irvani y cols., 2005; Pavon y cols., 2006). En consecuencia, se ha sugerido que la MDMA no reduce la síntesis de la tirosina hidroxilasa, sino que destruye las terminales neuronales dopaminérgicas del estriado del ratón (Granado y cols., 2008). Además, la vulnerabilidad del compartimento estriosomal a los efectos tóxicos de la MDMA podría deberse a su baja capacidad antioxidante, ya que esta región muestra una baja concentración de la enzima superóxido dismutasa (Zhang y cols., 1994; Medina y cols., 1996; Granado y cols., 2008). El compartimento estriosomal del estriado ha sido relacionado con las conductas implicadas en los procesos recompensantes, y con la actividad de los psicoestimulantes y los antipsicóticos (Moratalla y cols., 1996; White y Hiroi, 1998; Grande y cols., 2004). Por lo tanto, los efectos neurotóxicos inducidos por la MDMA sobre esta región cerebral, podrían afectar las respuestas motivacionales y recompensantes hacia la misma MDMA o hacia otras drogas de abuso.

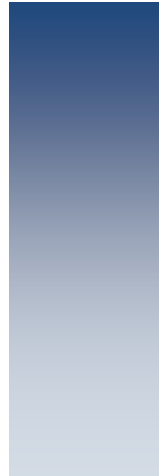
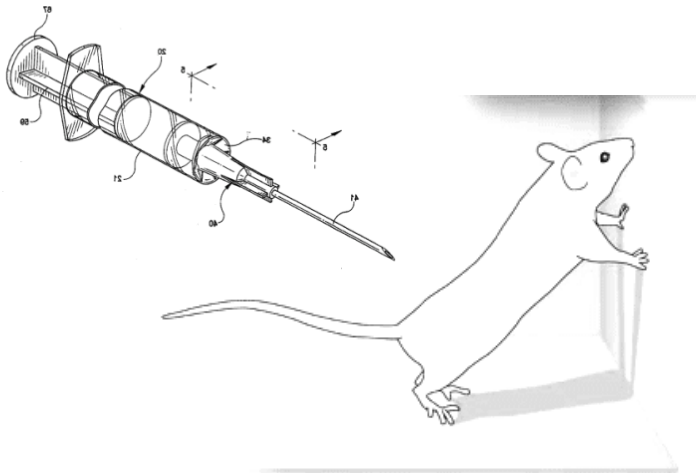
Por otra parte, el GBR 12909 posee un efecto neuroprotector contra el daño dopaminérgico inducido por la MDMA, pero no impide la liberación de DA (O'Shea y cols., 2001; Camarero y cols., 2002). En los ratones, la administración de MDMA (3x30 mg/kg, una inyección cada 3 horas) aumenta la formación del 2,3-DHBA en el estriado, lo que sugiere que la MDMA también incrementa la formación de radicales libres en estos animales. El tratamiento previo con el GBR 12909 atenúa (aproximadamente un 50%) el aumento de los niveles de 2,3-DHB inducido por la MDMA, a pesar de que este compuesto no tiene

actividad intrínseca para captar radicales libres (Camarero y cols., 2002). Por otro lado, la MDMA incrementa la peroxidación lipídica en sinaptosomas del estriado, un efecto que se reduce aproximadamente un 60% con la administración previa del GBR 12909 (Camarero y cols., 2002). Por lo tanto, se ha sugerido que los efectos neurotóxicos dopaminérgicos inducidos por la MDMA en los ratones, son resultado de la formación de radicales libres, lo cuales a su vez, inducen un proceso de estrés oxidativo. Asimismo, la formación de radicales libres probablemente no está asociada con la liberación de DA inducida por la MDMA, y que esta droga no induce la liberación del neurotransmisor a través del DAT (Camarero y cols., 2002). Es posible que el GBR 12909, debido a que no tiene efecto sobre la formación de radicales libres, ejerza sus efectos protectores mediante el bloqueo del DAT, con lo cual impediría la entrada de algún metabolito neurotóxico al interior de la terminal nerviosa dopaminérgica (Camarero y cols., 2002).

Los inhibidores de la NOS como la S-metil-L-tiocitrulina y el AR-R17477AR, bloquean los efectos tóxicos de la MDMA, careciendo de efecto sobre la respuesta hipertérmica inducida por esta droga (Colado y cols., 2001). Debido a que el AR-R17477AR no captura los radicales libres, se ha propuesto que la neurotoxicidad inducida por la MDMA podría ser resultado de algún metabolito que promueva la formación de radicales libres, los cuales, se combinarían con el óxido nítrico dando como resultado la producción de peroxinitritos (Colado y cols., 2001). Mediante la inhibición de la NOS, esta interacción disminuye lo suficiente como para bloquear o atenuar la formación de iones peroxinitritos altamente tóxicos (Colado y cols., 2001).

Por último, la administración de la minociclina (un derivado de las tetraciclinas de segunda generación con propiedades anti-inflamatorias y neuroprotectoras) atenúa significativamente los efectos neurotóxicos sobre la 5-HT y la DA inducidos por la MDMA, así como también, los efectos sobre la densidad de sus transportadores. Igualmente, este compuesto atenúa la activación de la microglía en el hipocampo y el estriado (Zhang y cols., 2006).

Efectos agudos de la MDMA



6. EFECTOS AGUDOS DE LA MDMA

6.1. Efectos en los seres humanos

La MDMA induce diversos efectos subjetivos durante la fase aguda, como sensación de bienestar, felicidad, estimulación, aumento de la “energía”, extraversión, una sensación de intimar con los demás, aumento de la empatía, de la sociabilidad y del humor, ligeras alteraciones en la percepción como cambios en la apreciación de los colores y los sonidos. Igualmente, provoca síntomas somáticos relacionados con los efectos cardiovasculares y autonómicos (elevación de la tensión arterial y aumento del ritmo cardíaco, midriasis (Camí y cols., 2000; Cole y Sumnall, 2003a; de la Torre y cols., 2004). Sin embargo, también se han descrito algunos efectos adversos como la pérdida del apetito, bruxismo (rechinar de dientes), sequedad de la boca, sed, agitación, palpitaciones, pérdida del equilibrio, dificultad de concentración, mareos, sensación o sensibilidad al frío, somnolencia, nistagmos (movimientos oculares incontrolados), sofocos, trismo (contracción mandibular), tensión muscular, fatiga, insomnio, confusión, ansiedad, y temblores. La MDMA también puede producir ataques de pánico, delirio, y episodios psicóticos breves que por lo regular se resuelven rápidamente cuando finaliza la actividad de la droga (Camí y cols., 2000; Cole y Sumnall, 2003a; de la Torre y cols., 2004). A corto plazo, entre 1 y 7 días después del uso de esta droga, el éxtasis podría inducir fatiga, sensación de piernas pesadas, boca seca, pérdida del apetito, insomnio, somnolencia, debilidad, tensión muscular, falta de energía, dificultad para concentrarse, dolores de cabeza, irritabilidad, ansiedad y depresión (Camí y cols., 2000; Cole y Sumnall, 2003a; de la Torre y cols., 2004). El consumo excesivo de MDMA (sobredosificación) podría causar efectos tóxicos agudos relacionados con su actividad farmacológica. Cuando el individuo muestra una intoxicación leve por consumo de éxtasis pueden llegar a observarse vómito, midriasis, boca seca, sudoración, fatiga, temblores, hiperreflexia, irritabilidad, palidez, bruxismo, trismo y palpitaciones. En casos de intoxicación moderada se identifican signos de hiperactividad, confusión, agresión, ataques de pánico, psicosis, tensión muscular, taquicardia, hipertensión e incremento de la temperatura corporal (Hipertermia) (Cohen, 1995; Green y cols., 1995; Peroutka y cols.,

Efectos agudos

1988; Schifano y cols., 1998; Vollenweider y cols., 1998; Milroy, 1999; Camí, 2000; Cole y Sumnall, 2003a; de la Torre y cols., 2004). No obstante, cuando la intoxicación es grave podría producirse delirio, coma, hipotensión, frecuencia cardíaca anormalmente rápida, hipertermia ($>40^{\circ}\text{C}$), y fallo renal asociado con rhabdmiolisis (síndrome causado por daños en el músculo esquelético induciendo la liberación del contenido de las células musculares, como mioglobina, potasio, fosfato, etc., hacia el plasma). Asimismo, se ha descrito síndrome serotoninérgico (incremento de la rigidez muscular, hiperreflexia e hipertermia) y hemorragia intracraneal (Green y cols., 1995; Milroy, 1999; Camí, 2000; Cole y Sumnall, 2003a; de la Torre y cols., 2004).

Farré y cols., (2004) investigaron los efectos farmacológicos de la administración de 2 dosis de MDMA (100 mg) con un intervalo de 24 hrs. De esta forma, estos autores observaron que las concentraciones plasmáticas de la MDMA aumentan considerablemente en comparación con la primera dosificación, posiblemente como consecuencia de una inhibición metabólica de la droga. Asimismo, los efectos farmacológicos tras la segunda dosis fueron más pronunciados (que los observados tras la primera) en la mayor parte de las variables estudiadas entre los que se incluyen un aumento la presión sanguínea y la tasa cardíaca, efectos subjetivos más intensos, y una mayor concentración de cortisol. Otros efectos como los cambios del diámetro pupilar, la esoforia (tension muscular extraocular, el ojo privado de estimulación visual se desvía hacia la línea media de la cara), y la respuesta a la prolactina, no fueron afectados por la administración de la segunda dosis de MDMA.

Algunos estudios han demostrado que la MDMA induce incrementos discretos no significativos (0.2 a 0.5°C), de la temperatura corporal de consumidores del éxtasis (Vollenweider y cols., 1998). Se ha sugerido que esta droga podría no producir una respuesta hipertérmica en seres humanos, a pesar de observarse una tendencia hacia la hipertermia (Mas y cols., 1999). Sin embargo, Freedman y cols., (2005) demostraron que la MDMA induce un incremento considerable de la temperatura corporal durante la fase de intoxicación aguda, así como también, un aumento de la tasa metabólica en dos ambientes con distinta temperatura (30°C y 18°C), por lo que estos autores consideraron que ambas

respuestas podrían estar relacionadas. Estos datos fueron confirmados por Freedman y cols., (2005), quienes observaron que esta droga produce una respuesta hipertérmica en condiciones de elevada y baja temperatura ambiente. Además, de la Torre y cols., (2005), mientras evaluaban la farmacocinética de la MDMA en voluntarios, observaron que uno de los sujetos de su estudio mostraba un metabolismo deficiente de esta droga (metabolizador pobre). Estos autores encontraron ligeros incrementos de la temperatura corporal en los sujetos que presentaban un metabolismo normal de la droga, pero por el contrario, el metabolizador pobre mostró una considerable respuesta hipertérmica.

La hipertermia podría ser resultado de la acción directa de la droga sobre los centros del SNC que regulan la temperatura corporal, y por la vasoconstricción de los vasos sanguíneos. Estos efectos pueden sumarse con una actividad muscular asociada al baile, con la elevada temperatura ambiente de los lugares cerrados y abarrotados de gente, y con la deshidratación. El golpe de calor es una complicación grave que puede llegar a causar la muerte e incluye hipertermia, rhabdomiolisis, mioglobinuria (mioglobina en orina), coagulación intravascular diseminada, y fallo renal. Por otro lado, la hiponatremia (disminución del sodio) es una complicación poco común y se asocia con el consumo excesivo de agua, y con frecuencia se observa síndrome de secreción inapropiada de la hormona antidiurética. Igualmente, se han descrito hepatitis fulminante y necrosis hepática (Green y cols., 1995; Milroy, 1999; Camí, 2000; Cole y Sumnall, 2003a; de la Torre y cols., 2004).

Los consumidores de éxtasis asiduos a las discotecas muestran una respuesta hipertérmica sustancial cuando se encuentran bajo los efectos de la droga, en comparación con otros sujetos que se encuentran bailando en el mismo local (Parrott y Young, 2005). En definitiva, el incremento considerable de la estimulación psicofisiológica y la actividad metabólica, sugiere que el consumo de la MDMA en discotecas y raves podría ser en ocasiones potencialmente peligroso (Fantegrossi y cols., 2003). De hecho, la respuesta hipertérmica podría ser ocasionalmente fatal (Parrott, 2002; Green y cols., 2003; Schifano y cols., 2006).

Efectos agudos

En definitiva, el aumento de la temperatura ambiental y de la temperatura corporal, y el esfuerzo muscular derivado del baile, pueden aumentar el riesgo de los efectos adversos relacionados con el consumo de éxtasis por lo cual, como tratamiento preventivo, se recomienda con frecuencia el consumo de bebidas refrescantes y energéticas (Jones y Volans, 1999), además del uso de relajantes musculares, sustancias sedantes, y anticonvulsivantes (Green y cols., 1995). Las complicaciones derivadas del consumo de éxtasis son impredecibles y al parecer no dependen de la dosis administrada (Milroy, 1999). Muchos de los consumidores de éxtasis no muestran reacciones adversas, pero ante el desconocimiento de la pureza de la sustancia, y la presencia de posibles contaminantes, es difícil determinar la toxicidad y predecir de esta forma las consecuencias médicas (Newcomb, 1995; Weir, 2000). Además, no se ha demostrado que exista alguna relación entre el número de exposiciones a la MDMA y la sintomatología recurrente, lo que podría sugerir que los efectos adversos que se atribuyen a esta droga podrían ser independientes del número de veces que se consume, e incluso un mínimo de exposición podría producir sintomatología adversa (Cohen, 1995).

El contenido de MDMA en las pastillas que se distribuyen como éxtasis usualmente está conformado por una mezcla racémica, por lo que sus enantiómeros se encuentran en la misma proporción. Asimismo, el metabolismo de la MDMA es enantioselectivo, y se ha observado que el enantiómero (S+)-MDMA es metabolizado de forma más rápida que el enantiómero (R-)-MDMA (Pizarro y cols., 2004). En muestras de plasma y orina obtenidas de consumidores de éxtasis que recibieron 100 mg de esta droga, se ha calculado que el enantiómero (S+)-MDMA muestra una vida media de eliminación muy rápida (4.8 hrs), la cual podría estar relacionada con los efectos subjetivos y psicomotores de la droga. En contraste, la (R-)-MDMA muestra una vida media prolongada (14.8 hrs) por lo es posible que este compuesto esté asociado con los problemas cognitivos y el estado de ánimo decaído que los pacientes manifestaron días después de la administración de la droga (Pizarro y cols., 2004).

Mientras que los efectos subjetivos de la MDMA se producen de forma inmediata tras su consumo, algunos efectos negativos neuropsicológicos (como la falta de apetito y problemas para dormir) pueden observarse entre 24 y 48 horas después de su consumo (Tancer y Johanson, 2001; Verheyden y cols., 2003; Freedman y cols., 2005). En consumidores moderados, se han observado algunas alteraciones del sueño, problemas de memoria, y cambios del estado de ánimo durante la fase de abstinencia. Asimismo, se ha sugerido que estos efectos podrían ser regulados, al menos en parte, por el sistema serotoninérgico (Curran y Travill, 1997; Staley y cols., 1998; Meneses, 1999; Portas y cols., 2000), como consecuencia quizás de la deficiencia de 5-HT originada por la liberación excesiva, al metabolismo, y al decremento de los niveles de este neurotransmisor inducidos por la MDMA (Kish y cols., 2000).

Algunos efectos subjetivos del éxtasis como el estado de ánimo positivo, la extroversión, y la elevada percepción sensorial, pueden ser bloqueados mediante la administración de citalopram, un inhibidor de la recaptación de 5-HT, lo que implicaría la participación de la 5-HT y el SERT en los mecanismos de acción del éxtasis (Liechti y cols., 2000a; 2000b; Liechti y Vollenweider, 2000a; 2000b; 2001). Además, se ha demostrado que el citalopram también reduce considerablemente los efectos cardiovasculares y adversos de esta droga (Liechti y Vollenweider, 2000a; 2001). Por otro lado, la ketanserina (antagonista de los receptores 5-HT_{2A}) y el haloperidol también revierten algunos efectos subjetivos como la estimulación perceptual y la excitación emocional (ketanserina), así como también, la euforia (haloperidol) inducida por la MDMA, pero no revierten los efectos adversos producidos por esta droga (Liechti y Vollenweider, 2000b; 2001). Por tal motivo, se ha indicado que los efectos psicológicos de la MDMA dependen de la liberación de 5-HT y del SERT, mientras que los efectos estimulantes (eufóricos) estarían relacionados, al menos en parte, con la actividad de los receptores D₂. Asimismo, los efectos perceptuales (ligeramente alucinógenos) de la MDMA podrían ser resultado de la estimulación de los receptores 5-HT₂ (Liechti y Vollenweider, 2001).

Efectos agudos

Por otro lado, los efectos psicológicos y fisiológicos de la MDMA muestran dimorfismo sexual. Liechti y cols., (2001) evaluaron los efectos de una dosis de 70-150 (1.35-1.8 mg/kg) mg de MDMA, en una muestra conformada por 54 hombres y 20 mujeres con o sin experiencia previa de consumo. Los efectos subjetivos fueron determinados mediante escalas psicométricas estandarizadas, mientras que las pruebas fisiológicas incluyeron controles de la presión sanguínea, la tasa cardiaca, y la temperatura corporal. Estos investigadores también determinaron los efectos adversos de la MDMA durante la sesión experimental y 24 horas después. En comparación con los hombres, los efectos subjetivos y adversos de la MDMA fueron más intensos en las mujeres, y mostraron más cambios perceptuales, alteraciones del pensamiento, y temor de perder el control corporal. En contraste, los hombres mostraron un mayor nivel de presión sanguínea. Según este estudio las mujeres podrían ser más susceptibles a los efectos serotoninérgicos inducidos por esta droga.

En la misma línea, se ha observado que las mujeres que consumen MDMA muestran síntomas de depresión más pronunciados (a media semana), los cuales, estarían relacionados con la cantidad de droga que consume en una sola sesión (Verheyden y cols., 2002; Curran y cols., 2004). Por otra parte, los consumidores de éxtasis muestran menores niveles de agresión mientras se encuentran bajo los efectos de la droga. Sin embargo, en el transcurso de la semana posterior al consumo, la agresión en estos sujetos aumenta considerablemente, cuya intensidad también ha sido asociada con la cantidad de droga que se ha utilizado (Liechti y Vollenweider, 2001; Curran y cols., 2004). Por tal motivo, se ha sugerido que tras el consumo de la MDMA, las mujeres son más susceptibles que los hombres a mostrar un decaimiento del estado de ánimo observado a media semana, pero ambos géneros no muestran diferencias significativas en la agresión durante los días posteriores al consumo de la droga (Verheyden y cols., 2002; Curran y cols., 2004).

Se ha sugerido la MDMA induce deficiencias cognitivas, particularmente problemas de memoria, durante la fase de intoxicación aguda (Kuypers y Ramaekers, 2005, 2007). Se ha demostrado que la administración de una sola dosis de MDMA (75 mg), afecta la memoria

espacial para la localización de un estímulo (memoria de trabajo espacial), pero no perjudica el proceso de la información contextual (Kuypers y Ramaekers, 2007). Asimismo, se ha observado que esta droga perjudica el recuerdo inmediato y retardado en la prueba de aprendizaje verbal durante la fase de intoxicación aguda (Kuypers y Ramaekers, 2005). La memoria de trabajo de los sujetos que reciben la MDMA, se ve afectada mientras se padecen los efectos agudos de esta droga. Esta deficiencia se caracteriza por una menor capacidad para recordar un determinado número de palabras durante la prueba de recuerdo inmediato (Kuypers y Ramaekers, 2005). Cabe destacar que estos individuos muestran una curva de aprendizaje normal durante los estudios, es decir, con cada ensayo pudieron recordar más palabras con respecto al ensayo previo. No obstante, muestran una menor capacidad para retener palabras (aprenden menos palabras en total), en comparación con los grupos control. El recuerdo retardado también es afectado por esta droga, ya que estos sujetos retuvieron una menor cantidad de palabras tras un tiempo de espera de 30 minutos. Este efecto no solo se atribuyó a una menor cantidad de palabras asimiladas durante la prueba de recuerdo inmediato, sino también a una alta tasa de olvido (Kuypers y Ramaekers, 2005). Los días posteriores al tratamiento (abstinencia de media semana), aquellas personas que recibieron la MDMA mostraron un aumento de la fatiga y una falta de energía, pero no efectos residuales sobre la memoria y tampoco síntomas de depresión, por lo que se ha sugerido que los problemas de memoria producidos por la MDMA (durante la fase de intoxicación aguda) podrían ser temporales, ya que no se observan un día después de la administración de la droga (Kuypers y Ramaekers, 2005; 2007).

En un estudio llevado a cabo en 466 consumidores regulares de éxtasis, se observó que el 83% de los participantes afirmó experimentar un estado de ánimo decaído, mientras que un 80% indicó problemas de concentración entre las sesiones de consumo del éxtasis (a media semana). Igualmente, algunos factores podrían modular estos efectos, como la edad, el género, el tiempo de consumo de la droga, y el uso conjunto de otras drogas como la cocaína y la anfetamina (Verheyden y cols., 2003). Se ha indicado que los consumidores de éxtasis podrían experimentar mayores efectos adversos residuales debido al deterioro de las

Efectos agudos

funciones serotoninérgicas relacionadas con la edad (Ricaurte y cols., 2000). Del mismo modo, la vulnerabilidad de estos sujetos a los efectos adversos de esta droga, podría aumentar en relación con el tiempo durante el cual se ha consumido la MDMA (Gouzoulis-Mayfrank y cols., 2000).

Al realizar un seguimiento en consumidores de éxtasis, se ha observado que estos individuos muestran un gran estado de ánimo cuando ellos están de marcha (*clubbing*). Sin embargo, estos sujetos muestran un notable decaimiento del estado de ánimo tan sólo 2 días después de haber consumido la droga (Parrott y Young, 2005). No se ha encontrado una correlación entre el estado de ánimo y la respuesta hipertérmica durante la fase de intoxicación aguda, pero si se ha observado que los consumidores que mostraron una mayor hipertermia, describieron sentirse más cansados y decaídos la semana posterior al consumo de la droga. Durante la fase de intoxicación los problemas de memoria podrían estar relacionados con la prevalencia del consumo del éxtasis, mas no así con la respuesta hipertérmica. Sin embargo, se ha demostrado que la hipertermia está asociada con los problemas de memoria observados a media semana (Parrott y Young, 2005).

Aunque no es habitual el consumo puro de la MDMA, en algunos sujetos que muestran este patrón, también aparecen considerables déficits neurocognitivos (Parrott, 2006). El consumo de esta droga con frecuencia se realiza en ambientes cálidos y con muchedumbre, como las *raves* o las discotecas. El baile prolongado, la sensación de calor, y el aumento de la temperatura corporal, también podrían relacionarse con una mayor incidencia de problemas psicobiológicos asociados al consumo del éxtasis (Parrott, 2006). Así, se ha observado que los consumidores del éxtasis que bailan con intensidad mientras se encuentran bajo los efectos de esta droga, muestran problemas de memoria más pronunciados que los consumidores que sólo bailaban de forma intermitente (Parrott y cols., 2006). Asimismo, el uso de la MDMA y el baile prolongado han sido asociados con síntomas de depresión, problemas de memoria, falta de concentración y de organización durante los días posteriores al consumo de la droga (Parrott y cols., 2006). Además, cuando estos sujetos manifestaron sentirse febriles durante la fase de intoxicación aguda, también

se observaron problemas de concentración y variaciones del estado de ánimo, así como también impulsividad durante el transcurso de la semana posterior al uso de la MDMA (Parrott y cols., 2006). Los problemas de memoria descritos a media semana, fueron correlacionados con la respuesta hipertérmica de la MDMA durante la fase aguda, es decir, se observó una mayor incidencia de trastornos cognitivos en proporción con la hipertermia inducida por esta droga (Parrott y cols., 2006). Cabe destacar que los problemas de memoria perduran al menos durante los 7 días posteriores al consumo de la droga, mientras que los trastornos afectivos alcanzan sus niveles más altos dos o tres días después del consumo de éxtasis, para retornar a la normalidad llegado el fin de semana (Parrott y Lasky, 1998). Por otro lado, es posible que estos efectos adversos, sean más pronunciados en los sujetos con una vulnerabilidad psiquiátrica (como una experiencia previa de depresión), ya que se ha observado que los consumidores regulares que muestran síntomas psiquiátricos intensos a media semana, presentaban habitualmente síntomas o características de predisposición previos al consumo de la droga (Parrott, 2006).

Por último indicar que Pacifi y cols., (2001) observaron que la administración de una dosis oral de MDMA (100 mg), produce una disfunción inmunitaria asociada con las concentraciones séricas de la droga, así como también una estimulación de la cinética del cortisol. El sistema inmunitario se recupera 24 horas después de la administración de la droga, pero si estos efectos sobre la homeostasis inmunológica se repitieran con frecuencia, podrían alterar la respuesta inmune del individuo con un riesgo para su salud en general (Pacifi y cols., 2001).

6.2. Efectos en animales de laboratorio

6.2.1. Efectos de la MDMA sobre la temperatura corporal

En animales de laboratorio, la MDMA muestra un efecto dual sobre la temperatura corporal, el cual, depende de las condiciones bajo las cuales se administra esta droga. Cuando se administra a ratas que están alojadas en condiciones “normales” de temperatura

Efectos agudos

(20-22°C), se produce una respuesta hipertérmica aguda que depende de la dosis empleada (Nash y cols., 1988; Schmidt y cols., 1990; Colado y cols., 1993; Dafters, 1994; Broening y cols., 1995; Malberg y cols., 1996; O'Shea y cols., 1998). El aumento de la temperatura ambiental favorece la respuesta hipertérmica de esta droga, mientras que un descenso de la temperatura ambiente causa el efecto opuesto, es decir, produce una respuesta hipotérmica (Malberg y Seiden, 1998).

Dafters (1994) observó que la administración de MDMA a una temperatura ambiente de 11°C, induce un descenso de la temperatura corporal dependiente de la dosis. Mientras que a 24°C, la exposición a esta sustancia produce hipertermia. Del mismo modo, se ha demostrado que la hipertermia podría producirse también a 22°C, mientras que la respuesta hipotérmica podría inducirse con una temperatura ambiental de 17°C. Por lo tanto, se ha sugerido que existe un punto de inflexión entre ambos efectos, que se encontraría a temperaturas cercanas a las que normalmente se alojan a los animales (Dafters y Lynch, 1998).

Por otra parte, la administración repetida de MDMA induce un aumento de la respuesta hipertérmica en animales alojados a 19°C, la cual, podría aumentar con el incremento de la temperatura ambiental hasta los 30°C (Green y cols., 2004a; Sanchez y cols., 2004). De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que la administración de múltiples dosis bajas de MDMA (3x2 mg/kg, cada 2 hrs durante 6 horas), induce una respuesta hipertérmica considerable tras la segunda y tercera inyección. La hipertermia producida por el tratamiento repetido con esta droga, es incluso mayor que la obtenida con una dosis única de 5 mg/kg (Green y cols., 2004a).

Los efectos de la MDMA sobre la temperatura corporal podrían depender de la edad de los animales empleados. Broening y cols., (1995) observaron que la MDMA induce un efecto hipotérmico en ratas de 40 o 70 días de edad, alojadas a una temperatura ambiente de 10°C, mientras que cuando estos animales fueron alojados a 25 o 33°C, se produjo una respuesta

hipertérmica. En contraste, cuando la droga fue administrada a ratas de 10 días de edad, no se observaron cambios en la temperatura corporal de los animales.

Mechan y cols., (2002b) demostraron que la temperatura del rabo de la rata no se modifica tras la administración de una dosis de MDMA, capaz de producir un aumento de la temperatura rectal. La dilatación de los vasos sanguíneos del rabo de la rata es el principal mecanismo mediante el cual estos animales liberan calor con la finalidad de regular su temperatura. Por lo tanto, la MDMA podría afectar los mecanismos implicados en la pérdida de calor corporal, permitiendo que una elevada temperatura ambiente interfiera con la capacidad de los animales para liberar calor. Asimismo, se ha observado que las ratas alojadas en una caja de plástico, muestran un efecto hipertérmico mayor que los animales alojados en cajas con piso de rejilla (Gordon y Fogelson, 1994). Gordon y cols., (1991) examinaron otros mecanismos de termorregulación mediante el análisis de la tasa metabólica, la pérdida del vapor de agua, y la temperatura rectal de ratas tratadas con MDMA, y alojadas a 10, 20, y 30°C. Estos autores observaron que la MDMA incrementa la tasa metabólica, así como también, aumenta la pérdida de vapor de agua en las ratas alojadas a 20 y 30°C. Al igual que otros estudios, Gordon y cols., (1991) demostraron que la administración de MDMA en ratas alojadas a 10°C produce un efecto hipotérmico, a 30°C se observa una respuesta hipertérmica, mientras que a 20°C no se observaron cambios en la temperatura corporal de estos animales.

El efecto hipertérmico de la MDMA podría estar asociado con el aumento en la liberación de 5-HT (Shankaran y Gudelsky, 1999). No obstante, se ha demostrado también que la liberación de DA juega un papel importante en la respuesta térmica inducida por la MDMA. De acuerdo con lo anterior, la fluoxetina inhibe la liberación de 5-HT inducida por la administración de la MDMA, pero no afecta la respuesta hipertérmica de esta sustancia en las ratas (Schmidt y cols., 1990; Berger y cols., 1992; Malberg y cols., 1996; Mechan y cols., 2002b). Por otro lado, la respuesta hipotérmica de la MDMA en ratas alojadas a 15°C puede ser bloqueada mediante la administración de remoxiprida, un antagonista de receptores D₂, mientras que el SCH 23390, un antagonista de los receptores

Efectos agudos

dopaminérgicos D₁, no la modifica (Green y cols., 2005). En contraste, la respuesta hipertérmica puede ser inhibida mediante la administración de SCH 23390, pero no es afectada por la remoxiprida (Mechan y cols., 2002b). Del mismo modo, Colado y cols., (1998) demostraron que el haloperidol bloquea la respuesta hipertérmica producida tras la administración de la MDMA en las ratas.

Los estudios llevados a cabo en ratones por lo general se basan en la administración de múltiples dosis de MDMA. Además, la cepa de los animales y las dosis empleadas podría influir en la potencia y en la dirección de la respuesta térmica. Se ha observado que los ratones C57BL/6J exhiben un aumento de la temperatura corporal tras la administración repetida de 20 mg/kg de MDMA (Johnson y cols., 2000; 2002b; Miller y O'Callaghan, 1994). Sin embargo, los ratones Swiss Webster muestran una respuesta bifásica con la administración repetida de MDMA. En estos animales, la respuesta hipotérmica predomina tras la administración repetida de 10 mg/kg de MDMA, mientras que la administración repetida de 30 mg/kg de esta droga, induce en primer lugar una respuesta hipertérmica, y posteriormente se observa un efecto hipotérmico (O'Shea y cols., 2001). Los ratones NIH/Swiss exhiben una respuesta hipertérmica dependiente de la dosis tras la administración repetida de MDMA (Colado y cols., 2001). En los ratones Charles River, la administración de una dosis única de 5, 10 o 20 mg/kg de MDMA induce un aumento dependiente de la dosis de la temperatura corporal (Carvalho y cols., 2002). Por el contrario, los ratones BALB/c expuestos a la MDMA, muestran una respuesta hipotérmica prolongada dependiente de la dosis (Johnson y cols., 2002a).

Al parecer, el sistema dopaminérgico no está implicado en el mecanismo de acción de la MDMA sobre los cambios de la temperatura corporal de los ratones, ya que se ha observado que el tratamiento previo con el GBR 12909, no modifica la respuesta térmica de la MDMA en estos animales (O'Shea y cols., 2001; Camarero y cols., 2002). En contraste, la administración previa de fluoxetina impide el aumento de la temperatura corporal inducido por la MDMA en estos animales, pero no en las ratas. Por lo tanto, es posible que

el sistema serotoninérgico participe, al menos en parte, en la respuesta hipertérmica inducida por la MDMA en los ratones (O'Shea y cols., 2001; Mechan y cols., 2002b).

Aunque se ha sugerido que el aumento de la actividad locomotora y la respuesta hipertérmica inducidas por la MDMA podrían estar relacionados, se ha demostrado que existe una disociación entre ambos efectos. Dafters (1994) observó que no se producen cambios en la hiperactividad de ratas que han sido alojadas 24 h antes, y/o después, del tratamiento con la MDMA a una temperatura ambiente de 11°C, mientras que la temperatura corporal de estos animales disminuye o casi no muestra cambios. A una elevada temperatura ambiente, una condición que como ya se ha mencionado anteriormente potencia la respuesta hipertérmica de la MDMA, esta droga no modifica la actividad locomotora en las ratas (Dafters, 1995). Igualmente, se ha demostrado que la administración de 5 mg/kg de MDMA produce un incremento de la actividad locomotora a una temperatura de 20°C, pero no induce una respuesta hipertérmica. Sin embargo, a una temperatura ambiental de 30°, la misma dosis induce una respuesta hipertérmica considerable, pero no produce cambios en la actividad locomotora absoluta cuando los datos son comparados con animales alojados a una temperatura normal (O'Shea y cols., 2005). Los resultados anteriormente descritos han sido confirmados por un estudio reciente donde se ha observado que la respuesta hipertérmica producida por la MDMA en el mono Rhesus, no depende de los efectos estimulantes de esta droga sobre la actividad motora (Crean y cols., 2006).

6.2.2. Efectos de la MDMA sobre la conducta

Por razones éticas, la investigación sobre los efectos de la MDMA se basa principalmente en estudios llevados a cabo mediante modelos animales. En este apartado describiremos cuales son los efectos conductuales de la MDMA observados comúnmente tanto en ratas como en ratones. Al ser un compuesto que afecta especialmente a los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico, la MDMA tiene un impacto agudo importante sobre diversas conductas, como la actividad locomotora, la ansiedad, y el refuerzo.

6.2.2.1. Actividad locomotora

En las ratas, la MDMA aumenta considerablemente la actividad locomotora durante 6 h, donde los efectos máximos inducidos por esta droga se observan entre la segunda y la cuarta hora posteriores a su administración (Balogh y cols., 2004; Cassel y cols., 2004). La administración previa de fluoxetina, sertralina, y zimelidina (inhibidores de la recaptación de 5-HT), así como también, la reducción previa de la concentración de 5-HT mediante la administración de *p*-clorofenilalanina, bloquean el aumento de la actividad locomotora producido por la MDMA. Por lo tanto, se ha sugerido que la estimulación motora inducida por esta droga es modulada por mecanismos que dependen de la liberación de 5-HT (Callaway y cols., 1990).

Algunas investigaciones han sugerido que diversos receptores serotoninérgicos contribuyen a los efectos motores inducidos por esta droga (Kehne y cols., 1996; McCreary y cols., 1999; Bankson y Cunningham, 2001; Fletcher y cols., 2002; Herin y cols., 2005). El tratamiento previo con el MDL 100907 reduce la respuesta motora inducida por la MDMA, lo que sugiere que los receptores 5-HT_{2A} participan en la estimulación motora inducida por esta droga (Kehne y cols., 1996). Igualmente, mediante el empleo del mismo antagonista serotoninérgico, se ha demostrado que los receptores 5-HT_{2A} contribuyen con la hiperactividad periférica (tigmotaxis) y la exploración vertical (“*rearings*”) inducidas por la MDMA en las ratas (Herin y cols., 2005).

Otros estudios han indicado que la activación de los receptores 5-HT_{1B/1D} además de los 5-HT_{2A}, favorece el aumento de la actividad motora inducido por la MDMA (McCreary y cols., 1999; Fletcher y cols., 2002). En esta línea, los efectos motores de la MDMA pueden ser atenuados por la administración del GR 127935 o de kentanserina (antagonistas serotoninérgicos 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} respectivamente), lo que indica que la estimulación motora producida por esta droga podría ser modulada por los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2A} (McCreary y cols., 1999; Fletcher y cols., 2002). Además, se ha observado que los ratones KO 5-HT_{1B} muestran una respuesta motora menor tras la administración de la MDMA, lo

que indica que los efectos locomotores inducidos por esta droga dependen, al menos en parte, de estos receptores serotoninérgicos (Scearce-Levie y cols., 1999). Sin embargo, la MDMA también elimina la conducta exploratoria en ambos tipos de ratón, lo que sugiere que este efecto es resultado de mecanismos independientes de la activación de los receptores 5-HT_{1B} (Scearce-Levie y cols., 1999). Estos efectos fueron confirmados mediante la administración previa del GR 127935 en los ratones *wild type* (WT), ya que este compuesto serotoninérgico atenúa la actividad motora, pero no la conducta exploratoria, tras la inyección de la MDMA en estos animales (Scearce-Levie y cols., 1999).

La activación de los receptores 5-HT_{1B} conduce a una reducción de los niveles de encefalina en el “*globus pallidus*”. Además, la administración de naloxona (antagonista opiáceo) suprime los efectos motores de la MDMA. Por lo tanto, se ha sugerido que las encefalinas contribuyen al incremento de la actividad locomotora inducida por la MDMA, quizás como resultado del control serotoninérgico sobre la concentración de encefalinas en el *globus pallidus*, vía receptores 5-HT_{1B} (Compan y cols., 2003).

En contraste, los receptores 5-HT_{2C} modulan la función dopaminérgica mesolímbica y la expresión de conductas que dependen de la DA (como la hiperactividad inducida por los psicoestimulantes). No obstante, estos receptores también podrían estar implicados en la locomoción inducida por drogas que dependen de la 5-HT (Fletcher y cols., 2006). De acuerdo con lo anterior, se ha observado que el SB 242084 (antagonista de los receptores 5-HT_{2C}) favorece la hiperactividad locomotora producida por la MDMA (McCreary y cols., 1999; Bankson y Cunningham, 2002; Fletcher y cols., 2002; 2006), lo que sugiere que la activación de los receptores 5-HT_{2C} inhibe los efectos estimulantes motores de la MDMA (Bankson y Cunningham, 2002). Recientemente se ha demostrado que el SB242084 no solo potencia la hiperactividad inducida por la MDMA, sino también la de otros compuestos que actúan como agonistas indirectos dopaminérgicos y serotoninérgicos (Fletcher y cols., 2006). Esta potenciación de la actividad motora podría por tanto, implicar dos mecanismos diferentes: el primero involucraría un aumento directo de la actividad dopaminérgica,

Efectos agudos

mientras que el segundo, quizás sea consecuencia de la activación de receptores serotoninérgicos estimulantes (posiblemente los receptores 5-HT_{1B/2A}), mediante el bloqueo de los receptores inhibitorios 5-HT_{2C} (Fletcher y cols., 2006).

Por otro lado, la administración previa del SR-463449B (antagonista de los receptores 5-HT_{2A}) bloquea casi por completo la excitación neuronal del estriado, y atenúa considerablemente la activación motora inducida por la administración de la MDMA vía sistémica (Ball y Rebec, 2005). En contraste, la administración del SB 206553 (antagonista de los receptores 5-HT_{2C}) no afecta la estimulación motora o la excitación neuronal de esta estructura cerebral. Por lo tanto, se sugiere que los receptores 5-HT_{2A} y los 5-HT_{2C/2B} modulan, mediante distintos mecanismos, la expresión de las respuestas conductual y neuronal del estriado, de forma directa o mediante la modulación de la transmisión dopaminérgica (Ball y Rebec, 2005).

La hiperactividad inducida por la MDMA es un efecto complejo en términos neuroquímicos, ya que sin duda además de componentes serotoninérgicos, también participan mecanismos dopaminérgicos. En las ratas, se ha observado que la hiperactividad inducida por la MDMA puede ser atenuada, de forma dependiente de la dosis, mediante el tratamiento previo con el SCH 23390 (Daniela y cols., 2004). Bubar y cols., (2004) confirmaron que la administración previa del SCH 23390, así como también, de la eticlopride (antagonista de los receptores D₂), bloquean la hiperactividad locomotora inducida por la MDMA de forma dependiente de la dosis. Por tal motivo, estos datos sugieren que el aumento de la actividad motora producido por la MDMA, es modulado también por la activación de los receptores dopaminérgicos D₁ y D₂, posiblemente por la DA que se libera tras la administración de esta droga (Bubar y cols., 2004).

Con el objetivo de determinar la forma en la que el estriado participa en la activación locomotora producida por la MDMA, Ball y cols., (2003) registraron la actividad neuronal de esta estructura cerebral en ratas en libre movimiento, tras la administración de 5 mg/kg de esta droga. De esta forma, estos autores observaron que la MDMA produce un efecto

excitatorio sobre la actividad neuronal del estriado, la cual, fue correlacionada con la magnitud de la activación locomotora. Además, la administración previa del SCH 23390 retarda la activación motora inducida por la MDMA, lo cual, fue correlacionado con un retardo de la excitación neuronal del estriado (Ball y cols., 2003). En contraste, la administración de eticlopride neutraliza la estimulación motora producida por la MDMA, así como también, la excitación neuronal en esta estructura cerebral. Por lo tanto, Ball y cols., (2003) han indicado que la actividad neuronal del estriado modula la respuesta conductual motora de la MDMA, y sugieren que los receptores D₁ y D₂ cuentan con distintos papeles en la expresión de la activación neuronal estriatal y motora inducidas por esta droga.

Los efectos motores producidos por la MDMA también se han observado en los ratones KO D₁, D₂ y D₃, lo que apoyaría la importancia de otros mecanismos, como el serotoninérgico, en la estimulación locomotora inducida por esta droga en estos animales. Sin embargo, estos receptores dopaminérgicos son capaces de aumentar la hiperactividad inducida por la MDMA, en especial los D₁ y los D₂ (Risbrough y cols., 2006). En esta línea, la activación de los receptores D₁ modifican el tipo de actividad (linear vs circunscrita), mientras que la activación de los receptores D₂ podría contribuir a la tigmotaxis producida por la MDMA. Por lo tanto, estas alteraciones de los patrones locomotores en consecuencia aumentan la actividad motora total, evaluada mediante la distancia recorrida durante la prueba (Risbrough y cols., 2006).

Otros receptores también han sido implicados en la estimulación motora inducida por la MDMA. Por ejemplo, los receptores cannabinoides CB₁ participan, al menos en parte, en los efectos agudos de la MDMA, ya que se ha informado que el tratamiento agudo con esta droga incrementa la actividad locomotora en los ratones WT, pero en los ratones KO CB₁ esta respuesta se atenúa (Touriño y cols., 2008). Asimismo, se ha demostrado que el CP 55940 y el THC (agonistas cannabinoides) reducen la hiperactividad locomotora inducida por la MDMA (Morley y cols., 2004). Sin embargo, se ha observado que la administración de rimonabant (antagonista cannabinoide CB₁) no modifica la hiperlocomoción producida

Efectos agudos

por la MDMA (Tourinho y cols., 2007). Igualmente, se ha observado que los efectos estimulantes motores de la MDMA pueden ser bloqueados por el SL327, un inhibidor selectivo de la activación de la proteína kinasa ERK en los ratones CD1 (Salzmann y cols., 2003).

Algunos factores ajenos a la droga podrían influir en la hiperactividad producida por la MDMA. De acuerdo con lo anterior, las ratas Fisher 344 y Lewis muestran respuestas conductuales heterogéneas a la MDMA. Además, a pesar de que estas dos cepas muestran diferentes niveles basales en la actividad locomotora (Fisher>Lewis), la administración de 10 mg/kg, pero no de 5 mg/kg, de MDMA sólo incrementa la actividad en las ratas Fisher (Fernandez y cols., 2003).

Por otro lado, en las ratas se ha demostrado un dimorfismo sexual a los efectos motores inducidos por la MDMA. Las ratas hembras de la cepa Wistar, son más sensibles a los efectos estimulantes motores de esta droga, y también muestran un incremento de la tigmotaxis (Palenicek y cols., 2005). Walker y cols., (2007) observaron que la MDMA produce una activación locomotora más pronunciada en las ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley, en comparación con las ratas machos. Asimismo, estos autores informaron que la respuesta motora inducida por la MDMA no se afecta tras la administración repetida de esta droga (2x15 mg/kg/día, durante cuatro días consecutivos), pero que si se produce una sensibilización a una dosis *challenge* de esta misma droga tras dos semanas de haber finalizado el tratamiento (Walker y cols., 2007).

6.2.2.2. Ansiedad

Los efectos agudos de la MDMA sobre la ansiedad en animales de laboratorios son inciertos, ya que algunos autores han observado que dosis medias o altas de esta sustancia inducen un efecto ansiogénico en ratas sometidas a la prueba del laberinto elevado en forma de cruz (*plus maze*, LEC) y a la prueba de interacción social (Bhattacharya y cols., 1998). No obstante, Morley y McGregor (2000) observaron que la MDMA produce diversos

efectos en una batería de pruebas conductuales empleadas en el análisis de la ansiedad. Así, estos autores determinaron que la MDMA (1.25-5 mg/kg) induce un efecto ansiogénico en ratas expuestas a las pruebas de emergencia, el LEC, y en la prueba de evitación del olor de un gato. Mientras que esta misma sustancia al parecer, induce un efecto ansiolítico en la prueba de interacción social, y en la evaluación de las vocalizaciones ultrasónicas inducidas por una descarga eléctrica en las patas de los animales (Morley y McGregor, 2000).

Laberinto elevado en cruz. La MDMA es capaz de producir un efecto ansiogénico a dosis bajas, mientras que a dosis altas induce un efecto ansiolítico. La potencia de la MDMA como una sustancia ansiogénica es parecida a la amfetamina, aunque por lo general sus efectos son más débiles en algunas pruebas conductuales (Paulus y Geyer, 1991; Lin y cols., 1993; 1999).

En el LEC, algunos autores han descrito que la MDMA muestra un perfil ansiogénico en ratas (Bhattacharya y cols., 1998; Morley y McGregor, 2000) y ratones (Lin y cols., 1999). Sin embargo, y como se verá más adelante, los efectos de la MDMA sobre la ansiedad de los animales dependen especialmente de la dosis empleada. Así, se ha observado que a dosis bajas, la MDMA induce un aumento de la ansiedad, mientras que a dosis altas, induce un efecto ansiolítico.

Lin y cols., (1999) observaron que la MDMA induce diferentes efectos en ratones sometidos al LEC. Estos autores demostraron que dosis de 1 a 4 mg/kg de esta droga no modifican, o aumentan la ansiedad (respectivamente) de los animales sometidos a esta prueba conductual. Por el contrario, la administración de una dosis alta de MDMA (20 mg/kg) induce un efecto ansiolítico. Por lo tanto, Lin y cols., (1999) han sugerido que la MDMA posee propiedades duales farmacológicas, las cuales, son capaces de activar mecanismos neurales excitatorios e inhibitorios implicados en la modulación de la ansiedad. Además, estos investigadores han sugerido que 12 mg/kg de MDMA podría ser una dosis transitoria entre el efecto ansiolítico y el efecto ansiogénico de esta droga en el LEC.

Efectos agudos

De acuerdo con lo anterior, se ha demostrado que el tratamiento agudo con MDMA (8 mg/kg) en ratones, disminuye significativamente el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del LEC, y aumenta considerablemente el número de entradas en los brazos cerrados y en el área central (Navarro y Maldonado, 2002). Asimismo, el tratamiento subcrónico con la MDMA (1 y 8 mg/kg, durante 5 días consecutivos) disminuye el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, y aumenta la estancia de estos animales en los brazos cerrados y en el área central en el LEC (Navarro y Maldonado, 2002). Estos resultados indican que la administración prolongada a la MDMA induce una respuesta ansiogénica. Por ello, se ha sugerido que los efectos ansiogénicos de la MDMA encontrados tras la administración aguda, no solo se mantienen, sino que son más marcados tras el tratamiento subcrónico. De hecho, este efecto conductual puede observarse incluso con una dosis muy baja de MDMA (1 mg/kg). Además, la ausencia de tolerancia a los efectos ansiogénicos ha sido descrita también en encuentros agonísticos tras la administración subcrónica de MDMA (2.5 y 5 mg/kg) en ratones (Navarro y Maldonado, 2002).

En contraste, los ratones tratados subcrónicamente con 15 mg/kg de MDMA muestran un mayor tiempo de permanencia en los brazos abiertos, así como también una disminución considerable de la estancia de estos animales en los brazos cerrados del LEC. Estos resultados sugieren que el tratamiento subcrónico con dosis altas de MDMA, induce un efecto ansiolítico que no se observa con la administración aguda de la droga (Navarro y Maldonado, 2002).

Por otra parte, Ho y cols., (2004) demostraron que la MDMA induce efectos agudos, dependientes de la dosis, en ratas sometidas al LEC elevado. Estos investigadores observaron que 7.5 mg/kg de MDMA inducen un efecto ansiogénico en esta prueba conductual, ya que esta dosis aumentó las latencias de entrada a los brazos abiertos, y disminuyó el tiempo de permanencia en estos brazos. Mientras que una dosis de 15 mg/kg de MDMA produce, al parecer, un efecto ansiolítico caracterizado por un aumento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto.

Interacción social. Los resultados obtenidos sobre los efectos de la MDMA en la prueba de la interacción social pueden depender de diversos factores, como la manipulación de los animales, las condiciones bajo las cuales se realiza la prueba (iluminación, ruido, temperatura), el intervalo entre la inyección de la droga y las sesiones experimentales, así como también de la especie y la cepa de los animales empleados (File y Seth, 2003; Morley y cols., 2005). Asimismo, los factores ambientales como la habituación al aparato de prueba o el ruido producido durante el alojamiento, podrían afectar los resultados en la interacción social (File y Seth, 2003).

La interacción social es un modelo animal empleado en el estudio de la ansiedad, y evalúa las fuentes etológicamente relevantes de esta conducta (File y Seth, 2003). Su variable dependiente es el tiempo que pasa una pareja de roedores interactuando socialmente (por ejemplo olfateo, seguimiento, o acicalar al co-específico) (File y Seth, 2003). Se sugiere que un aumento de la interacción social, sin un concomitante incremento en la actividad motora, es señal de un efecto ansiolítico, mientras que un decremento específico de la de interacción social es un indicador de un efecto ansiogénico (File y Seth, 2003). Como ya hemos mencionado, las condiciones de la prueba pueden ser manipuladas, y por tanto, podrían generar diferentes niveles de ansiedad, modificando los resultados obtenidos en este modelo animal. Se ha descrito que en la prueba de interacción social existen cuatro condiciones a tener en cuenta: (1) luz baja y arena familiar generan un nivel bajo de ansiedad; (2) luz alta y arena familiar, así como también, (3) luz baja y arena no familiar, generan niveles moderados de ansiedad; (4) luz alta y arena no familiar generan los más altos niveles de ansiedad (File y Seth, 2003). Ya que este modelo animal es capaz de detectar tanto un incremento como un decremento de la ansiedad, es ampliamente utilizado en la criba de compuestos ansiogénicos y ansiolíticos de una forma rápida y sencilla, así como también, en el estudio de los mecanismos neurobiológicos que subyacen los trastornos de la ansiedad (File y Seth, 2003).

Los efectos de la MDMA en la prueba de interacción social no han sido consistentes, ya que se ha descrito que esta sustancia aumenta (Bhattacharya y cols., 1998; Maldonado y

Efectos agudos

Navarro, 2000; 2001) o disminuye (Morley y McGregor, 2000; Cornish y cols., 2003; Morley y cols., 2005) la ansiedad de animales sometidos a esta prueba. Estas diferencias sobre los efectos de la MDMA sobre la ansiedad podrían estar relacionadas, al menos en parte, al hecho de que esta droga muestra diferentes interacciones con los sistemas monoaminérgicos del ratón, en comparación con otras especies como las ratas y los primates (Stone y cols., 1987a; Mehan y cols., 2002a; 2002c).

En ratones, algunos elementos conductuales como la investigación social, la exploración, la evitación/huída, y la defensa/sumisión, han sido empleados habitualmente para determinar los efectos de las drogas sobre la ansiedad en la prueba de interacción social (Brain y cols., 1991; Rodgers, 1997). Se ha demostrado que la MDMA (5-20 mg/kg) disminuye considerablemente las conductas ofensivas (amenaza y ataque), y no afecta la inmovilidad de ratones OF1 adultos que han sido aislados (Navarro y Maldonado, 1999; Maldonado y Navarro, 2001). Sin embargo, esta droga también disminuye la investigación social, y aumenta las conductas de exploración a distancia, evitación/huída y defensa/sumisión. Por lo tanto, este perfil etofarmacológico sugiere que la MDMA induce un efecto ansiogénico en estos animales (Navarro y Maldonado, 1999; Maldonado y Navarro, 2001).

Por otra parte, el efecto ansiogénico inducido por la MDMA se caracteriza especialmente por una disminución de la actividad exploratoria (Maldonado y Navarro, 2000). La administración de 8 o 15 mg/kg de MDMA disminuye la conducta exploratoria en ratones adolescentes en la prueba de luz/oscuridad, principalmente los *rearings* (exploración vertical). Este perfil conductual también sugiere que la MDMA induce un efecto ansiogénico. Sin embargo, el tiempo de permanencia en el área iluminada, un parámetro clásico empleado para evaluar los cambios de ansiedad en esta prueba, no es afectado de forma significativa debido quizás, a la acción anti-exploratoria de la MDMA. Por lo tanto, es posible que los modelos animales de ansiedad que resalten la conducta social de los animales, sean más sensibles a los efectos de esta droga (Maldonado y Navarro, 2000).

Los mecanismos que modulan los efectos de la MDMA sobre la ansiedad son desconocidos. Sin embargo, se ha propuesto que la liberación masiva y prolongada de 5-HT, y el aumento de la actividad dopaminérgica, podrían ser los componentes responsables de los efectos ansiogénicos de esta sustancia, especialmente a altas dosis (Maldonado y Navarro, 2001). De hecho, algunos estudios apoyan la teoría de que los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico están implicados en la modulación de la ansiedad (Graeff, 1997; Graeff y cols., 1997; Menard y Treit, 1999; Navarro y Maldonado, 1999). Los efectos de esta droga sobre la conducta social y la ansiedad podrían ser consecuencia de la estimulación indirecta de los receptores serotoninérgicos, producida como resultado del incremento de los niveles sinápticos de 5-HT vía acción de la MDMA sobre el SERT (Rudnick y Wall, 1992). Morley y cols., (2005) intentaron determinar el efecto de varios antagonistas de receptores serotoninérgicos sobre los efectos conductuales agudos de la MDMA en ratas. Los autores observaron que el WAY 100635 (antagonista de los receptores 5-HT_{1A}) es capaz de prevenir los efectos pro-sociales de la MDMA en la prueba de la interacción social. Mientras que en la prueba de emergencia, la administración previa de varios antagonistas de los receptores serotoninérgicos (5-HT_{2A}, 5-HT_{1B}, 5HT_{1A}, 5HT_{2B/2C}), no modifica la ansiedad de los animales (Morley y cols., 2005). Por lo tanto, los autores concluyeron que la MDMA muestra una actividad bifásica caracterizada por un aparente efecto pro-social ansiolítico en la prueba de interacción social, y un claro efecto ansiogénico en la prueba de emergencia. Asimismo, sugirieron que los receptores 5-HT_{1A} modulan, al menos en parte, los efectos pro-sociales de la MDMA.

Los compuestos serotoninérgicos con diferentes mecanismos de acción son capaces de afectar las conductas agresivas en los ratones aislados (Olivier y Mos, 1992; Cologer-Clifford y cols., 1997). Miczek y Haney (1994) examinaron los efectos de la MDMA sobre la conducta agresiva mediante el empleo del paradigma del intruso/residente, y observaron que esta droga disminuye de forma dependiente de la dosis los ataques de los ratones adultos de la cepa CFW.

Efectos agudos

Por último, se ha demostrado que el aumento de la temperatura ambiente potencia los efectos pro-sociales de la MDMA. Cornish y cols., (2003) estudiaron la influencia de una alta temperatura ambiente sobre los efectos agudos sociales de la MDMA en las ratas. Estos autores observaron que la MDMA (5 mg/kg) induce un incremento considerable de la interacción social en estos animales a 21°C, pero este efecto fue significativamente mayor a una temperatura de 30°C. Por lo tanto, estos autores han sugerido que el aumento de la temperatura podría acentuar los efectos sociales de la droga, lo cual, podría favorecer su consumo.

6.2.2.3. Memoria

En diferentes modelos animales de aprendizaje y memoria, el tratamiento agudo con MDMA produce déficits en el aprendizaje que han sido relacionados o no, con los efectos neurotóxicos de la droga sobre las terminales serotoninérgicas, y el posterior decremento de la concentración de serotonina (Ricaurte y cols., 1993; Byrne y cols., 2000; Taffe y cols., 2002; Sprague y cols., 2003; Moyano y cols., 2004). En las ratas, la administración aguda de MDMA o MDEA, antes de la fase de adquisición en la prueba de evitación pasiva, afecta la prueba de retención realizada 24 horas después de haber dado el tratamiento (Barrionuevo y cols., 2000; Moyano y cols., 2004). Igualmente, la administración de MDMA 30 minutos antes de la sesión de adquisición, en ratas cuyas concentraciones de 5-HT han sido reducidas mediante el tratamiento previo con la misma droga, induce un efecto amnésico similar al observado en ratas con niveles normales de este neurotransmisor (Barrionuevo y cols., 2000; Moyano y cols., 2004).

Recientemente, Trigo y cols., (2008) evaluaron los efectos de diferentes tratamientos de la MDMA, sobre la capacidad de los ratones para aprender y recordar una tarea de evitación activa. Estos investigadores observaron que la exposición aguda a la MDMA durante los 4 días de entrenamiento, favorece el desempeño de la evitación activa en ratones. Sin embargo, estos efectos fueron dependientes de estado, ya que no se observaron cuando estos animales fueron evaluados en condiciones libres de droga, excepto al 5 día, cuando se

observó que los ratones tratados con 30 mg/kg de MDMA mostraron un desempeño deficiente en esta prueba. En contraste, el tratamiento previo y repetido con la MDMA, interfiere de forma dependiente de la dosis el aprendizaje de la evitación activa, y afecta el recuerdo de esta tarea. Los resultados anteriores indican que la MDMA podría tener efectos duraderos sobre los procesos cognitivos, de tal modo que la exposición a dosis altas y bajas de MDMA, afecta el recuerdo en la prueba de evitación activa, mientras que sólo las dosis altas perjudican la adquisición en esta prueba. Por lo tanto, Trigo y cols., (2008) han sugerido que la MDMA aguda, es capaz de interferir con la adquisición de la evitación activa, y con la ejecución de una tarea previamente aprendida en ratones. Asimismo, el tratamiento repetido con esta droga, reduce la adquisición de la evitación activa y perjudica el recuerdo de esta tarea. Además, estos investigadores destacan que incluso a dosis bajas, la MDMA puede producir déficits en la consolidación de nueva información.

6.2.2.4. Efectos reforzantes

La administración sistémica de la MDMA, incrementa los niveles extracelulares de DA y de 5-HT en áreas cerebrales mesolímbicas como el NAcc (Yamamoto y Spanos, 1988; Marona-Lewicka y cols., 1996; Kankaanpaa y cols., 1998). Asimismo, el NAcc modula las propiedades motivacionales incentivas de muchas de las drogas de abuso, y mediante paradigmas apropiados se han demostrado las propiedades reforzantes de la MDMA. Estas propiedades se han observado en monos (Beardsley y cols., 1986; Fantegrossi y cols., 2002; Lamb y Griffiths, 1987; Lile y cols., 2005), en ratas (Bilsky y cols., 1991; Ratzenboeck y cols., 2001; Schenk y cols., 2003), y en ratones (Robledo y cols., 2004a; 2004b; Salzman y cols., 2003; Trigo y cols., 2006) mediante el empleo de diferentes paradigmas, tales como la AA intravenosa, el CPL, y la auto-estimulación eléctrica intracraneal (Beardsley y cols., 1986; Lamb y Griffiths, 1987; Hubner y cols., 1988; Marona-Lewicka y cols., 1996; Lin y cols., 1997b).

Los efectos reforzantes de la MDMA han sido estudiados en los monos Rhesus mediante el modelo de la AA. La MDMA y sus estereoisómeros actúan como reforzadores, pero

Efectos agudos

inducen una curva dosis-respuesta en forma de campana, e incluso, el efecto de esta droga es más débil que el de la cocaína o la metanfetamina. Asimismo, los efectos reforzantes de la MDMA pueden ser bloqueados por la administración de ketanserina o del MDL 100907, lo que sugiere un papel integral de los receptores 5-HT₂ en la respuesta reforzante a esta droga (Fantegrossi y cols., 2002).

En ratones, se ha observado que la tasa de respuesta en la AA es inversamente proporcional a la dosis de MDMA empleada. A diferencia de otros psicoestimulantes como la cocaína, la AA de MDMA muestra una curva dosis-efecto en U invertida, donde las dosis de 0.125 y 1.0 mg/kg/infusión muestran la más alta y la más baja tasa de respuesta, respectivamente. Sin embargo, inesperadamente, el número de sesiones requeridas para alcanzar los criterios de adquisición es mayor en los ratones que responden a la dosis más alta (1.0 mg/kg/infusión), en comparación con aquellos animales que responden a las dosis intermedias (0.125 y 0.25 mg/kg/infusión). Además, el porcentaje de ratones que adquieren una estabilidad es menor para las dosis más altas, que para las dosis intermedias de MDMA (Trigo y cols., 2006).

En las ratas, la administración de MDMA desarrolla una respuesta dependiente de la dosis en el CPL (Marona-Lewicka y cols., 1996; Bilsky y Reid, 1991; Bilsky y cols., 1991; Schechter, 1991). El CPL permite evaluar la conducta apetitiva de las drogas de abuso. Este modelo permite al animal asociar señales contextuales con una sensación positiva o negativa producida por una droga. Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante este paradigma han permitido confirmar las propiedades reforzantes de la MDMA.

La capacidad de la MDMA para aumentar los niveles de DA en el NAcc (Yamamoto y Spanos, 1988; Marona-Lewicka y cols., 1996; White y cols., 1996; Camarero y cols., 2002; Robledo y cols., 2004b; Cadoni y cols., 2005), junto con los estudios conductuales que demuestran la implicación del sistema dopaminérgico en el CPL (Bilsky y cols., 1998) y la AA intravenosa (Daniela y cols., 2004) de la MDMA, apoyan las observaciones de que la activación del sistema dopaminérgico juega un papel fundamental en las propiedades

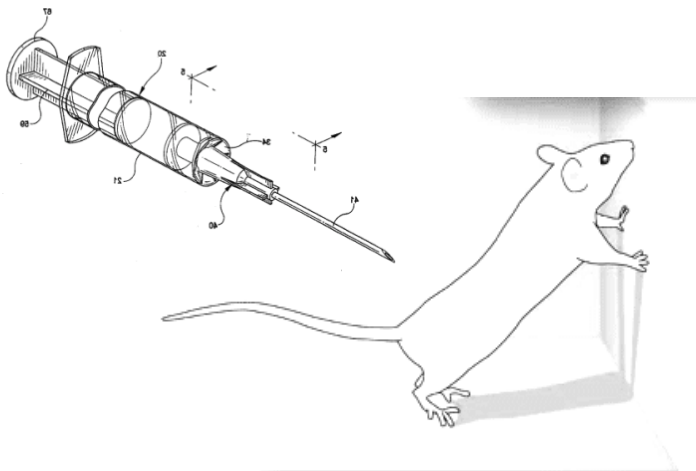
recompensantes/reforzantes de esta droga. Se ha demostrado que bajas dosis de MDMA (5 y 10 mg/kg), incrementan las concentraciones de dopamina y reducen los niveles del DOPAC en el NAcc.

Por otra parte, el sistema serotoninérgico también podría estar implicado en la modulación de las propiedades recompensantes y estimulantes de la MDMA, a través de mecanismos directos ó indirectos. La liberación de DA en el ATV podría favorecerse mediante la actividad serotoninérgica, ya que la 5-HT podría actuar de forma indirecta a través de mecanismos gabaérgicos (Kalivas, 1993; Prisco y cols., 1994; Trifunovic y Brodie, 1996). Asimismo, varios subtipos de receptores serotoninérgicos modulan la liberación de DA en el NAcc y el estriado (Benloucif y Galloway, 1991; Chen y cols., 1991; Benloucif y cols., 1993; Parsons y Justice, 1993; De Deurwaerdere y cols., 1997; Lucas y cols., 1997). Mediante el empleo de la AA intravenosa, se ha demostrado que los receptores 5-HT₂ participan en los efectos reforzantes de la MDMA en los monos (Fantegrossi y cols., 2002). Además, la administración de MDL72222, un antagonista de los receptores 5-HT₃, bloquea la adquisición del CPL inducido por la MDMA en las ratas (Bilsky y Reid, 1991). En estudios de discriminación de drogas, algunas dosis de la MDMA semejan a algunos compuestos serotoninérgicamente activos, tales como fenfluramina y norfenfluramina (Schechter, 1997; Goodwin y cols., 2003). Por otro lado, se ha observado que la MDMA incrementa la liberación de DA en el NAcc de ratones WT y KO SERT (Trigo y cols., 2007). En estudios de AA, los ratones WT entrenados a auto-administrarse MDMA a diferentes dosis (0, 0.03, 0.06, 0.125 y 0.25 mg/kg/infusión) adquieren y mantienen altas tasas de respuesta con la dosis media (0.06 mg/kg/infusión), mientras que los ratones KO SERT son incapaces de adquirir la AA intravenosa de MDMA (Trigo y cols., 2007). Igualmente, los cambios inducidos por la MDMA en los niveles de 5-HT en la CPF son menores en estos animales. Por lo tanto, se ha sugerido que el sistema serotoninérgico participa, al menos en parte, en los efectos recompensantes de la MDMA (Trigo y cols., 2007).

Efectos agudos

En el paradigma de la AA intravenosa, se ha demostrado que una elevada temperatura ambiente (30°C) incrementa el número de infusiones de MDMA (0.1, 0.3 o 1 mg/kg/infusión) auto-administradas por las ratas (Cornish y cols., 2003). Con la intención de evaluar si el consumo de la MDMA era modificado por la temperatura ambiente, Cornish y cols., (2003) entrenaron ratas para que se auto-administraran esta droga por vía intravenosa, en sesiones diarias de 2 horas a 21 °C mediante un protocolo FR1, en cámaras operantes equipadas con dos palancas retráctiles. Cuando estos animales presionaban una palanca (activa) recibían una infusión de MDMA, mientras que al presionar la segunda palanca (inactiva) no se producía ninguna respuesta. De esta forma, se observó que la MDMA mantenía bajas tasas de AA, y una vez que se estableció la respuesta para una dosis particular, las sesiones de prueba fueron realizadas a una temperatura ambiente de 30°C. Así, Cornish y cols., (2003) observaron que a una elevada temperatura ambiente, los animales se auto-administraban más MDMA, mientras que las respuestas para la palanca inactiva no fueron afectadas de forma significativa por el cambio de temperatura. Estos resultados sugieren que los efectos reforzantes de la MDMA se favorecen con una elevada temperatura ambiente. Por lo tanto, se ha sugerido que quizás no sea una coincidencia que la MDMA sea consumida por los seres humanos regularmente en condiciones calurosas, ya que una elevada temperatura ambiente podría acentuar los efectos placenteros de esta droga y potenciar su consumo (Cornish y cols., 2003).

Efectos a largo plazo de la MDMA



7. EFECTOS A LARGO PLAZO DE LA MDMA

7.1. Efectos en los seres humanos

Los daños de la función serotoninérgica producidos por la MDMA han sido demostrados en animales de laboratorio. Del mismo modo, algunas disfunciones relacionadas con este sistema de neurotransmisión han sido observadas en consumidores crónicos de éxtasis. No obstante, se desconoce si tales alteraciones son consecuencia del uso de la MDMA ya que las disfunciones serotoninérgicas podrían ser ajenas a la droga o preceder a la misma (Croft y cols., 2001a, 2001b). Con respecto a las consecuencias a largo plazo derivadas por el consumo del éxtasis, se ha sugerido que las lesiones serotoninérgicas podrían estar asociadas con ligeros, aunque significativos déficits cognitivos (McCann y cols., 1999a; Fox y cols., 2001b; Verkes y cols., 2001). En esta línea, los consumidores de éxtasis muestran con frecuencia trastornos de la memoria de trabajo, alteraciones del tiempo de reacción, y problemas de planificación, los cuales podrían estar relacionados con el grado de consumo de la droga (Croft y cols., 2001a; 2001b; Fox y cols., 2001a; 2001b; Verkes y cols., 2001). Después de casi un mes en abstinencia, estos sujetos muestran principalmente problemas de atención sostenida en pruebas de cálculo aritmético, tareas de atención compleja, aprendizaje incidental, memoria a corto plazo, así como también en pruebas de reconocimiento semántico y razonamiento verbal. Además, a nivel neuroquímico presentan una menor concentración del 5-HIAA en el LCR (McCann y cols., 1999a).

En el cerebro, el sistema serotoninérgico inerva regiones límbicas y frontales que han sido asociadas con la consolidación del aprendizaje y los procesos mnemotécnicos del ser humano. Fox y cols., (2002) observaron que los consumidores del éxtasis presentan problemas en tareas de reconocimiento, además de trastornos de la memoria de trabajo en función de la dificultad de la tarea realizada. Asimismo, estos investigadores demostraron que los usuarios de la MDMA muestran perturbaciones del aprendizaje pero no presentan cambios en muchos análisis asociados con el funcionamiento prefrontal, a excepción de la fluidez verbal donde los participantes tenían que pronunciar el mayor número de palabras

Efectos a largo plazo

posibles que comenzaran con una letra determinada. De este modo, Fox y cols., (2002) han sugerido que los déficits cognitivos observados en los consumidores de la MDMA podrían apreciarse en tareas sensibles al funcionamiento temporal.

En tareas de memoria de trabajo visuoespacial, donde los participantes tienen que recordar una secuencia espacial mientras completan de forma simultánea una prueba de juicio visual, los consumidores de la MDMA y los usuarios abstinentes muestran un peor desempeño que los grupos control (Wareing y cols., 2004; 2005). Asimismo, los trastornos cognitivos pueden observarse aún después de dos años de abstinencia a la droga. De hecho, se ha sugerido que estas perturbaciones cognitivas podrían ser consecuencia de una interferencia de los procesos de codificación de la memoria (Ward y cols., 2006), posiblemente a causa de daños neurotóxicos persistentes de la MDMA (Thomasius y cols., 2006). Zakzanis y Campbell, (2006) han sugerido recientemente que, a pesar de que los consumidores de la MDMA muestran un deterioro rápido de la memoria, los usuarios en abstinencia muestran cierta mejoría en algunas determinaciones, o al menos su desempeño no sufre cambios significativos. En contraste, algunos autores han observado que los usuarios del éxtasis y los individuos que han dejado de consumir esta droga muestran altos índices de impulsividad y diversas psicopatologías, aunque su incidencia es mayor en los abstinentes en comparación con las personas que continúan consumiéndola (de Win y cols., 2006; Morgan y cols., 2006; Quednow y cols., 2007; Hanson y cols., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que ambos grupos exhiben déficits de la memoria de trabajo y problemas de recuerdo verbal, por lo que se ha sugerido que las perturbaciones del desempeño neuropsicológico están relacionadas con el consumo regular del éxtasis, y no se revierten a pesar de una abstinencia prolongada (Morgan y cols., 2002). De acuerdo con lo anterior, es posible que algunos procesos cognitivos sean más vulnerables a los efectos neurotóxicos de la MDMA, lo que explicaría al menos en parte los diferentes resultados obtenidos hasta el momento.

En un estudio realizado a través de internet Parrott y cols., (2002) evaluaron la incidencia de los trastornos derivados a largo plazo como consecuencia del consumo de la MDMA. De

esta forma, estos investigadores reclutaron un gran número de voluntarios, los cuales, fueron clasificados de acuerdo a su consumo en: a) nóveles (1 a 9 ocasiones); b) moderados (10 a 99 ocasiones); y c) grandes consumidores (más de 100 ocasiones). Estos grupos tuvieron que responder si o no a una serie de preguntas relacionadas con problemas psicobiológicos experimentados durante la abstinencia a la droga, los cuales, fueron atribuidos por los sujetos sólo al consumo del éxtasis. Así, los participantes describieron trastornos de memoria, ansiedad, depresión, variaciones del humor, problemas de concentración, infecciones, temblores, inquietud, y pérdida de peso. Además, la incidencia de estas perturbaciones se relacionó con el grado del consumo del éxtasis. Como resultado de este trabajo, Parrott y cols., (2002) concluyeron que la presentación de los problemas atribuidos al uso de la MDMA está directamente relacionada con el número de ocasiones en que este compuesto ha sido consumido.

Alteraciones en la función ejecutiva también pueden estar relacionadas con la experiencia de consumo de la MDMA. Los consumidores de esta droga muestran perturbaciones de la flexibilidad cognitiva y un aumento de la conducta de perseverancia (von Geusau y cols., 2004). Mediante la prueba “*Rivermead*” se ha observado que el consumo de éxtasis podría perjudicar la memoria prospectiva episódica, ya que los consumidores de esta droga muestran deficiencias a largo plazo en las pruebas de “*appointment*” y “*message*” (subpruebas del *Rivermead*). En el primer análisis los sujetos tenían que realizar una acción determinada cuando escucharan un estímulo sonoro previamente establecido (el sonido de una alarma fijada a 20 minutos), mientras que en el análisis “*message*”, los participantes tenían que entregar un recado mientras realizaban otra prueba conductual. Se ha sugerido que la capacidad para recordar una “cita” futura podría estar relacionada con la frecuencia de consumo de la MDMA, así como también con el número de veces que esta droga ha sido utilizada (Zakzanis y cols., 2003). Posteriormente, Hanson y Luciana (2004) confirmaron que los consumidores de la MDMA muestran déficits de las funciones mnemotécnicas y ejecutivas. Además, estos investigadores observaron que algunos de los participantes de su estudio cumplían con los criterios del DSM-IV para abuso y dependencia a la MDMA.

Efectos a largo plazo

Estudios de resonancia magnética funcional (RMf) han permitido demostrar que los consumidores del éxtasis y los usuarios que no han empleado esta droga durante al menos 18 meses muestran similares patrones de activación cortical, así como también un desempeño parecido en tareas empleadas para el análisis de la memoria de trabajo. Sin embargo, los sujetos que continúan consumiendo esta droga presentan una mayor activación parietal (Daumann y cols., 2004). El uso de grandes cantidades de MDMA podría estar asociado con una considerable activación parietal durante la realización de tareas de memoria de trabajo. La alteración de los patrones de activación cerebral podrían aparecer antes de que se aprecien cambios en el desempeño cognitivo, lo que podría reflejar un estado temprano de lesión neuronal derivado del consumo del éxtasis (Daumann y cols., 2004). En otro estudio, se ha demostrado que los consumidores del éxtasis muestran una activación de diversas regiones cerebrales como el giro frontal superior, el tálamo, el putamen y el hipocampo. Estos análisis se llevaron a cabo mediante RMf durante la realización de pruebas que evaluaban la memoria inmediata y retardada (Moeller y cols., 2004). La RMf también ha permitido demostrar que los consumidores adolescentes de la MDMA muestran mayores tiempos de reacción en pruebas de atención selectiva y dividida. Además, estos sujetos muestran problemas para desactivar el hipocampo izquierdo durante las tareas de memoria de trabajo verbal. Por tal motivo, se ha sugerido que el consumo de éxtasis durante la adolescencia podría asociarse con daños cognitivos y disfunciones de los circuitos inhibitorios del hipocampo (Jacobsen y cols., 2004). Gouzoulis-Mayfrank y cols., (2003) han propuesto que los problemas de memoria observados en los consumidores de éxtasis más experimentados podrían estar asociados con una alta vulnerabilidad del hipocampo ante los efectos neurotóxicos de la MDMA. Igualmente, estos autores sugieren que la disfunción hipocampal derivada como consecuencia del consumo del éxtasis, puede ser un factor de riesgo para la aparición temprana de trastornos cognitivos y/o podría contribuir al deterioro rápido de la memoria relacionado con la edad. Los déficits de la memoria verbal, problemas del aprendizaje, perturbaciones de la consolidación de la memoria, el recuerdo y el reconocimiento inducidos por la MDMA, podrían estar relacionadas no sólo con disfunciones hipocampales, sino también con afecciones de otras regiones como la corteza frontal (Quednow y cols., 2006).

La neurotoxicidad inducida por la MDMA también podría estar relacionada con una respuesta serotoninérgica alterada, ya que se ha observado que los usuarios del éxtasis describen diferentes síntomas físicos y sensaciones tras la administración de metaclorofenilpiperazina (mCPP, agonista y liberador de 5-HT). Igualmente, estos individuos muestran una menor incidencia de ataques de pánico, así como también un decremento de la respuesta del cortisol y la prolactina tras la administración del agonista serotoninérgico (McCann y cols., 1999b). Cabe destacar que a pesar de que los grandes consumidores de éxtasis muestran más alteraciones de memoria y mayores tiempos de reacción que los consumidores moderados, ambos grupos sin diferencia presentan una reducción en la liberación de cortisol, pero no de prolactina, tras la administración de fenfluramina (Verkes y cols., 2001). Por lo tanto, se ha sugerido que el uso de la MDMA podría asociarse con daños de la memoria y la función serotoninérgica en los seres humanos, lo cual, sería compatible con los efectos neurotóxicos de esta droga observados en los animales de laboratorio.

Gerra y cols., (2002) observaron que tras la administración de bromocriptina (un agonista dopaminérgico), los consumidores de la MDMA en abstinencia (3 semanas) muestran una menor respuesta de la prolactina y de la hormona de crecimiento. Este último dato podría reflejar una reducción de la sensibilidad de los receptores D_2 en el hipotálamo, posiblemente como consecuencia de un incremento de la concentración extracelular de DA. Igualmente, los investigadores demostraron que estos sujetos muestran altos niveles de búsqueda de sensaciones novedosas, agresividad y depresión. Estos autores no descartan que los cambios dopaminérgicos observados pudieran estar asociados con una condición premórbida, pero sugieren que las funciones dopaminérgicas en los seres humanos son susceptibles a la actividad farmacológica de la MDMA. En un estudio posterior, Gerra y cols., (2003) observaron que los consumidores del éxtasis también presentan elevados niveles de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y del cortisol, aunque la respuesta de ambas hormonas al estrés es más débil en estos sujetos. Asimismo, los autores confirmaron que los consumidores de la MDMA muestran una hiposensibilidad de los receptores D_2 , evaluada mediante la respuesta de la hormona de crecimiento a un *challenge* de

Efectos a largo plazo

bromocriptina. También determinaron que la respuesta del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, evaluado mediante la ACTH y el cortisol, correlacionaba directamente con los valores de la hormona de crecimiento tras la administración de la bromocriptina, mientras que no encontraron una correlación entre las determinaciones hormonales y el grado de exposición a la MDMA. Por tal motivo, estos autores han sugerido que la hiperactividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal, la reducción de la sensibilidad de los receptores D₂, y la disminución de la respuesta al estrés, podrían representar una disfunción neuroendócrina compleja que podría estar asociada con el consumo de la MDMA.

Las concentraciones plasmáticas de 5-HT y del 5-HIAA, a diferencia de los análisis del LCR, no pueden ser empleados como un parámetro para determinar el consumo del éxtasis, ya que no reflejan las alteraciones en los niveles de 5-HT y del 5-HIAA en el LCR. Stuerenburg y cols., (2002) analizaron las concentraciones plasmáticas de 5-HT, del 5-HIAA, DA, NA, y epinefrina en una muestra de 159 consumidores de éxtasis y controles. A pesar de que otros estudios han demostrado que los usuarios de la MDMA muestran cambios significativos de las concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA en el LCR, los investigadores no detectaron alteraciones en el contenido serotoninérgico plasmático de estos sujetos. No obstante, los consumidores del éxtasis muestran considerables signos de actividad simpática, lo que indica un incremento de los niveles de DA, NA y epinefrina. Asimismo, estos autores encontraron una correlación positiva entre los niveles de estas catecolaminas y la dosis acumulada, así como también con el consumo durante los últimos 12 meses, lo cual, validaría estas observaciones. Se ha sugerido que los usuarios del éxtasis muestran una hiperreactividad noradrenérgica relacionada con la prevalencia de consumo de la droga, la cual a su vez, estaría asociada con episodios psicóticos y complicaciones cardiovasculares como taquicardia y arritmias (Stuerenburg y cols., 2002).

Mediante el empleo de la Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones (SPECT), se ha observado que las grandes consumidoras de la MDMA muestran un decremento considerable de la densidad del SERT, pero no así los hombres. No obstante, las mujeres que han dejado de consumir la MDMA durante más de un año muestran una recuperación

significativa del SERT, aunque no llegan a igualar los valores control. Por lo tanto, se ha sugerido las mujeres son más susceptibles que los hombres a los efectos neurotóxicos serotoninérgicos producidos por la MDMA, pero cabe la posibilidad de que los daños producidos por esta droga sean reversibles a largo plazo (Reneman y cols., 2001b). Por otro lado, estudios de TEP llevados a cabo con el ligando ^{11}C -(+)-McN5652, un compuesto que permite evaluar la densidad del SERT, han revelado que los consumidores del éxtasis muestran menores tasas de distribución en mesencéfalo, el tálamo, el caudado, el hipocampo, la corteza occipital, los lóbulos temporales y en el giro cingulado posterior (Buchert y cols., 2003; 2004; 2006; 2007; McCann y cols., 2005). Asimismo, mediante el empleo de esta técnica se ha confirmado que estos efectos sobre el SERT son más pronunciados en las mujeres, en comparación con los hombres. Por otra parte, es importante destacar que no se observan diferencias significativas para este parámetro entre los grupos control y sujetos que habían dejado de consumir la MDMA, por lo que se ha propuesto que el éxtasis es capaz de producir alteraciones del SERT, las cuales, podrían revertirse tras un periodo de abstinencia. Sin embargo, la abstinencia al consumo de la MDMA no implica la reversión completa de los efectos neurotóxicos de esta droga (Buchert y cols., 2003; 2004; 2006; 2007; McCann y cols., 2005).

McCardle y cols., (2004) observaron que los consumidores de la MDMA muestran problemas para codificar la información en memoria de largo plazo, presentan alteraciones del aprendizaje verbal, se distraen con facilidad, y son menos eficientes para enfocar la atención en pruebas complejas. Asimismo, los autores también observaron una mayor incidencia de síntomas depresivos en los sujetos que consumían regularmente esta droga. En esta línea, algunos autores han sugerido que el consumo del éxtasis no está relacionado con la depresión clínica, aunque el número de pastillas consumidas a lo largo de la vida si podría estar asociado con síntomas depresivos. Asimismo, esta relación al parecer persiste aún después de haber dejado el consumo de la droga (de Win y cols., 2004).

Por otro lado, el trastorno depresivo observado en los consumidores del éxtasis podría estar asociado con las alteraciones de la densidad del SERT, e incluso se ha sugerido que los

Efectos a largo plazo

consumidores de la MDMA que expresan el alelo “s” (del genotipo del SERT) podrían ser más vulnerables a las disfunciones afectivas y cognitivas producidas por esta droga (de Win y cols., 2004; Roiser y cols., 2005; 2006). El gen que codifica el SERT presenta un polimorfismo funcional en la región promotora, designado región polimórfica ligado al gen del SERT (5-HTTLPR). Este polimorfismo produce dos alelos conocidos como *l* (“long” o largo) y *s* (“short” o corto) (Lesch y cols., 1996). Las células que contienen el alelo *l* expresan más SERT que las células con el alelo *s*, por lo que la recaptación de 5-HT en los seres humanos homocigotos para el alelo *l* es mayor (200%) que en los seres humanos heterocigotos u homocigotos que expresan el alelo *s* (Lesch y cols., 1996). De esta forma, se ha demostrado que el estado emocional de los consumidores crónicos del éxtasis es altamente vulnerable en aquellos sujetos que presentan el alelo *s* en el genotipo 5-HTTLPR. Estos datos concuerdan con altos índices de depresión evaluados mediante el Inventario de Depresión de Beck en los usuarios del éxtasis con el genotipo *ss* (Roiser y cols., 2005).

Investigaciones realizadas por Thomasius y cols., (2003) determinaron que los consumidores del éxtasis, los policonsumidores, y los usuarios en abstinencia (de al menos 5 meses) presentan una gran incidencia de psicopatologías en comparación con sujetos control. No obstante, sólo los consumidores de la MDMA mostraron daños significativos del recuerdo verbal, además de una menor disponibilidad del SERT en el mesencéfalo y el núcleo caudado. Cabe destacar que los autores realizaron un análisis de regresión, lo que determinó que la psicopatología y las alteraciones serotoninérgicas podrían predecirse por el número de pastillas consumidas en una sola sesión. De esta forma, Thomasius y cols., (2003) han propuesto que los daños de la memoria verbal inducidos por el consumo de la MDMA posiblemente se agraven con la abstinencia.

Por otra parte, se ha propuesto que la impulsividad podría aumentar la vulnerabilidad al daño cognitivo producido como consecuencia del consumo crónico de la MDMA. En esta línea, la impulsividad podría estar relacionada con diversas funciones neuropsicológicas de los consumidores de esta droga, ya que se ha observado que los individuos que muestran

una alta impulsividad desarrollan con mayor facilidad problemas cognitivos derivados por el uso crónico del éxtasis (Roiser y cols., 2007).

7.2. Efectos en animales de laboratorio

7.2.1. Efectos de la MDMA sobre la temperatura corporal y otras funciones

El daño de la función serotoninérgica, producido como consecuencia de la exposición a la MDMA, podría alterar el balance de 5-HT y con ello los procesos implicados en la termorregulación. En ratas Dark Agouti que han sido expuestas a la MDMA (12.5 mg/kg), se observa a largo plazo un rápido incremento de la temperatura corporal cuando son alojadas en un ambiente de elevada temperatura (30°C), persistiendo esta respuesta por más tiempo, aún cuando los animales son trasladados a un ambiente con una temperatura ambiente normal (20°C). Del mismo modo, la administración de MDMA (12.5 mg/kg) produce una pérdida (37%) del contenido serotoninérgico del hipotálamo (Mechan y cols., 2001). Igualmente, la exposición previa a esta droga no afecta la respuesta hipotérmica producida por el 8-OH-DPAT (agonista de los receptores 5-HT_{1A}), lo que sugiere que los mecanismos serotoninérgicos regulados por estos receptores no son afectados. Por lo tanto, se ha sugerido que la administración de una sola dosis neurotóxica de MDMA, es suficiente para dañar los procesos implicados en la termorregulación, los cuales, se expresan cuando los sujetos son expuestos a elevadas temperaturas ambiente. De hecho, los grandes consumidores de MDMA podrían mostrar problemas para regular su temperatura corporal, lo que les haría más vulnerables a los efectos adversos agudos de la MDMA en lugares con elevada temperatura ambiente y multitudinarios (Mechan y cols., 2001).

La administración de 20 mg/kg de MDMA (5 mg/kg/hora) cada 5 días en ratas adolescentes (desde los 35 hasta los 60 días de edad), induce a largo plazo diversos cambios en la función fisiológica, conductual, y neuroquímica (Piper y Meyer, 2004; Piper y cols., 2005; 2006). En esta línea, se ha observado que la MDMA promueve una respuesta hipotérmica sustancial y prolongada, que no es afectada por el tratamiento crónico (Piper y cols., 2005).

Efectos a largo plazo

Asimismo, la MDMA es capaz de producir síndrome serotoninérgico, cuya intensidad disminuye con las administraciones subsecuentes de la droga (Piper y cols., 2005). El síndrome serotoninérgico está relacionado con un incremento de la actividad serotoninérgica, la cual, se observa por lo regular como una tríada de síntomas neuromusculares, autonómicos y mentales que se originan como consecuencia de una sobredosis con antidepresivos, o por una combinación de diversas drogas serotoninérgicas (Kalueff y cols., 2008). El síndrome serotoninérgico es causado por un exceso de precursores o agonistas de la 5-HT, por un aumento de la liberación de este neurotransmisor, y por un decremento de su recaptación (vía SERT) o su metabolismo (Kalueff y cols., 2008). En animales, las respuestas motoras que caracterizan este síndrome incluyen hipertonicidad o rigidez, temblores, caminar con los miembros anteriores, movimientos ondulantes de la cabeza, contracciones nerviosas, tics o contracciones de los músculos de la espalda, postura corporal plana, abducción de los miembros posteriores, y caminar hacia atrás. Las respuestas autonómicas comprenden una desregulación de la temperatura corporal (hipertermia o hipotermia), piloerección, salivación, hiperhidrosis (sudoración excesiva), y defecación (Kalueff y cols., 2008). Por otro lado, durante la exposición crónica intermitente a la MDMA se observa una atenuación de la ganancia de peso y un aumento de la eyaculación espontánea (Piper y cols., 2005). Recientemente, se han sugerido que este patrón de exposición a la MDMA durante la adolescencia, quizás promueve cambios neuroadaptativos que pudieran prevenir las respuestas adversas de una dosis *challenge* de la misma droga, así como también una desensibilización parcial de los receptores 5-HT_{1A}, ya que se ha demostrado que la exposición a la MDMA durante la adolescencia, atenúa la respuesta hipertérmica producida por una dosis *challenge* de esta misma droga, y además el síndrome serotoninérgico. No obstante, la respuesta hipotérmica producida por la administración del 8-OH-DPAT no se ve afectada (Piper y cols., 2006).

Por otra parte, se ha informado que la MDMA induce disfunción cerebrovascular durante la fase aguda (Quate y cols., 2004). Por tal motivo, Ferrington y cols., (2006) examinaron las consecuencias cerebrovasculares de la neurodegeneración serotoninérgica, y los efectos de una exposición *challenge* de MDMA sobre el flujo sanguíneo cerebral (LCBF) y la

utilización cerebral de glucosa (LCMRglu). Así, estos investigadores trataron ratas Dark Agouti con 15 mg/kg de MDMA y 3 semanas después, administraron una dosis *challenge* de la misma dosis. Los animales expuestos a la MDMA muestran un decremento considerable de las fibras SERT positivas (46%) y de los sitios de unión de la [³H] paroxetina (47%), así como también una reducción significativa de la LCMRglu. Sin embargo, estos autores no encontraron cambios en el LCBF, lo que indica una pérdida persistente del tono constrictor cerebro vascular. Por otro lado, tanto en los animales control como en los expuestos a la MDMA, la dosis *challenge* produjo un incremento significativo de la LCMRglu, mientras que la LCBF disminuyó considerablemente. Asimismo, el 50% de las ratas tratadas con la droga mostraron hiperaemia focal (ojos rojos debido al exceso de suministro de sangre), lo que sugiere una pérdida de la capacidad autorregulatoria en la respuesta a la hipertensión inducida por la MDMA. Por tal motivo, Ferrington y cols., (2006) han sugerido que la disfunción de la regulación cerebrovascular, producida como consecuencia de la exposición aguda a la MDMA, no disminuye con la exposición previa a la droga, a pesar de la depleción significativa de las terminales serotoninérgicas. No obstante, hay una sub-población, o circunstancias individuales en las cuales esta disfunción se desarrolla en una condición que podría predisponer a una isquemia.

7.2.2. Efectos de la MDMA sobre la conducta

7.2.2.1. Actividad locomotora

En las ratas, el tratamiento prenatal con la MDMA, desde los 14 a los 20 días del periodo de gestación, produce alteraciones neuroquímicas y conductuales que persisten al menos hasta los 21 días de edad (Koprach y cols., 2003). Los animales expuestos a la MDMA (2x15 mg/kg/día) durante este periodo del desarrollo muestran una reducción del “*turnover*” de la DA y la 5-HT en el estriado y el NAcc, así como también un decremento de las concentraciones de sus metabolitos, lo que sugiere una atenuación de la liberación o un incremento de la recaptación de estos neurotransmisores en dichas estructuras cerebrales. De igual forma, se observa un incremento de la densidad de las fibras

Efectos a largo plazo

inmunoreactivas a la tirosina hidroxilasa en diversas estructuras como la CPF, el NAcc y el estriado. A nivel conductual, la exposición prenatal a la MDMA induce un incremento de la actividad locomotora espontánea y una falta de habituación a un ambiente novedoso, es decir, la respuesta motora de las ratas tratadas con esta droga persiste durante más tiempo (Koprach y cols., 2003).

No existen resultados concluyentes en cuanto a los efectos a largo plazo que produce la MDMA cuando es administrada a animales adultos. Wallace y cols., (2001) evaluaron la actividad locomotora diurna y nocturna de ratas adultas tratadas con MDMA (4x10 mg/kg, una inyección cada 2 horas en un único día). Una semana después de haber finalizado el tratamiento, los animales fueron alojados en cámaras especiales que permitieron llevar a cabo un registro de la actividad locomotora durante una semana. Así, estos investigadores observaron que las ratas que habían sido tratadas con MDMA mostraron un decremento significativo de la actividad motora en ambos ciclos. Igualmente, estos animales exhibieron una menor concentración de 5-HT en el estriado (50%), aunque al parecer, ambos fenómenos no estaban relacionados entre sí. En contraste, Marston y cols., (1999) observaron que el tratamiento con dosis crecientes de MDMA (10, 15, y 20 mg/kg/día, dos inyecciones por dosis) no afecta la actividad locomotora de ratas adultas evaluadas dos semanas después de haber finalizado el tratamiento. Por otro lado, Ho y cols., (2004) demostraron mediante la prueba de campo abierto, que la administración de una sola dosis de MDMA (7.5 o 15 mg/kg) tampoco produce cambios significativos en ratas evaluadas 9 y 10 días después de haber recibido el tratamiento.

Con respecto a la sensibilización conductual, se ha descrito que las ratas adultas con experiencia previa a la MDMA muestran un aumento considerable de la actividad motora en respuesta a una dosis *challenge* de la misma droga, administrada una o dos semanas después de haber finalizado el tratamiento (Modi y cols., 2006; Walker y cols., 2007). En comparación con las ratas macho, el *challenge* de MDMA produce una respuesta motora más pronunciada en las ratas hembras, a pesar de que el pre-tratamiento produjo efectos neurotóxicos serotoninérgicos similares en ambos géneros (Walker y cols., 2007). Ball y

cols., (2006) han sugerido que el contexto bajo el cual se experimentan los efectos estimulantes de la MDMA, juega un papel importante en el desarrollo y la expresión de la sensibilización conductual. Estos investigadores administraron MDMA (5 mg/kg/día) durante 5 días consecutivos en dos ambientes diferentes: en el primero, los animales recibían la droga en las cajas donde eran alojados, mientras que el segundo ambiente, las ratas recibían la droga de forma intercalada entre las cámaras de registro de actividad y las cajas de alojamiento (días 1 y 5, y días 2, 3 y 4, respectivamente). Tres o cinco días después de haber finalizado el tratamiento, estos investigadores observaron que sólo las ratas expuestas previamente a la MDMA en la cámara de registro, mostraron un efecto de sensibilización conductual en respuesta a una dosis *challenge* de esta droga. Además, estos animales exhibieron un decremento de la tasa basal de disparo de las neuronas del estriado, las cuales, se excitaron rápidamente tras la administración de la dosis *challenge*. Por lo tanto, según estos autores el estriado parece participar en los cambios neuroconductuales relacionados con el uso repetido de la MDMA.

Diversos mecanismos podrían estar implicados en el fenómeno de la sensibilización conductual. En esta línea, se ha observado que la administración previa del SHC 23390 durante el tratamiento crónico con la MDMA en ratas, no previene el desarrollo de la sensibilización inducida por la exposición crónica a la MDMA (15 mg/kg/día, durante 5 días consecutivos). No obstante, cuando este antagonista dopaminérgico se administra, por vía sistémica o local en el *core* (núcleo o centro) del NAcc, antes de la dosis *challenge*, la expresión de la sensibilización conductual en los animales con experiencia previa de la MDMA es bloqueada (Ramos y cols., 2004). Por tal motivo, se ha sugerido que la estimulación de los receptores D₁ no es crítica para el desarrollo de la sensibilización inducida por la MDMA a largo plazo. Sin embargo, la expresión de este fenómeno si depende de la activación de estos receptores dopaminérgicos en el *core* del NAcc (Ramos y cols., 2004). De forma similar, la administración del SCH 23390 en la CPF medial, favorece la respuesta motora inducida por una dosis *challenge* de MDMA (5 mg/kg) en los animales control (pre-tratados con solución salina). No obstante, este compuesto suprime la

Efectos a largo plazo

expresión de la sensibilización en las ratas expuestas previamente a la MDMA (Ramos y cols., 2005a).

Otros sistemas de neurotransmisión al parecer también están implicados en estos efectos ya que la microinyección del SKF 81297 o del MK 212 (agonistas D₁ y 5-HT_{2C} respectivamente) bloquean la expresión de la sensibilización inducida por la MDMA, mientras que la administración del RS 102221 (antagonista de los receptores 5-HT_{2C}) previene los efectos del SCH 23390 en las ratas con experiencia previa de esta droga (Ramos y cols., 2005a). Por tal motivo, se ha sugerido que el bloqueo de la expresión de la sensibilización conductual llevado a cabo por el SCH 23390, es modulado por la estimulación de los receptores 5-HT_{2C} en la CPF medial, y no por el bloqueo de los receptores D₁ en esta estructura cerebral (Ramos y cols., 2005a). Con respecto a la participación de la CPF medial en el fenómeno de la sensibilización conductual, Ramos y cols., (2005b) realizaron lesiones bilaterales de esta estructura en ratas, mediante la administración de ácido iboténico 7 días antes, o 4 días después, de administrar un régimen neurotóxico con la MDMA capaz de inducir sensibilización. Posteriormente, estos investigadores administraron, doce días después, una dosis *challenge* de MDMA (5 mg/kg). De esta forma, se demostró que las lesiones de la CPF medial producidas por el ácido iboténico, no afectan los efectos estimulantes de esta droga, pero previenen el desarrollo y la expresión de la sensibilización conductual. Estos resultados apoyan la participación de la CPF medial en la sensibilización conductual inducida por la MDMA, y de forma específica, indican que esta estructura cerebral juega un papel importante en el desarrollo y la expresión de este fenómeno en las ratas.

En ratas y ratones evaluados en la prueba del campo abierto, se ha demostrado que la administración semanal de un régimen *binge* de MDMA (3x5 mg/kg/semana) produce un aumento considerable de la actividad motora tras la primera y la tercera semana del tratamiento (Kindlundh-Högberg y cols., 2007). Sin embargo, sólo las ratas muestran un aumento de la actividad en la zona central, lo que indica que la exposición repetida e intermitente a la MDMA induce un efecto ansiolítico y un aumento de la impulsividad, la

cual, podría estar asociada con una actividad serotoninérgica alterada (Kindlundh-Högberg y cols., 2007). Cabe destacar que las ratas también exhibieron una menor densidad del SERT en el *Shell* (cubierta o corteza) del NAcc, mientras que el DAT no se vio afectado en estos animales. En contraste, los ratones presentaron un decremento significativo de la densidad del DAT en el *Shell* del NAcc y en el estriado, mientras que la densidad del SERT no mostró cambios (Kindlundh-Högberg y cols., 2007).

En los ratones, la administración repetida de MDMA (10 mg/kg) durante 6 días consecutivos produce un incremento de la respuesta motora al 6º día, tres veces mayor que la actividad locomotora obtenida el primer día del tratamiento (Anderson e Itzhak, 2003). Asimismo, la exposición previa al 7-nitroindazol (inhibidor de la óxido nítrico sintasa neuronal, nNOS) no afecta la inducción y la expresión de la sensibilización conductual de la MDMA, pero si suprime la respuesta motora producida por una dosis *challenge* de esta droga en ratones tratados previamente con suero fisiológico (Anderson e Itzhak, 2003). Se ha sugerido que la inducción y la expresión de la sensibilización conductual a la MDMA no dependen de la nNOS, pero se requiere de una actividad intacta de la nNOS para que la sensibilización conductual se mantenga a largo plazo (Anderson e Itzhak, 2003).

El fenómeno de la sensibilización conductual también ha sido relacionada con los daños neurotóxicos inducidos por la p-cloroanfetamina (PCA), incluso se ha sugerido que ambos efectos pueden obtenerse con tan sólo una sola inyección de este compuesto (Itzhak y cols., 2004). En esta línea, se ha observado que la PCA produce a largo plazo un decremento considerable (37-70%) de los marcadores dopaminérgicos y serotoninérgicos en el ratón, caracterizándose por una menor densidad de los DAT en el estriado, y de los SERT en la corteza frontal. Además, este compuesto induce sensibilización conductual a una dosis *challenge* de MDMA (10 mg/kg) (Itzhak y cols., 2004).

Itzhak y cols., (2003) investigaron las consecuencias a largo plazo de la exposición previa a dosis neurotóxicas y no neurotóxicas de MDMA sobre la sensibilización conductual en ratones. Para tal efecto, los animales empleados por estos investigadores recibieron una

Efectos a largo plazo

dosis única de 10 mg/kg de MDMA (régimen farmacológico bajo), o uno de los siguientes tratamientos (a) 2x30 mg/kg o (b) 2x15 mg/kg en dos días consecutivos (régimen farmacológico alto). Posteriormente, los autores evaluaron la respuesta motora a una dosis *challenge* de MDMA (10 mg/kg), y observaron que la administración de la dosis *challenge* producía un incremento persistente de la actividad motora en los animales que habían sido expuestos al régimen alto de MDMA, el cual, puede observarse incluso hasta 80 días después de haber finalizado el pre-tratamiento. Esta respuesta correlacionó con una reducción de la densidad del DAT y del SERT (64-68%) en el estriado y en la corteza frontal, respectivamente. En contraste, el régimen bajo de MDMA no indujo efectos neurotóxicos, pero si es capaz de producir sensibilización conductual, que puede observarse durante 35 días. Por lo tanto, Itzhak y cols., (2003) concluyeron que la inducción de la sensibilización a los efectos estimulantes de la MDMA en el ratón, no depende de la neurotoxicidad inducida por esta droga. No obstante, la persistencia de la sensibilización conductual a la MDMA, si está relacionada con los efectos neurotóxicos producidos por esta droga a largo plazo.

7.2.2.2. Ansiedad

Los déficits de la función serotoninérgica han sido asociados con una disminución de la ansiedad (Tye y cols., 1977, 1979; Briley y cols., 1990), por lo que es probable que la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por la MDMA pudiera afectar la respuesta a largo plazo de los animales en diversos modelos conductuales empleados para el estudio de esta conducta. Sin embargo, es importante mencionar que incluso en ausencia de efectos neurotóxicos serotoninérgicos, la MDMA (a dosis bajas) es capaz de afectar la conducta de ansiedad a largo plazo (McGregor y cols., 2003a).

Green y McGregor (2002) sugieren que al menos en las ratas, la pérdida del contenido de 5-HT produce una respuesta ansiogénica o ansiolítica dependiendo de los niveles basales de la ansiedad de la cepa animal empleada, así como también del grado de la pérdida de la concentración de 5-HT, y de la naturaleza de la prueba conductual utilizada. Además, estos

investigadores proponen que las alteraciones de las respuestas afectivas quizás no sean consecuencia de un efecto neurotóxico serotoninérgico per se, sino posiblemente son un reflejo de respuestas adaptativas que se producen en el cerebro como resultado de las lesiones serotoninérgicas.

Laberinto elevado en cruz. La exposición a la MDMA induce un efecto ansiogénico a largo plazo en distintas pruebas como la interacción social, el LEC, y la prueba de emergencia (Morley y cols., 2001; Gurtman y cols., 2002; Fone y cols., 2002). La prueba de emergencia implica un conflicto entre el deseo de explorar y el deseo evitar un estímulo ansiogénico que produce un espacio abierto (Crawley y Goodwin, 1980). Este modelo animal es considerado como una herramienta útil para el análisis de la ansiedad generalizada, ya que los agentes ansiolíticos que alivian los síntomas relacionados con este trastorno modifican las conductas producidas por la prueba de emergencia (Handley y McBlane, 1993a; 1993b; 1993c; Hascöet y Bourin, 1998). Algunos grupos de investigación también han demostrado que esta droga puede inducir un efecto ansiolítico (Mechan y cols., 2002a; 2002c). Por ejemplo, las ratas Dark Agouti en condiciones normales permanecen menos tiempo en los brazos abiertos del LEC, pero tras la lesión inducida por la MDMA estos animales muestran una respuesta ansiolítica a largo plazo en esta prueba conductual (Mechan y cols., 2002a; 2002c). En contraste, las ratas Sprague-Dawley y las ratas Wistar en comparación con las anteriores, permanecen durante más tiempo en los brazos abiertos, y tras la administración de la MDMA estos animales muestran un aumento de la ansiedad en el LEC a largo plazo (Morley y cols., 2001; Mechan y cols., 2002a; 2002c). Igualmente, hay que considerar que el LEC evalúa, al menos en parte, la impulsividad o las conductas de riesgo, y que estos fenómenos se alteran por la pérdida de 5-HT inducida por la MDMA (Mechan y cols., 2002a).

Algunos autores han observado que la exposición crónica a la MDMA (2x7.5 mg/kg/día, 3 días consecutivos) en ratas durante la adolescencia, no induce efectos significativos sobre la ansiedad en el LEC cuando estos animales son estudiados al alcanzar el periodo adulto (Bull y cols., 2003). En contraste, Mechan y cols., (2002a) observaron que una sola

Efectos a largo plazo

administración de una dosis neurotóxica de MDMA (12.5 mg/kg), reduce la ansiedad cuando esta conducta se evalúa mediante el LEC (80 días después) y el campo abierto (73 días después). Estos autores sugieren que estos cambios conductuales podrían ser consecuencia de procesos neuroadaptativos en el sistema serotoninérgico, quizás como reflejo de una compensación de la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por la MDMA. Los efectos ansiolíticos de esta droga a largo plazo también se observan con una administración intermitente y en ausencia de neurotoxicidad serotoninérgica. Empleando como referencia el patrón de consumo de MDMA en humanos, Piper y Meyer (2004) administraron éxtasis (10 mg/kg, 2 veces al día en intervalos de 4 h) en forma alterna (cada 5 días) a ratas adolescentes, y evaluaron el nivel de ansiedad mediante el LEC y la concentración del SERT cuando estos animales alcanzaron la edad adulta. Los autores observaron que las concentraciones del SERT no variaban entre los grupos experimentales empleados, y que los animales expuestos a la MDMA pasaban más tiempo en los brazos abiertos. Por lo tanto, este grupo de investigación también sugiere que los efectos ansiolíticos de la MDMA a largo plazo pueden observarse incluso en ausencia de neurotoxicidad serotoninérgica.

Es importante mencionar que la concentración de 5-HT en el estriado podría estar relacionada con efectos conductuales opuestos. Por ejemplo, se ha observado que una pérdida moderada de la concentración de 5-HT (50-70%) en el estriado podría producir un incremento de la ansiedad en ratas sometidas a la prueba del campo abierto y al LEC. En contraste, esta conducta no es afectada por un decremento considerable de los niveles de este neurotransmisor (>75%) (Hall y cols., 1999).

También se ha estudiado la respuesta a una dosis de MDMA en animales con experiencia previa de esta droga. Ratas adultas tratadas previamente con 40 mg/kg de MDMA (4x10 mg/kg cada 2 horas) muestran a largo plazo menores concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA, así como también un decremento de la densidad del SERT en el hipocampo. No obstante, los efectos neurotóxicos inducidos por esta droga no afectan la respuesta conductual ansiogénica producida por una dosis *challenge* de MDMA (10 mg/kg) en el

LEC, administrada dos semanas después de haber finalizado el tratamiento (Sumnall y cols., 2004).

Interacción social. Algunos grupos de investigación han observado que la exposición crónica a la MDMA (2x7.5 mg/kg/día, 3 días consecutivos) durante la adolescencia, reduce la interacción social de las ratas cuando estos animales son evaluados durante su vida adulta (Fone y cols., 2002; Bull y cols., 2003; 2004). A nivel neuroquímico, no se observan alteraciones en los niveles de 5-HT o de DA, y tampoco se aprecian déficits en la densidad del SERT evaluado mediante el análisis de los sitios de unión de la [³H] paroxetina en la corteza (Fone y cols., 2002). Por tal motivo, se sugiere que la exposición a la MDMA durante la adolescencia, podría repercutir sobre la ansiedad de los animales a largo plazo aún en ausencia de efectos neurotóxicos, lo que indica que otros mecanismos no serotoninérgicos posiblemente modulen los efectos de esta droga sobre la conducta y las emociones a largo plazo (Fone y cols., 2002).

Los efectos ansiogénicos producidos por la MDMA a largo plazo también han sido demostrados en ratas adultas evaluadas mediante la prueba de emergencia (Gurtman y cols., 2002; McGregor y cols., 2003a; 2003b, Thompson y cols., 2004). Además, se ha observado que esta droga incrementa la inmovilidad de los animales y disminuye sus respuestas activas en la prueba de natación forzada (McGregor y cols., 2003a; Thompson y cols., 2004). La administración de fluoxetina previene los efectos conductuales de la MDMA sobre la prueba de emergencia y los signos que habitualmente se emplean como modelo de depresión en la natación forzada. No obstante, este fármaco no suprime el aumento de la ansiedad inducido por la MDMA en la prueba de la interacción social (Thompson y cols., 2004). Por lo tanto, se ha sugerido que los efectos de la fluoxetina son relativamente modestos en magnitud, y no incluyen una mejora de los déficits sociales inducidos por la MDMA. En consecuencia, es posible que algunas disfunciones conductuales producidas por esta droga impliquen la participación de diferentes sistemas neuronales, además del serotoninérgico (Thompson y cols., 2004).

Efectos a largo plazo

En ratones, Morley-Fletcher y cols., (2002) evaluaron los efectos conductuales a largo plazo de la administración repetida e intermitente de la MDMA (3x5 mg/kg o 3x10 mg/kg, una inyección cada tercer día). Para ello, estos investigadores trataron a los animales en 3 fases distintas del desarrollo: (1) adolescencia temprana (28 días de edad), (2) adolescencia intermedia (38 días de edad), y (3) adolescencia tardía (52 días de edad). Posteriormente, evaluaron las consecuencias la exposición a la MDMA cuando los animales alcanzaron el periodo adulto (80 días de edad). Estos investigadores observaron que los animales expuestos a la MDMA durante la adolescencia temprana e intermedia, muestran un incremento de la exploración del ambiente, además de un aumento de la interacción social. Asimismo, estos grupos experimentales presentan un decremento considerable de la concentración de 5-HT en el hipotálamo. La administración de una dosis *challenge* de MDMA (5 mg/kg) en estos ratones induce un aumento de la búsqueda de novedades y un incremento significativo de la respuesta motora. De la misma forma, se observa un incremento de los niveles de 5-HT y una reducción de la concentración del 5-HIAA en el hipotálamo. Por lo tanto, Morley-Fletcher y cols., 2002 han sugerido que posiblemente existe una vulnerabilidad temporal específica a los efectos conductuales y neurotóxicos de la MDMA a largo plazo en ratones en función del periodo del desarrollo durante el cual los animales son expuestos a la droga.

Otros factores a tener en cuenta es que el consumo de la MDMA al parecer induce un incremento en la impulsividad, la cual, podría estar relacionada con la neurotoxicidad serotoninérgica producida por esta droga (Rodgers y cols. 2001; Thomasius y cols. 2003; Butler y Montgomery 2004; Hanson y Luciana 2004; Halpern y cols. 2004). Los efectos de la MDMA sobre esta conducta son difíciles de establecer, y podrían ser enmascarados por el policonsumo y por la predisposición individual a la impulsividad o a la inhibición conductual. Con el fin de tratar de clasificar el efecto de la MDMA, Saadat y cols., (2006b) han examinado si esta droga (3x5 mg/kg) influye en la impulsividad de los animales, produciendo así una desinhibición de la conducta interpretada como ansiólisis. Estos investigadores evaluaron la impulsividad de ratas Dark Agouti mediante una prueba de discriminación operante visuoespacial, en la cual los animales fueron entrenados para

presionar una palanca asociada a un estímulo luminoso con la única finalidad de recibir una recompensa alimenticia, en consecuencia tenían que ser capaces de responder cuando ambos factores (la palanca y el estímulo luminoso) se encontraban activos. Se observó un efecto a corto plazo de la MDMA sobre el porcentaje de respuestas correctas a las 3 y 24 horas después, con una recuperación de los niveles control una semana después. De la misma forma, demostraron que la MDMA no afecta las respuestas prematuras en ninguno de los días de prueba. Por lo tanto, Saadat y cols., (2006a) han sugerido que a pesar de sus efectos neurotóxicos serotoninérgicos, la MDMA no modifica la impulsividad a largo plazo en las ratas.

Los efectos a largo plazo de la MDMA sobre la ansiedad no induce cambios significativos en otros modelos animales como el “*marble burying behaviour*” (enterramiento defensivo). Esta prueba se basa en el análisis de una conducta nata de los ratones, quienes tienden a enterrar cualquier objeto inofensivo que se encuentre dentro de su jaula, como por ejemplo una canica (De Boer y Koolhaas, 2003). Además, el enterramiento defensivo es una conducta que puede ser modificada por diversas drogas ansiolíticas (Broekkamp y cols., 1986; Njung’e y Handley 1991a, 1991b). Así, la exposición previa a un tratamiento neurotóxico con MDMA (3x25 mg/kg) no modifica el enterramiento defensivo a largo plazo en ratones, a pesar de que este régimen farmacológico es capaz de disminuir la concentración de DA, pero no la de 5-HT, en el estriado. Igualmente, estos animales tampoco muestran cambios conductuales tras la administración de una dosis *challenge* de 2.5 mg/kg de MDMA (Saadat y cols., 2006b). Por otro lado, la exposición previa a la PCA atenúa el enterramiento defensivo 28 días después haber administrado esta droga, pero no 40 días después. Igualmente, este compuesto produce un decremento considerable de las concentraciones de DA y 5-HT en el estriado (Saadat y cols., 2006b). Por tal motivo, se ha sugerido que la respuesta ansiolítica a largo plazo podría ser modulada por la pérdida del contenido serotoninérgico cerebral, pero debido a que este efecto sólo se observa a “corto” plazo, es posible que se promuevan respuestas neuroadaptativas compensatorias en el cerebro de estos animales (Saadat y cols., 2006b).

7.2.2.3. Memoria

Algunos investigadores han sugerido que la exposición a la MDMA durante el desarrollo del individuo podría afectar los procesos implicados en la memoria y el aprendizaje. En esta línea, Broening y cols., (2001) evaluaron los efectos crónicos sobre la memoria espacial y secuencial producidos por la MDMA durante dos periodos del desarrollo en las ratas: (a) 1 a 10 días de edad, o (b) 11 a 20 días de edad, los cuales, corresponden con el desarrollo cerebral temprano y tardío durante el tercer trimestre de gestación en los seres humanos. La exposición a la MDMA desde los 11 hasta los 20 días de edad, induce deterioros del aprendizaje secuencial y espacial en estos animales cuando alcanzan la edad adulta (\approx 60 días de vida), mientras que las ratas expuestas a la MDMA durante el periodo 1 a 10 casi no muestran cambios en estos parámetros. Por otro lado, la exposición a esta droga durante ambos periodos del desarrollo, produce ligeros cambios en las concentraciones de 5-HT, DA, y NA en la CPF y el hipocampo, aunque estos efectos no fueron relacionados con las alteraciones conductuales observadas. Por lo tanto, Broening y cols., (2001) han sugerido que los déficits en el aprendizaje producidos por la exposición a la MDMA durante el desarrollo del individuo, podrían ser resultado de una vulnerabilidad específica de la ontogenia cerebral. Del mismo modo, estos efectos adversos se mantienen a largo plazo, e incluso podrían no estar relacionados con los efectos neurotóxicos monoaminérgicos producidos por esta droga.

Los estudios de Broening y cols., (2001) fueron confirmados posteriormente por Williams y cols., (2003), quienes obtuvieron resultados similares en el laberinto acuático de Morris y en el laberinto acuático de Cincinnati. Asimismo, estos investigadores observaron que algunos factores como el retardo del crecimiento de los animales, el someter a los animales a múltiples inyecciones, o la composición de la camada, no modifican los efectos adversos sobre los procesos de aprendizaje y la memoria producidos por la exposición a la MDMA durante el periodo 11-20. No obstante, hay quienes sugieren que las lesiones serotoninérgicas hipocampales, producidas por la MDMA (2x20 mg/kg), podrían estar

relacionadas con los déficits de la memoria de referencia observados en ratas evaluadas con el laberinto acuático de Morris (Sprague y cols., 2003).

Por otro lado, se ha observado que las ratas expuestas de forma repetida e intermitente a la MDMA (2x10 mg/kg/día) durante la adolescencia (desde los 35 hasta los 60 días de edad), muestran déficits de la atención en la prueba de reconocimiento de objetos tan sólo 5 días después de haber finalizado el tratamiento (65 días de edad) (Piper y Meyer; 2004). Estos resultados no se acompañaron de cambios significativos sobre la densidad del SERT en el hipocampo y la corteza 10 días después de haber administrado la última dosis de MDMA (70 días de edad). Por lo tanto, se ha sugerido que aún en ausencia de efectos neurotóxicos evidentes, la exposición crónica intermitente a la MDMA durante la adolescencia podría afectar el funcionamiento cognitivo a largo plazo (Piper y Meyer, 2004).

En ratas adultas, los déficits cognitivos producidos por la MDMA en la prueba de reconocimiento de objetos, pueden apreciarse incluso 3 meses después de haber administrado la droga (Morley y cols., 2001). Del mismo modo, McGregor y cols., (2003a) demostraron que las ratas adultas expuestas a la MDMA y a una elevada temperatura ambiente, exhibían déficits de memoria y alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica en regiones como la amígdala y el hipocampo, las cuales, podrían estar relacionadas con los cambios conductuales observados.

Se ha sugerido que el tratamiento neurotóxico con la MDMA no induce cambios a largo plazo en eventos moleculares asociados con el aprendizaje (Moyano y cols., 2005). La exposición crónica a 20 mg/kg de MDMA (2x10 mg/kg/día durante cuatro días consecutivos) disminuye considerablemente el contenido serotoninérgico en el hipocampo de las ratas, una semana después de haber administrado la última dosis de esta droga. Sin embargo, estos animales no muestran problemas de aprendizaje en la prueba de la evitación pasiva, o cambios en la expresión superficial de los receptores NMDA, en la densidad de la proteína post-sináptica PSD-95, en la proteína fosfatasa 1, y la CaMKII fosforilada en esta misma estructura cerebral (Moyano y cols., 2005). Sin embargo, la administración de una

Efectos a largo plazo

dosis *challenge* de MDMA (10 mg/kg) produce un rápido decremento de la inmunoreactividad de la PSD-95, y previene el incremento de la subunidad NR1 del receptor NMDA y la CaMKII fosforilada, las cuales son moléculas clave en la consolidación del aprendizaje (Moyano y cols., 2005). El empleo de pruebas neuropsicológicas para el estudio del aprendizaje y la memoria (evaluación de la memoria a corto plazo, del tiempo de reacción y la coordinación motora bimanual, el tiempo de estimación, la motivación y el aprendizaje, y la discriminación de color y posición) han permitido demostrar que el tratamiento crónico con MDMA produce déficits de memoria en los monos Rhesus que al parecer no están relacionados con la neurotoxicidad y la disfunción serotoninérgica (Frederick y cols., 1995; Taffe y cols., 2001; 2003).

7.2.2.4. Efectos reforzantes

Hasta la fecha, existen estudios que sugieren que la MDMA es capaz de afectar el sistema de refuerzo, así como también la sensibilidad a los efectos reforzantes de las drogas de abuso. No obstante, aún se cuestiona si los efectos reforzantes de la MDMA tienen la capacidad de inducir adicción, o si los cambios producidos por esta droga sean suficientes para producir ansia compulsiva (*craving*) y recaída tras un periodo de abstinencia. Son pocos los antecedentes que describan los efectos reforzantes de la MDMA a largo plazo, y la mayor parte de los resultados publicados hasta nuestros días se enfocan al estudio de las consecuencias de la MDMA sobre los efectos reforzantes de otras drogas de abuso como por ejemplo la cocaína. Estos estudios serán analizados con mayor detalle en un capítulo próximo, ya que en este apartado sólo mencionaremos algunas de las investigaciones dirigidas únicamente al análisis de los efectos reforzantes de la MDMA a largo plazo.

En ratas, cuando existe disponibilidad de consumir la MDMA libremente, como por ejemplo añadiendo la droga en el agua de bebida de los animales, se observa que estos desarrollan un patrón estable e individualizado de consumo. No obstante, el consumo de la MDMA disminuye con el paso del tiempo y casi cesa por completo después de 3 a 7 meses (Reinhard y Wolffgramm, 2006). Tras un periodo de abstinencia de 4 meses, los animales

no consumen el agua que contiene la MDMA cuando esta es adulterada con quinina, la cual, aporta un sabor amargo a la solución. De este modo, se ha demostrado que las ratas mantienen un modelo flexible de consumo de la droga, y no se han vuelto adictas. Asimismo, la respuesta a la novedad de las ratas, obtenida durante los ensayos de prueba antes de proporcionar la droga, se correlacionó con un posterior consumo de MDMA (Reinhard y Wolffgramm, 2006).

En contraste, se ha demostrado que la respuesta operante mantenida por la infusión intravenosa de la MDMA en ratas aumenta cuando el protocolo de tasa fija sube de 1 a 5, y disminuye cuando la droga es substituida por solución salina. No obstante, la respuesta operante aumenta nuevamente cuando se reincorpora la MDMA (Daniela y cols., 2006). Cuando cada infusión de la droga durante la fase de entrenamiento en la AA es asociada con un estímulo luminoso (EC, estímulo condicionado), se observa que la respuesta operante disminuye gradualmente cuando se suprime la droga o no se presenta el EC, pero cuando ambos factores son omitidos, la respuesta operante disminuye drásticamente y se mantiene así durante todo el periodo de prueba. De este modo, se ha sugerido que las señales asociadas con los efectos reforzantes de la MDMA desarrollan propiedades condicionadas que podrían contribuir al consumo de esta droga (Daniela y cols., 2006). Además, recientemente se ha descrito que las señales condicionadas son capaces de reinstaurar la búsqueda de la MDMA en ratas, y que existen diferencias individuales en el patrón de AA de la MDMA, las cuales, podrían predecir la magnitud de la respuesta de reinstauración (Ball y cols., 2007).

Mediante el CPL se ha encontrado que diversas drogas como la morfina o la cocaína son capaces de reinstaurar la preferencia de lugar mediante dosis *priming* de la misma u otras drogas (Ribeiro do Couto y cols., 2003; 2005a, 2005b; 2005c; 2006; Maldonado y cols., 2006; 2007). No obstante, no existen estudios enfocados a evaluar los efectos de la MDMA sobre la reinstauración del CPL inducido por la misma droga en animales de laboratorio, de hecho, se desconoce la forma en la que la exposición previa a la MDMA pudiera influir a largo plazo en los efectos reforzantes de la misma, a pesar de los antecedentes que

Efectos a largo plazo

demuestran que esta droga es capaz de inducir tolerancia o sensibilización. De hecho, sólo existe un estudio que indica que las ratas adultas con experiencia previa de MDMA (4x10 mg/kg, una inyección cada 2 h), no muestran cambios en el CPL inducido por 10 mg/kg de la misma droga, el cual, fue llevado a cabo dos semanas después de haber finalizado el tratamiento (Cole y cols., 2003).

Algunos compuestos químicos pueden presentar estructuras moleculares distintas, es decir, cada una de las moléculas que conforman un compuesto podría mostrar la misma proporción de átomos, pero la orientación espacial de los mismos podría ser distinta. Cuando dos moléculas son imágenes especulares y no pueden ser superpuestas entre sí, entonces hablamos de enantiómeros. Los enantiómeros poseen las mismas propiedades físicas y químicas, excepto por la interacción con el plano de la luz polarizada; además la mezcla de enantiómeros en una solución se denomina mezcla racémica. Se ha observado que los efectos reforzantes de una mezcla racémica de MDMA y del enantiómero R(-)-MDMA disminuyen con el tiempo en un modelo de AA intravenosa a largo plazo en primates, mientras que los efectos reforzantes de la S(+)-MDMA se mantienen por más tiempo. Además, la AA crónica de estos compuestos no afecta los marcadores serotoninérgicos y dopaminérgicos. Por tal motivo, se ha sugerido que los efectos reforzantes de la MDMA se atenúan de forma selectiva tras la administración crónica repetida de la droga, aunque estos cambios conductuales, al parecer, ocurren en ausencia de efectos neurotóxicos (Fantegrossi y cols., 2004).

Policonsumo



8. POLICONSUMO

El cambio progresivo en los patrones de consumo de las drogas es un tema controvertido, y generalmente los perfiles observados parecen apoyar la teoría “*Gateway*” o “puerta de acceso” (Kandel, 1975). Esta teoría postula que el uso de drogas específicas está asociado con un patrón secuencial de iniciación, aunque los mecanismos que regulan la trayectoria secuencial son desconocidos (MacCoun, 1998). Por ejemplo, se ha observado que la marihuana actúa como una vía de enlace entre el consumo de tabaco y alcohol, y el uso de otras drogas con mayor potencia adictiva como la cocaína (Kandel, 1975; Kandel y Faust, 1975; Kandel y cols., 1978; Yamaguchi y Kandel, 1984a; 1984b). Con respecto al éxtasis, hay quien ha sugerido que el consumo de esta droga no sería la causa fisiológica que motive el uso de drogas más “peligrosas”, sino que el factor que realmente determinaría la escalada al uso de otras sustancias sería el contexto social bajo el cual se consume esta droga (Reid y cols., 2007).

En el contexto social en el que se consume, la MDMA es apreciada como una sustancia segura, ya que la mitad de los adultos jóvenes de 19 a 30 años de edad, perciben un bajo riesgo en su consumo (Johnston y cols., 2003). Sin embargo, el uso del éxtasis podría implicar la introducción del individuo en un ámbito donde la disponibilidad de otras drogas aumenta, y donde el consumo de dichas sustancias es observado como normal o habitual. En otras palabras, las personas que comienzan a utilizar el éxtasis lo hacen porque perciben pocos riesgos, pero ellos mismos se ponen en riesgo al exponerse a diversas sustancias al frecuentar lugares en los cuales es normal el consumo de una gran variedad de drogas, y donde el éxtasis podría ser adulterado con otros componentes que son desconocidos por el propio individuo (Reid y cols., 2007). Asimismo, el éxtasis podría influir sobre el consumo de otras drogas como la cocaína y la metanfetamina. Se ha observado que los sujetos que se inician en el consumo del éxtasis a una edad tardía, mayor al promedio observado con otras sustancias, muestran un menor riesgo de consumir otras drogas como la cocaína y la metanfetamina (Reid y cols., 2007).

Policonsumo

De acuerdo con el último informe ESTUDES 2006-2007, las drogas más consumidas por los estudiantes de Enseñanzas Secundarias de 14 a 18 años han sido el alcohol, el tabaco y el cannabis. El consumo de resto de sustancias como la cocaína y el éxtasis (entre otras) es mucho más minoritario, situándose entre el 1% y el 6% la proporción de estudiantes que las ha probado alguna vez, y entre el 0.5% y el 2,3% la proporción de consumidores actuales, respectivamente. Los estudiantes que consumen drogas suelen utilizar varias sustancias y no una sola, una conducta habitualmente conocida como policonsumo. Una parte importante de los estudiantes españoles consumen varias drogas en una misma sesión, observándose una asociación bastante estrecha entre el consumo de alcohol, tabaco y cannabis por una parte, y entre el de estimulantes (como la cocaína, el éxtasis, o las anfetaminas) y los alucinógenos por otra (ESTUDES, 2007).

Los consumidores recreacionales del éxtasis habitualmente toman además de la MDMA una gran variedad de drogas psicoactivas (Scholey y cols., 2004). El consumo de cocaína se presenta en un elevadísimo porcentaje en estos sujetos, gran parte de ellos adolescentes (Butler y Montgomery, 2004). En España, el 3.3% de los estudiantes españoles han consumido éxtasis alguna vez en la vida, un 2.4% en los últimos 12 meses, y un 1.4% en los últimos 30 días. Por otro lado, la cocaína en polvo (clorhidrato de cocaína) es la segunda droga ilegal de mayor consumo tanto en España como en Europa. En conjunto, entre los estudiantes españoles un 5.7% la han consumido alguna vez en la vida, el 4.1% la ha empleado en el último año, y un 2.3% en los últimos 30 días. Cabe destacar que entre los estudiantes españoles que han consumido el éxtasis en el último año, se ha descrito que el 75.5% ha consumido también cocaína, mientras que entre los consumidores anuales de cocaína, el 44.3% también ha consumido éxtasis (ESTUDES, 2007).

En fechas recientes la ONU, en su último IMD (2007), ha establecido que los mayores índices de prevalencia de consumo de cocaína en Europa se observan en España, que además es el principal punto de entrada de esta droga en el continente. La quinta parte de los consumidores europeos de cocaína se ubican en este país, y a pesar de los esfuerzos en prevención y legislación, el uso de esta droga se ha duplicado desde un 1.6% en 1999 hasta

un 3% en 2005 entre la población general de 15 a 64 años de edad. El consumo de cocaína en Europa no es comparable con los índices descritos en España, e incluso por primera vez, los niveles de uso de esta droga en este país superan a los registros de Estados Unidos.

8.1. Cocaína

La cocaína es una droga simpaticomimética indirecta, es decir, imita las acciones periféricas de la NA en el sistema nervioso autónomo. La cocaína bloquea la captación de 5-HT, DA y NA (orden de potencia respectivamente), aumentando por consiguiente la concentración extracelular de estas monoaminas en el SNC. Al parecer, el aumento de la biodisponibilidad de DA es la causa de los efectos euforizantes de esta droga, y se cree está implicado en sus procesos de adicción, mientras que el incremento de los niveles de NA es el responsable de la mayor parte de los efectos farmacológicos y de las complicaciones agudas derivadas del consumo de la cocaína. Además, la biodisponibilidad de estos tres neurotransmisores disminuye con el consumo crónico de cocaína (Koob y Le Moal, 2005).

Diversos autores han sugerido que el consumo del éxtasis podría tener severas repercusiones sobre el funcionamiento fisiológico y psicológico del individuo, pero también hay quien afirma que dichas consecuencias podrían ser producto del consumo combinado con otras drogas. A pesar de que los usuarios de la MDMA muestran un alto consumo de cocaína, no existen estudios dirigidos a determinar las consecuencias de su empleo combinado, ya que por lo general las publicaciones disponibles describen los efectos del uso conjunto del éxtasis y alcohol o cannabis. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que a pesar de controlar el consumo de otras sustancias (como por ejemplo de cannabis), los consumidores de éxtasis muestran problemas de memoria y trastornos del sueño (Rendell y cols., 2007).

A diferencia de los policonsumidores, los usuarios del éxtasis suelen ser más impulsivos, buscan constantemente nuevas sensaciones y realizan habitualmente actividades de riesgo (Butler y Montgomery, 2004). En contraste, hay quien afirma que los problemas

Policonsumo

observados en los consumidores de la MDMA, no pueden atribuirse al consumo único de esta droga (Roiser y Sahakian, 2004), y que el consumo recreativo de diversas sustancias, más que el consumo del éxtasis *per se*, puede inducir daños cognitivos (Hoshi y cols., 2007). En el caso del cannabis, se plantea que algunos efectos neuropsicobiológicos de esta droga y la MDMA podrían interactuar, produciendo más alteraciones que las observadas con su consumo individual (Daumann y cols., 2001; Parrott y cols., 2007). Debido al posible daño neurotóxico serotoninérgico del éxtasis, los consumidores regulares de esta droga muestran una mayor prevalencia de cambios conductuales y trastornos afectivos. Sin embargo, hay algunos estudios que sugieren que la relación entre el consumo del éxtasis y los problemas psicológicos no son significativos cuando se controla el uso del cannabis (Morgan y cols., 2002). Cabe destacar que los ingredientes activos que se encuentran en el cannabis, pueden ser neuroprotectores bajo ciertas condiciones, y existe la posibilidad de que los consumidores del éxtasis, que también consumen el cannabis, quizás sean menos susceptibles a los daños producidos por el éxtasis. No obstante, se ha sugerido que el consumo combinado de ambas drogas no reduce la probabilidad del daño cognitivo (Fisk y cols., 2006). Con respecto al alcohol, los usuarios del éxtasis muestran una alta prevalencia de desórdenes relacionados con el abuso de sustancias, principalmente los asociados a esta droga (Lieb y cols., 2002). La combinación del éxtasis y del alcohol produce una euforia prolongada y bienestar. Estos efectos son más intensos que los producidos por cada droga individual. La MDMA revierte la sedación subjetiva inducida por el alcohol, pero no reduce la sensación de embriaguez. Los sujetos pueden sentirse eufóricos y menos sedados, y podrían tener sensaciones de hacer mejor las cosas, aunque su desempeño seguirá mostrando deficiencias relacionadas con el alcohol (Hernández-López y cols., 2002).

En contraste a los estudios llevados a cabo en los seres humanos, la investigación en animales de laboratorio ha permitido hacer un estudio más completo sobre los efectos derivados de la administración conjunta de diversas drogas. En el caso de la cocaína y el éxtasis habitualmente se analizan los efectos reforzantes de ambas drogas mediante los modelos de AA intravenosa y el CPL en animales adultos, pero hay que recordar que estas

sustancias suelen consumirse en gran medida durante el periodo adolescente y lamentablemente existen pocos antecedentes al respecto.

La cocaína (20 mg/kg) produce un incremento de la concentración extracelular de DA en el NAcc de la rata, siendo este efecto favorecido por el tratamiento previo con MDMA (2x20 mg/kg/día durante cuatro días consecutivos) (Morgan y cols., 1997). A nivel conductual, Kalivas y cols., (1998) observaron que los animales que han sido tratados previamente con dosis altas de MDMA muestran potenciación de los efectos estimulantes motores de la cocaína.

Por otra parte, Sumnall y cols., (2004) investigaron si el tratamiento previo con MDMA alteraba los efectos conductuales de otras sustancias psicoactivas como la anfetamina, el alcohol, la heroína, la cocaína, e incluso de la misma MDMA, en ratas adultas sometidas al LEC. A pesar de que la exposición a la MDMA disminuyó (20-25%) las concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA en el hipocampo, el régimen empleado por estos investigadores no modificó la respuesta conductual de los animales en el laberinto elevado en ningún grupo experimental.

Los efectos reforzantes de la cocaína se deben a su capacidad para incrementar la transmisión dopaminérgica de las neuronas mesocorticolímbicas, consideradas como el sustrato neural del refuerzo. Así, esta droga favorece la liberación de la DA en las regiones terminales de las neuronas dopaminérgicas, especialmente de la región ventromedial del NAcc. Las lesiones del sistema mesocorticolímbico mediante la administración de neurotoxinas dopaminérgicas bloquean los efectos reforzantes de la cocaína, pero también se han observado cambios en la AA de cocaína mediante la inyección de antagonistas serotoninérgicos, bloqueadores de la captación de 5-HT, y lesiones con neurotoxinas serotoninérgicas, encontrando evidencia de alteraciones del efecto reforzante de la cocaína (Koob y Le Moal, 2005).

Policonsumo

La neurotoxicidad serotoninérgica, así como también el aumento de las concentraciones extracelulares de DA inducidas por la MDMA, quizás modulen la sensibilización cruzada a los efectos reforzantes de la cocaína. Fletcher y cols., (2001) demostraron que la exposición previa a la MDMA favorece a largo plazo la AA intravenosa de cocaína en las ratas adultas. Dos semanas después de haber finalizado un tratamiento con 20 mg/kg de MDMA (dos veces al día durante cuatro días consecutivos), los investigadores evaluaron la adquisición espontánea de la AA intravenosa de cocaína a una dosis que no produce AA (0.1 mg). En cada sesión de prueba, los animales fueron colocados en una cámara con dos palancas de respuesta, la presión de una palanca determinada proporcionaba una infusión de cocaína (activa), mientras que la segunda palanca no tenía respuesta programada (inactiva). De esta forma, las ratas con experiencia previa de MDMA mostraron un mayor número de respuestas por la palanca activa, y obtuvieron un mayor número de infusiones en comparación con el grupo salino.

Por otro lado, Fone y cols., (2002) han descrito que después de un periodo de abstinencia, tras la administración repetida de MDMA en ratas adolescentes, se observa un aumento de los efectos reforzantes de la cocaína aún en ausencia de neurotoxicidad serotoninérgica. Los autores administraron 7.5 mg/kg de MDMA (dos veces al día durante 3 días consecutivos) en ratas adolescentes de 39 días de edad. Dos meses después de haber finalizado el tratamiento, realizaron un CPL inducido por 5 mg/kg de cocaína, y llevaron a cabo estudios *post-mortem* para determinar posibles efectos neurotóxicos serotoninérgicos o dopaminérgicos. Estos investigadores determinaron que el protocolo de cocaína empleado no induce preferencia de lugar por sí solo. No obstante, la experiencia previa de la MDMA aumentó considerablemente el tiempo que los animales permanecieron en el compartimento asociado a la cocaína. Al mismo tiempo, el tratamiento previo con la MDMA no tuvo la capacidad suficiente para inducir efectos neurotóxicos significativos en estructuras como la corteza frontal, el hipocampo y el tallo cerebral. En definitiva, ya que las acciones de la cocaína sobre el NAcc regulan su potencial de abuso, se ha sugerido que el consumo de la MDMA podría aumentar la vulnerabilidad al abuso de la cocaína, aún en ausencia de

neurotoxicidad serotoninérgica (Morgan y cols., 1997; Horan y cols., 2000; Fletcher y cols., 2001; Fone y cols., 2002).

En comparación con las ratas adultas, la administración repetida de la MDMA en ratas adolescentes produce diferentes efectos conductuales en el CPL. Recientemente, Åberg y cols., (2007) demostraron que la experiencia previa a la MDMA, favorece los efectos reforzantes de la cocaína en las ratas adolescentes, mientras que en los animales adultos dichos efectos se atenúan. Por lo tanto, estos autores estiman que la exposición a la MDMA durante la adolescencia, podría incrementar la vulnerabilidad a los efectos estimulantes de las drogas de abuso.

En ratones, se ha demostrado que la experiencia previa a la MDMA no modifica la magnitud de la preferencia de lugar inducido por 20 mg/kg de cocaína (Achat-Mendes y cols., 2003). No obstante, tras un periodo de abstinencia (extinción del CPL), la inyección de una dosis *priming* de 5 mg/kg de cocaína es capaz de reinstaurar la preferencia de lugar sólo en aquellos animales que recibieron previamente la MDMA. Asimismo, el tratamiento previo con esta droga produce sensibilización a los efectos motores de la cocaína, caracterizada por un aumento considerable de la respuesta motora producida por la dosis *priming* de cocaína (Achat-Mendes y cols., 2003).

El ratón Swiss Webster es un modelo animal útil en la inducción de una neurotoxicidad selectiva. Así, se ha demostrado que esta cepa muestra un decremento de los marcadores dopaminérgicos, serotoninérgicos, o incluso de ambos (DA/5-HT), tras la administración de drogas como la metanfetamina, la fenfluramina o la MDMA, respectivamente (Itzhak y cols., 2003; Achat-Mendes y cols., 2005). Con la ayuda de estos animales, Achat-Mendes y cols., (2005) evaluaron la influencia de la neurotoxicidad monoaminérgica sobre el condicionamiento apetitivo (inducido por metanfetamina o cocaína) y aversivo (producido por el cloruro de litio) en ratones adultos. De esta forma, los investigadores observaron que: (1) la neurotoxicidad serotoninérgica y la neurotoxicidad dopaminérgica inducen efectos opuestos en el CPL. La neurotoxicidad dopaminérgica disminuye la preferencia de lugar

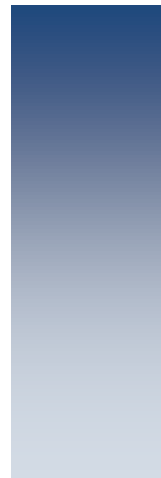
Policonsumo

inducida por la cocaína o la metanfetamina, mientras que la neurotoxicidad serotoninérgica la favorece. Por otro lado, (2) la lesión de ambos sistemas de neurotransmisión afecta el condicionamiento aversivo de lugar (CAL), ya que el tratamiento neurotóxico con la MDMA atenúa el CAL inducido por el cloruro de litio. Finalmente, (3) los autores han sugerido que el condicionamiento apetitivo pavloviano es modulado por los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico, ya que al igual que con algunas neurotoxinas (6-OHDA y 5,7-DHT, neurotoxinas DA y 5-HT respectivamente), las lesiones producidas por los derivados anfetamínicos (metanfetamina, fenfluramina y la MDMA) afectan el condicionamiento apetitivo en ratones.

Cole y cols., (2003) observaron que el tratamiento previo con la MDMA no afecta los efectos reforzantes de la anfetamina, la cocaína, la heroína, o incluso de la misma MDMA en el CPL. Dos semanas después de haber finalizado un tratamiento con MDMA (4x10 mg/kg, una inyección cada 2 horas), evaluaron el CPL inducido por diversas drogas de abuso. Estos investigadores demostraron que la experiencia previa a la MDMA, no modifica la magnitud de la preferencia de lugar inducida por algunas drogas como la d-anfetamina (3 mg/kg), la cocaína (20 mg/kg), la heroína (0.5 mg/kg), y la misma MDMA (10 mg/kg). En contraste, Horan y cols., (2000) observaron que la experiencia previa a la MDMA favorece considerablemente la preferencia de lugar inducida por la cocaína. A diferencia del tratamiento previo empleado por Cole y cols., (2003), estos autores administraron dos inyecciones diarias de 20 mg/kg de MDMA, durante cuatro días consecutivos. Horan y cols., (2000) demostraron que la cocaína (5, 10, o 20 mg/kg) produjo preferencia de lugar de forma dependiente de la dosis, pero la respuesta a esta droga aumentó considerablemente en los animales tratados previamente con la MDMA. Por lo tanto, estos autores sugirieron que el decremento de la concentración de 5-HT producido por la administración de la MDMA, posiblemente altere la respuesta del sistema dopaminérgico central, favoreciendo en consecuencia las propiedades recompensantes y apetitivas de la cocaína.

En un estudio reciente, Diller y cols., (2007) han observado que la cocaína produce preferencia de lugar de forma dependiente de la dosis en ratas adultas, mientras que la MDMA al parecer sólo induce CPL con dosis bajas como 5 mg/kg, pero no con 10 mg/kg. Curiosamente, cuando ambas drogas se inyectan juntas, la administración de una dosis baja de MDMA (5 mg/kg) suprime el CPL inducido por la cocaína (2.5 y 5 mg/kg). Sin embargo, cuando se aumenta la dosis de MDMA (10 mg/kg) los efectos reforzantes de la cocaína en el condicionamiento de lugar se atenúan. Por lo tanto, estos autores han sugerido que los efectos conductuales y neuroquímicos de la MDMA y la cocaína observados de forma individual, se alteran dramáticamente cuando ambas drogas son administradas al mismo tiempo, ya que al parecer, se produce un antagonismo de efectos que sólo se revierte a dosis altas. De acuerdo con lo anterior, es posible que el uso frecuente, o de grandes cantidades de MDMA, potencie los efectos de la cocaína, quizás mediante un decremento de los niveles de 5-HT y el posterior aumento de los niveles de DA (Horan y cols., 2000; Achat-Mendes y cols., 2003; Diller y cols., 2007). Algunos autores como Clemens y cols., (2006) han observado que la MDMA también reduce la AA intravenosa de metanfetamina, probablemente mediante mecanismos inhibitorios inducidos por la 5-HT liberada por la MDMA, la cual, actúa sobre los sistemas dopaminérgicos implicados en la AA de la metanfetamina.

Hipòtesis y Objectivos



9. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

9.1. Hipótesis

Las hipótesis que planteamos en la presente tesis doctoral fueron las siguientes:

La administración conjunta de MDMA y cocaína producirá efectos agudos mayores y diferentes a los producidos por cualquiera de estas drogas por separado, sobre la conducta motora, la ansiedad y la memoria.

La administración conjunta de MDMA y cocaína producirá efectos neuroquímicos agudos sobre la dopamina, la serotonina y sus metabolitos, diferentes a los producidos por cualquiera de estas drogas por separado.

La administración repetida de la MDMA, la cocaína, o ambas drogas durante la adolescencia producirá efectos conductuales a largo plazo que persistirán en la vida adulta y modificarán las relaciones sociales o la ansiedad de los animales.

La administración repetida de la MDMA durante la adolescencia producirá efectos neuroquímicos a largo plazo con una disminución en la concentración de dopamina, sin afectación serotoninérgica.

La administración repetida de la MDMA más cocaína durante la adolescencia producirá efectos neuroquímicos a largo plazo diferentes a los producidos por la MDMA sola sobre la neurotransmisión dopaminérgica y/o serotoninérgica.

La MDMA inducirá CPL que dependerá del protocolo de condicionamiento empleado.

EL CPL inducido por la MDMA se verá afectado si esta droga induce neurotoxicidad dopaminérgica.

Hipótesis y Objetivos

El CPL inducido por la MDMA podrá ser reinstaurado, tras la extinción de la preferencia, administrando dosis *priming* de esta misma droga.

La exposición repetida durante la adolescencia a la MDMA, la cocaína, o ambas drogas incrementará los efectos reforzantes y la vulnerabilidad a la recaída de la cocaína utilizando el procedimiento de CPL.

La exposición repetida durante la adolescencia a la MDMA, la cocaína, o ambas drogas incrementará los efectos reforzantes y la vulnerabilidad a la reinstauración de la MDMA utilizando el procedimiento de CPL.

9.2. Objetivos

Con el fin de comprobar las hipótesis propuestas se realizaron los diferentes trabajos experimentales expuestos en la presente “Tesis Doctoral”, cuyos objetivos más concretos fueron los siguientes:

9.2.1. Objetivos del estudio 1

Evaluar los efectos agudos de la administración en ratones adolescentes de MDMA sola, o en combinación con cocaína sobre la actividad motora, la ansiedad (utilizando el laberinto elevado en cruz y la prueba de interacción social) y la memoria (utilizando la prueba de la evitación pasiva).

Constatar los cambios neuroquímicos agudos originados por la administración de la MDMA sola, o en combinación con cocaína, determinando las concentraciones de dopamina, DOPAC, HVA, serotonina y 5-HIAA en estriado, corteza e hipocampo de ratones adolescentes.

9.2.2. Objetivos del estudio 2

Evaluar si la cocaína altera los efectos a largo plazo que el consumo de MDMA durante en la adolescencia produce sobre la ansiedad en los animales adultos, utilizando la prueba de interacción social.

Determinar los cambios que sobre la temperatura corporal induce una pauta de administración repetida de MDMA sola o en combinación con cocaína.

Constar los cambios neurotóxicos a largo plazo originados por la administración de MDMA sola o en combinación con cocaína, determinando las concentraciones de dopamina, DOPAC, HVA, serotonina y 5-HIAA en estriado, corteza e hipocampo de ratones adultos.

Determinar si los cambios conductuales observados a largo plazo tras la administración de MDMA sola o en combinación con cocaína se relacionan con un posible daño neurotóxico.

9.2.3. Objetivos del estudio 3

Constar si el procedimiento de condicionamiento afecta a los resultados del CPL inducido por la MDMA, comparando los resultados de un condicionamiento en cuatro días alternos con otro en cuatro días consecutivos.

Determinar si la neurotoxicidad inducida por la pauta de administración de la MDMA influye en el desarrollo de CPL.

Constar si el CPL inducido por la MDMA puede ser reinstaurado con dosis *priming* de esta misma droga, una vez extinguida la preferencia.

Hipótesis y Objetivos

9.2.4. Objetivos del estudio 4

Evaluar el CPL inducido por la MDMA en ratones adultos expuestos a la MDMA, la cocaína, o ambas drogas durante la adolescencia.

Evaluar el CPL inducido por la cocaína en ratones adultos expuestos a la MDMA, la cocaína, o ambas drogas durante la adolescencia.

Evaluar el efecto de la exposición repetida a la MDMA, la cocaína, o ambas drogas sobre la reinstauración mediante dosis *priming* del CPL inducido por la MDMA.

Evaluar el efecto de la exposición repetida a la MDMA, la cocaína, o ambas drogas sobre la reinstauración mediante dosis *priming* del CPL inducido por la cocaína.

Estudio 1. Efectos conductuales y neurotóxicos de la MDMA sola o en combinación con cocaína en ratones adolescentes



10. Estudio 1. Efectos conductuales y neurotóxicos agudos de la MDMA sola o en combinación con cocaína en ratones adolescentes

Este estudio ha sido publicado en “*Neurotoxicology and Teratology* (2009) 31:49-59”, ver anexo I.

10.1. Introducción

La MDMA es consumida habitualmente por adolescentes y adultos jóvenes. En comparación con los sujetos que no consumen esta droga, los usuarios del éxtasis muestran un mayor consumo de otras sustancias (Rodgers, 2000), y en particular, la cocaína es consumida regularmente por el 43,8% de los usuarios de la MDMA (National Survey on Drug Use and Health, 2004; Wish y cols., 2006). Por otro lado, los policonsumidores del éxtasis describen con frecuencia diversos problemas, como ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo, psicosis, somatización, déficits de memoria, y alteraciones de los procesos de juicio social y emocional (Parrott y cols., 2001; Montgomery y cols., 2005; Reay y cols., 2006).

Numerosos estudios han determinado los efectos neuroquímicos y conductuales de la MDMA en roedores; sin embargo, muy pocos han evaluado las consecuencias de esta droga cuando se combina con otros psicoestimulantes. Algunas investigaciones pre-clínicas se han enfocado en las consecuencias a largo plazo del tratamiento previo con la MDMA, sobre la exposición subsecuente a la cocaína (Horan y cols., 2000; Achat-Mendes y cols., 2003; Åberg y cols., 2007), aunque se desconocen los efectos que se producen cuando ambas drogas se administran al mismo tiempo. Recientemente, un estudio ha evaluado los efectos de la administración simultánea de la MDMA y la cocaína en ratas adultas sometidas al CPL (Diller y cols., 2007). Estos autores han observado que ambas drogas son capaces de inducir preferencia de lugar cuando se administran de forma individual, pero cuando son inyectadas al mismo tiempo, se induce un antagonismo entre ambas que se revierte sólo a dosis elevadas. Estos resultados sugieren que los efectos neuroquímicos y

Estudio 1

conductuales producidos por el tratamiento único con la MDMA o la cocaína, son alterados radicalmente cuando ambas drogas son administradas simultáneamente.

La adolescencia representa un periodo de gran vulnerabilidad biológica a las propiedades adictivas de los psicoestimulantes (Compas y cols, 1995), y constituye un periodo ontogénico único durante el cual, diversos procesos neuroanatómicos, neuroquímicos y neurofisiológicos, modulan la plasticidad del cerebro en desarrollo. Los cambios inducidos durante la maduración cerebral se caracterizan por una serie de transiciones de las funciones cognitivas, psicológicas y sociales, así como también, por alteraciones conductuales y farmacológicas específicas de la edad (Spear y Brake, 1983; Witt, 1994). Del mismo modo, los roedores periadolescentes muestran un perfil conductual propio, y son muy sensibles a la administración de psicoestimulantes (Terranova y cols., 1993; 1998; Laviola y cols., 1999; Spear, 2000b). Por lo tanto, estos animales son considerados como un modelo útil para el estudio de los factores de riesgo asociados con la vulnerabilidad a los trastornos del comportamiento adolescente en los seres humanos (Laviola y cols., 1999).

El objetivo de nuestro primer estudio es evaluar los efectos agudos de la administración de MDMA sola, o en combinación con cocaína, en diversos parámetros conductuales. Además, evaluaremos los cambios neuroquímicos originados por la administración simultánea de ambas drogas en diferentes estructuras cerebrales. Por tal motivo, los efectos agudos de la MDMA, la cocaína, o ambas drogas conjuntamente, serán evaluados en ratones adolescentes sometidos a las pruebas de actividad locomotora espontánea, LEC, interacción social y evitación pasiva. Del mismo modo, determinaremos la concentración de monoaminas cerebrales en estructuras como el estriado, el hipocampo y la corteza, 25 minutos después de la administración de dichas sustancias.

10.2. Material y Métodos

10.2.1. Sujetos

En la realización de este estudio se utilizaron un total de 397 ratones albinos macho de la cepa OF1 adquiridos a los laboratorios Charles River (Barcelona, España): 315 fueron utilizados como sujetos experimentales y los restantes como oponentes estándar. Los animales tenían 21 días de edad (10-13 gr) a su llegada a nuestro laboratorio y fueron alojados en grupos de 4 en cajas de plástico opacas (28 cm x 28 cm x 14.5 cm).

Las condiciones ambientales del laboratorio se controlaron permanentemente y fueron las siguientes: temperatura constante (21 ± 2 °C), ciclo de luz 12/12 h (fase con luz apagada de 7:30 a 19:30 h). Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento, excepto durante las pruebas conductuales, aunque si durante la prueba de actividad motora. La limpieza de las jaulas se realizó una vez por semana.

Los procedimientos de tratamiento y cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices marcadas por la comunidad internacional recogidas en: European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 de noviembre de 1986).

10.2.2. Tratamiento farmacológico y diseño experimental

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente (ip) con diferentes dosis de hidrocloreuro de MDMA (Laboratorios SIGMA-ALDRICH, España), e hidrocloreuro de cocaína (Laboratorios Alcaliber, Madrid). Las dosis fueron administradas de forma proporcional al peso del animal en un volumen de 0.01 ml/g y disueltas en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%). Los ratones de los grupos control fueron inyectados con suero fisiológico.

Estudio 1

A los 28 días de edad (DP 28), tras un periodo de adaptación al laboratorio (7 días), los animales adolescentes recibieron suero fisiológico (M0), 5, 10, o 20 mg/kg de MDMA (M5, M10 o M20), 25 mg/kg de cocaína (Coc), o 25 mg/kg de cocaína en combinación una de las dosis de MDMA (Coc-M5, Coc-M10 o Coc-M20). Las pruebas conductuales comenzaron 25 minutos después de la administración, excepto para la actividad locomotora, la cual se registró inmediatamente después de la administración del fármaco. Otro grupo de animales se empleó para la determinación de monoaminas cerebrales.

10.2.3. Aparatos y procedimiento

Los diferentes aparatos empleados en la realización de este estudio se muestran en la Figura 8.

10.2.3.1. Actividad locomotora

El equipo de actividad locomotora se encuentra ubicado en el animalario y consiste en un sistema de ocho bastidores de 16 fotocélulas cada uno. Cada bastidor se encuentra conectado a una interfase que permite que los datos sean registrados por un ordenador IBM PC y se transformen en “cuentas de actividad” mediante un programa informático (software ILA Cibertec S. A., España) diseñado específicamente para esta prueba. La actividad locomotora de los animales fue registrada tras la administración de los fármacos o el vehículo durante un periodo de 6 horas.

10.2.3.2. LEC

El LEC consiste en un laberinto en forma de cruz elevado 45 cm del suelo, con dos brazos abiertos (30 cm de largo x 5 cm de ancho) y dos brazos cerrados (30 cm de largo x 5 cm de ancho x 15 cm de alto) que convergen en una plataforma central (5 x 5 cm). El piso del laberinto es de plexiglás negro y las paredes de los brazos cerrados de plexiglás translúcido. Los brazos abiertos presentan un pequeño borde (0.25 cm) para proporcionar al animal un

pequeño soporte adicional. Para facilitar la adaptación de los animales estos fueron transportados a la sala experimental una hora antes de la prueba y se mantuvieron con una iluminación roja de baja intensidad. Al comienzo de cada ensayo, el ratón fue colocado en la plataforma central del laberinto de cara a uno de los brazos abiertos y se le permitió explorar el LEC durante 5 minutos. El laberinto fue limpiado con un algodón humedecido con alcohol después de cada ensayo. Todas las pruebas fueron registradas con una cámara de vídeo para su posterior análisis en donde se evaluaron las siguientes conductas: (1) número de entradas totales a los brazos; (2) número de entradas a los brazos abiertos; (3) número de entradas a los brazos cerrados; (4) porcentaje de entradas a los brazos abiertos; (5) porcentaje de entradas a los brazos cerrados; (6) porcentaje del tiempo en la plataforma central; (7) tiempo total en brazos abiertos; (8) tiempo total en brazos cerrados y (9) tiempo total en la plataforma central. Se considera como entrada a un brazo (abierto o cerrado) cuando las cuatro patas del animal se encuentran sobre el brazo.

El incremento en el tiempo que pasa el ratón en los brazos abiertos y el porcentaje de entradas a los brazos abiertos es convencionalmente utilizado para caracterizar los efectos ansiolíticos de las drogas u otras manipulaciones. El total de entradas a los brazos es considerado como una medida de actividad de los animales, aunque también se considera que las entradas a los brazos cerrados son un buen indicador de esta actividad.

10.2.3.3. Prueba de interacción social

Esta prueba consistió en la confrontación entre un animal experimental y un oponente estándar en una caja neutral (61 x 30.5 x 36 cm) durante 10 minutos tras un periodo previo de habituación (1 min). Los ratones oponentes fueron anosmiados temporalmente mediante un lavado intranasal con una solución de sulfato de zinc al 4% realizado 24 horas antes de la prueba (Smoothy y cols., 1986). Esta clase de animales inducen una respuesta de ataque en su oponente, pero no son capaces de agredir o defenderse puesto que no perciben una feromona presente en la orina de los animales experimentales, la cual en condiciones normales, es una señal que induce un aumento de la conducta agresiva en los ratones

Estudio 1

(Mugford y Nowell, 1970; Brain y cols., 1981). El comportamiento de los animales fue grabado con una videocámara bajo condiciones de iluminación óptima. Las cintas de video fueron analizadas posteriormente con un programa informático (Ratón Time) adaptado específicamente para esta prueba. Este sistema permitió estimar los tiempos asignados a las diferentes categorías conductuales como la exploración no social, la investigación social, la amenaza, el ataque, o la evitación/huída, caracterizadas por una serie de diferentes posturas y elementos (Rodríguez-Arias y cols., 1998).

10.2.3.4. Evitación pasiva

El experimento se realizó utilizando una caja de evitación pasiva (Ugo Basile modelo 7553, distribuida por Cibertec S. A., Madrid, España), con dos compartimientos de igual tamaño (18 cm de largo x 10 cm de ancho x 16 cm de alto) que presentan las paredes pintadas de diferente color. Uno de los compartimientos está pintado de color blanco y además está iluminado, siendo el otro compartimiento de color negro careciendo de iluminación. El piso de la caja es una rejilla metálica y ambos compartimientos se encuentran separados por una pared que presenta una puerta deslizante de apertura y cierre automático. La caja está controlada por una interfase (Passive Avoidance Controller cat. 7551, Hugo Basile, Italia) que además muestra los datos experimentales.

La prueba de evitación pasiva se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Aguilar y cols., (2000). En la fase de adquisición o pre-prueba, los animales son colocados en el compartimiento blanco, en dirección opuesta a la puerta que divide los compartimientos. Tras un minuto de habituación, la puerta se abre y el animal tiene libre acceso al segundo compartimiento. Cuando el ratón pasa al compartimiento oscuro la puerta se cierra automáticamente, y el animal recibe una descarga eléctrica de baja intensidad y de corta duración (0,5 mA, 3 seg). Una vez registrada la latencia de entrada, el animal es alojado nuevamente en el animalario. Veinticuatro horas después se lleva a cabo una nueva sesión conocida como fase de retención o prueba. El protocolo empleado en la primera fase se repite nuevamente, con la diferencia de que el ratón no recibirá la descarga

eléctrica si pasa al compartimiento oscuro. El tiempo de la latencia de entrada se inicia con la apertura de la puerta. Si el ratón no entra en el compartimiento oscuro, ya sea en la fase de pre-prueba o de prueba, el registro de la latencia finaliza a los 5 minutos (300 s). La diferencia entre las latencias de entrada de ambas fases, de pre-prueba y de prueba, se considera una medida de memoria. Se considera que el animal aprende cuando la latencia de entrada es mayor durante la fase de prueba en comparación con la fase de pre-prueba.

10.2.3.5. Análisis de monoaminas cerebrales

En esta prueba los animales fueron sacrificados por fractura cervical 25 minutos después de la administración del fármaco o vehículo. Para la disección de las regiones cerebrales hemos empleado una modificación de la técnica propuesta por Heffner y cols., (1980). En un tiempo aproximado de 2 minutos se extrae el cerebro y se coloca sobre una base de cristal enfriada con ayuda de nieve carbónica. El estriado, la corteza, y el hipocampo, son diseccionados y se almacenan a una temperatura de -80°C. El día del análisis, las muestras se descongelan, se pesan, y posteriormente se homogenizan en 200 µl de ácido perclórico (0.1 N) por medio de ultrasonidos. Las muestras son centrifugadas a 11000 r.p.m. durante 30 minutos. Los sobrenadantes son divididos en alícuotas para realizar el análisis de monoaminas. La determinación de DA, DOPAC, HVA, 5-HT, y 5-HIAA se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC, Agilent series 1100). Las muestras pasan a un flujo constante de 1 ml/min a una temperatura de 21°C a través de una columna (0.5 µm, 12.5 cm, 4.6 cm; Agilent Zorbax High Pressure Cartige Guard-column) con ayuda de una fase móvil isocrática constituida por ácido cloracético 0.10 M (ácido acético), EDTA 0.70 mM, octilsulfato de sodio 1.0 mM (sulfato de sodio, pH 3.25), diluidos en metanol al 14%. Los analitos son oxidados por un electrodo de carbón cristalizado mantenido a 300 mV y contrastados con un electrodo de referencia de Ag/AgCl (plata/cloruro de plata). La separación completa de las monoaminas se alcanza en 25 min. Los datos son registrados y analizados mediante un software Merk-Hitachi (modelo D-7000). Los niveles de 5-HT, y 5-HIAA fueron analizados en el estriado, la corteza y el

Estudio 1

hipocampo. Por otra parte, los niveles de DA, DOPAC, y HVA fueron analizados en el estriado.

10.3. Análisis estadístico

Los datos referentes a la interacción social, el LEC, y las monoaminas en cada una de las estructuras empleadas, se analizaron con un ANOVA de dos niveles (“tratamiento” con cocaína x “dosis” de MDMA). La primera variable “entre” (tratamiento con cocaína) tenía dos niveles: salino (M0, M5, M10 y M20) y cocaína (Coc, Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20). La segunda variable “entre” (dosis de MDMA) tenía 4 niveles: 0 (M0 y Coc), 5 (M5 y Coc-M5), 10 (M10 y Coc-M10) y 20 mg/kg (M20 y Coc-M20).

La actividad motora y la prueba de evitación pasiva se analizaron mediante un ANOVA de tres niveles, con las dos variables “entre” mencionadas anteriormente, y una variable “intra” (tiempo registrado: seis niveles para la actividad motora y dos niveles para la prueba de evitación pasiva). Cuando estaba indicado, se realizaron comparaciones “post-hoc” con la prueba de Newman-Keuls o la prueba de efectos simples. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar (S.E.M).

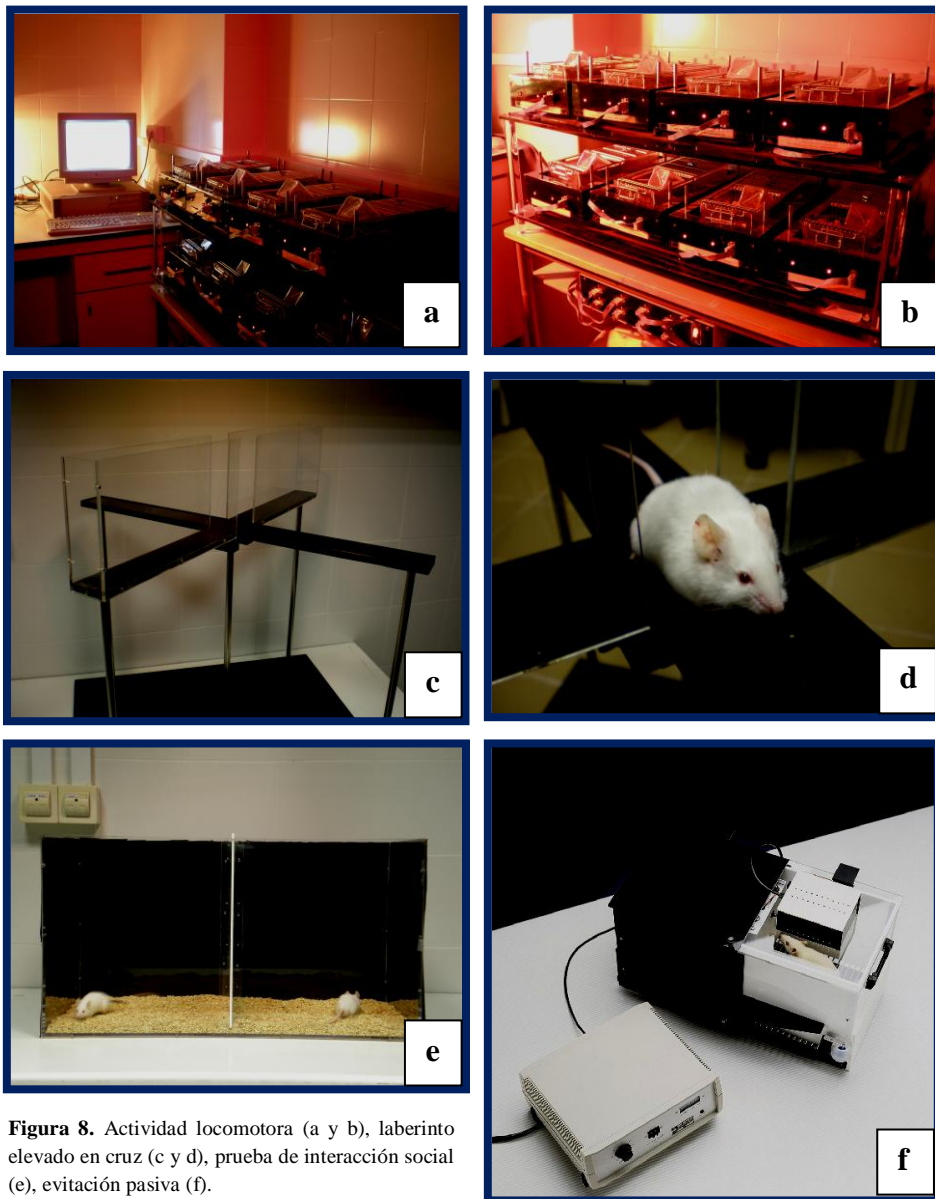


Figura 8. Actividad locomotora (a y b), laberinto elevado en cruz (c y d), prueba de interacción social (e), evitación pasiva (f).

Estudio 1

10.4. Resultados

10.4.1. Actividad locomotora

El ANOVA reveló que los grupos tratados con 10 y 20 mg/kg de MDMA, y aquellos que recibieron sólo cocaína o en combinación con las diferentes dosis de MDMA, mostraron una mayor actividad locomotora en los primeros 25 minutos tras la administración de las drogas (Figura 9), en comparación con los tratados con el suero fisiológico o con 5 mg/kg de MDMA ($p < 0.01$).

El análisis estadístico de las primeras 6 horas posteriores a la administración de los fármacos (Figuras 10 y 11) indicó que, cuando se considera en conjunto [$F(1,50)=8.686$; $p < 0.004$], los 4 grupos tratados con cocaína mostraron una mayor actividad que los animales tratados sólo con MDMA ($p < 0.01$). Por otro lado, los ratones que recibieron 20 mg/kg de MDMA sola (M20), o en combinación con cocaína (Coc-M20) [$F(3,50)=12.022$; $p < 0.0001$], exhibieron una mayor actividad que el resto de los grupos ($p < 0.05$ con respecto a M10 y Coc-M10, y $p < 0.01$ para los demás).

En general, todos los animales fueron más activos durante las primeras 2 horas del registro [$F(5,250)=122.254$; $p < 0.0001$], pero los ratones tratados con cocaína sola [$F(5,250)=3.811$; $p < 0.002$], o en combinación con la MDMA, fueron más activos durante la primera ($p < 0.004$), la quinta ($p < 0.01$) y la sexta ($p < 0.002$) hora de registro. No obstante, en los grupos que recibieron la dosis más alta de MDMA (M20 y Coc-M20), se produjo un incremento de la actividad motora en las primeras 4 horas de la prueba ($p < 0.01$).

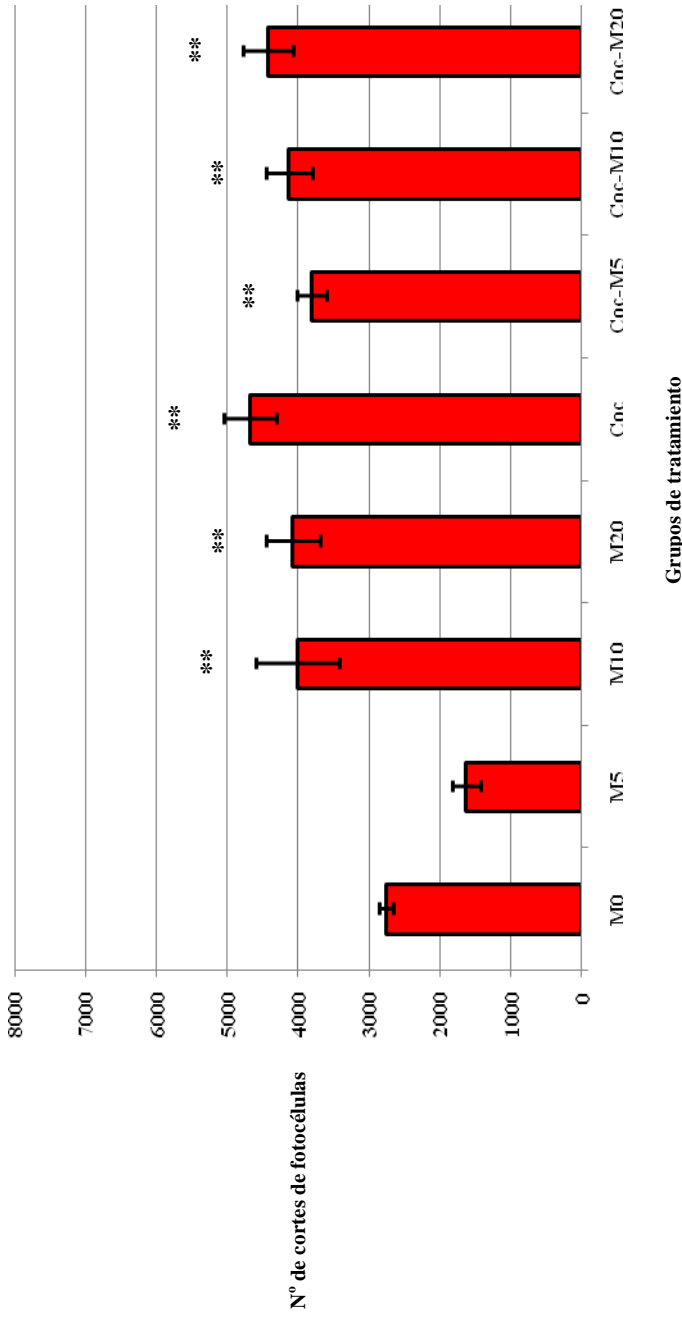


Figura 9. Los datos muestran las medias (\pm el error estándar) de los primeros 25 minutos del registro de la actividad locomotora de ratones adolescentes tratados con: salino, **M0** (n=8); 5, 10 o 20 mg/kg de MDMA, **M5** (n=10), **M10** (n=8), **M20** (n=8); 25 mg/kg de cocaína, **Coc** (n=8); o 25 mg/kg de cocaína en combinación con una dosis de MDMA, **Coc-M5** (n=8), **Coc-M10** (n=8), **Coc-M20** (n=8). Diferencias significativas con respecto a los grupos M0 y M5 ** p<0.01.

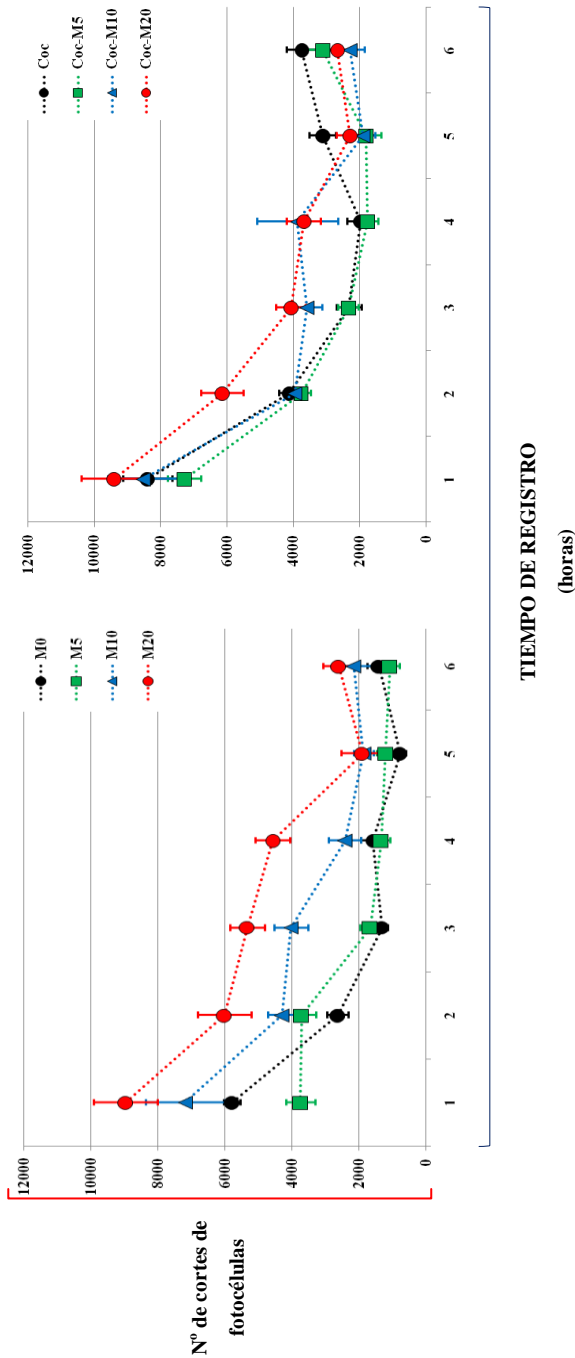


Figura 10. Los datos muestran las medias (\pm el error estándar) del registro de la actividad locomotora (6 horas) de ratones adolescentes tratados con MDMA sola (gráfica izquierda) o en combinación con cocaína (gráfica derecha). **M0**, ratones tratados con salino n=8; **M5**, ratones tratados con 5 mg/kg de MDMA n=8; **M10**, ratones tratados con 10 mg/kg de MDMA n=8; **M20**, ratones tratados con 20 mg/kg de MDMA n=8; **Coc**, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y salino, n=8; **Coc-M5**, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 5 mg/kg de MDMA n=8; **Coc-M10**, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 10 mg/kg de MDMA n=8; **Coc-M20**, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 20 mg/kg de MDMA n=8.

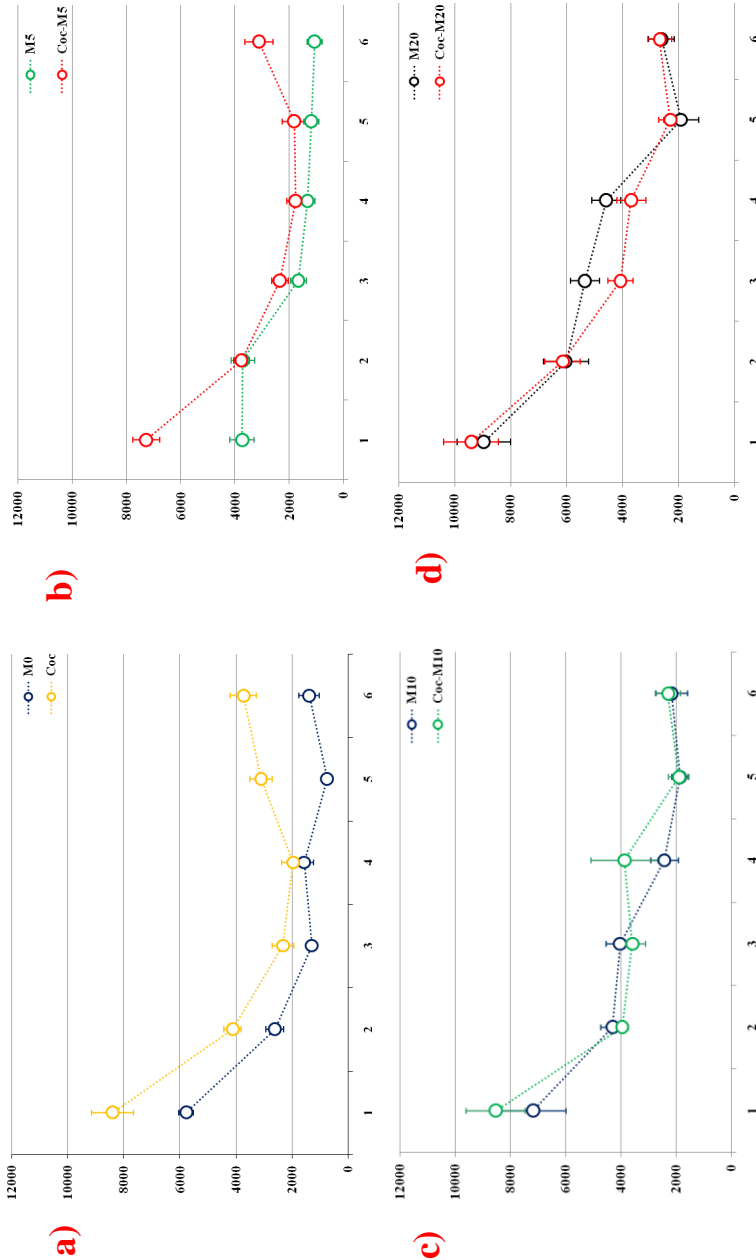


Figura 11. Desglose grupo vs grupo de la actividad locomotora. Los datos muestran las medias (\pm el error estándar) del registro de la actividad locomotora (6 horas) de ratones adolescentes tratados: a) salino, **M0** (n=8) o 25 mg/kg de cocaína, **Coc** (n=8); b) 5 mg/kg de MDMA sola, **M5** (n=10) o en combinación con 25 mg/kg de cocaína, **Coc-M5** (n=8); c) 10 mg/kg de MDMA sola, **M10** (n=8) o en combinación con 25 mg/kg de cocaína, **Coc-M10** (n=8); d) 20 mg/kg de MDMA sola, **M20** (n=8) o en combinación con 25 mg/kg de cocaína, **Coc-M20** (n=8). **Eje y:** N° de cortes de fotocélulas (hora). **Eje x:** Tiempo de registro (horas).

Estudio 1

10.4.2. LEC

Los datos del LEC (Tabla 2 y Figura 12) revelaron que los animales tratados con cocaína y MDMA (Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20) permanecieron durante más tiempo en los brazos abiertos del laberinto, en comparación con el resto de los grupos ($p < 0.05$ para Coc-M5 y Coc-M10, y $p < 0.001$ para Coc-M20). El porcentaje de entradas a los brazos abiertos [$F(3,72) = 2.597$; $p < 0.05$] fue mayor en el grupo tratado con cocaína y la dosis más alta de MDMA (Coc-M20) ($p < 0.05$). El número de entradas totales [$F(3,78) = 2.948$; $p < 0.03$] fue más elevado en los ratones tratados con 10 mg/kg de MDMA sola (M10), o en combinación con cocaína (Coc-M10), en comparación con los animales que recibieron la dosis más alta ($p < 0.05$).

	M0	M5	M10	M20	COC	COC-M5	COC-M10	COC-M20
Tiempo en brazos abiertos	29 ± 9	29 ± 14	21 ± 6	8 ± 5	28 ± 9	93 ± 30	92 ± 37	153 ± 37
% Tiempo en brazos abiertos	21 ± 5	25 ± 10	23 ± 9	14 ± 10	30 ± 10	45 ± 13	49 ± 14	62 ± 14
Tiempo en brazos cerrados	90 ± 16	90 ± 24	108 ± 23	126 ± 34	55 ± 18	50 ± 17	136 ± 30	49 ± 28
% Tiempo en brazos cerrados	79 ± 9	75 ± 11	77 ± 10	85 ± 11	70 ± 13	55 ± 13	51 ± 15	38 ± 14
Tiempo en plataforma central	163 ± 16	157 ± 20	148 ± 19	112 ± 29	211 ± 17	144 ± 26	85 ± 19	98 ± 29
% Tiempo en plataforma central	54 ± 5	52 ± 6	50 ± 6	37 ± 9	70 ± 5	48 ± 8	46 ± 10	33 ± 9
Entradas totales	14 ± 2	15 ± 2	22 ± 3	10 ± 2	10 ± 3	11 ± 2	15 ± 4	10 ± 3
Entradas a brazos abiertos	3.2 ± 1	3.3 ± 2	2.7 ± 1	0.4 ± 0.2	1.6 ± 0.4	4.2 ± 1	3.1 ± 1	4.6 ± 2
Entradas a brazos cerrados	11 ± 2	11 ± 3	20 ± 4	8 ± 1	8 ± 3	7 ± 2	13 ± 4	5 ± 3
% Entradas a brazos abiertos	26 ± 4	35 ± 12	27 ± 12	15 ± 7	33 ± 12	46 ± 14	33 ± 13	65 ± 14

Tabla 2. Efectos de la administración de la MDMA sola o en combinación con cocaína en ratones adolescentes sometidos al LEC (M0), ratones tratados con salino n=10; M5, ratones tratados con 5 mg/kg de MDMA n=14; M10, ratones tratados con 10 mg/kg de MDMA n=10; M20, ratones tratados con 20 mg/kg de MDMA n=10; Coc, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y salino, n=10; Coc-M5, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 5 mg/kg de MDMA n=12; Coc-M10, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 10 mg/kg de MDMA n=10; Coc-M20, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 20 mg/kg de MDMA n=11). Los datos muestran la media ± el error estándar.

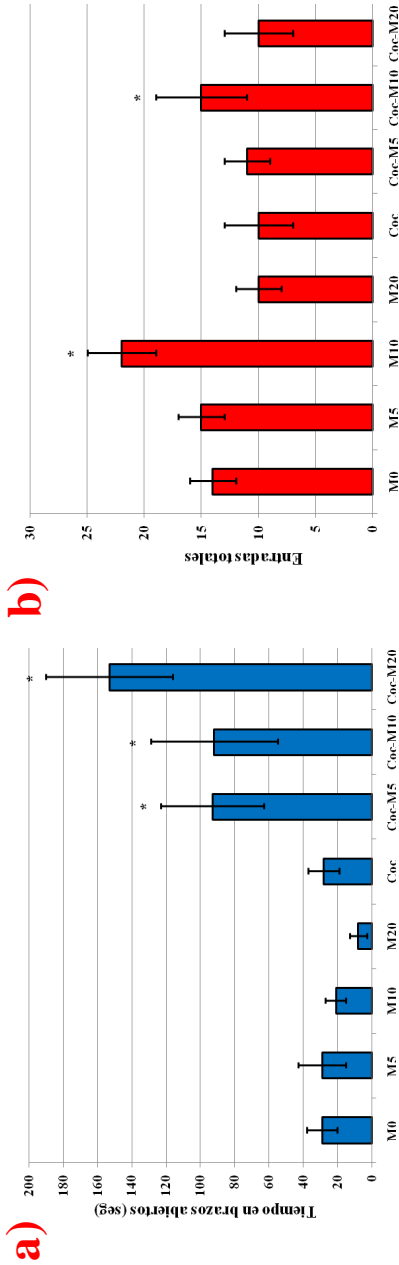
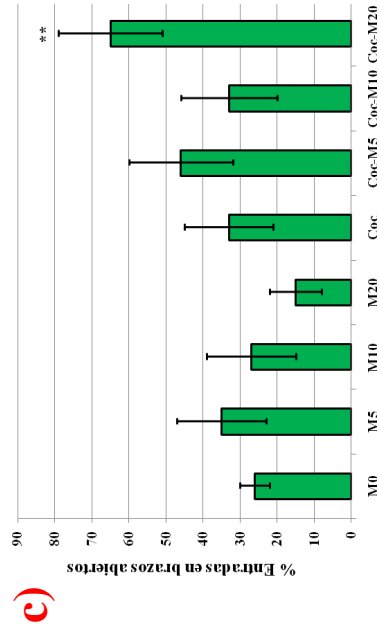


Figura 12. Desglose de los efectos de la administración de la MDMA sola o en combinación con cocaína en ratones adolescentes sometidos al LEC. Los animales fueron divididos en grupos de acuerdo al tratamiento en: salino **M0** (n=10); 5, 10 o 20 mg/kg de MDMA, **M5** (n=14), **M10** (n=10), o **M20** (n=10); 25 mg/kg de cocaína, **Coc** (n=10); o 25 mg/kg de cocaína en combinación con una dosis de MDMA, **Coc-M5** (n=12), **Coc-M10** (n=10), **Coc-M20** (n=11). Los datos muestran la media \pm el error estándar. Las gráficas son: a) Tiempo en brazos abiertos, diferencias significativas con el resto de los grupos * p<0.05 *** p<0.001. b) Entradas totales, diferencias significativas con respecto a los grupos M20 y Coc-M20 * p<0.05. c) Porcentaje de entradas en brazos abiertos, diferencias significativas con respecto al grupo M20 *** p<0.01.



10.4.3. Prueba de interacción social

Los resultados de los diferentes tipos de conducta evaluados en la prueba de interacción social se muestran en la Tabla 3. Los animales que recibieron la dosis más alta de MDMA (M20 y Coc-M20) dedicaron menos tiempo a la “investigación social”, en comparación con los grupos tratados con las otras dosis de MDMA sola, o en combinación con cocaína. Sin embargo, el grupo M20 sólo mostró diferencias significativas con respecto al grupo control (M0) ($p < 0.05$). Por el contrario, los ratones del grupo M5 dedicaron más tiempo a esta conducta en comparación con el resto de animales tratados con la MDMA ($p < 0.01$ con respecto a M20, y $p < 0.05$ con respecto a M0 y M10). Similares resultados se obtuvieron al analizar la media del tiempo que los animales dedicaron a cada contacto (Unidad de Investigación Social), la cual, fue mucho más baja en los grupos que recibieron la dosis más alta de MDMA (M20 y Coc-M20) ($p < 0.05$), pero más elevada en los ratones que recibieron 5 mg/kg de MDMA (M5) ($p < 0.01$).

Los resultados de la “exploración a distancia” mostraron un incremento en todos los animales tratados con cocaína ($p < 0.01$), y en aquellos tratados con 10 mg/kg de MDMA (M10) ($p < 0.01$). La “exploración no social”, una conducta influenciada por la actividad motora, mostró un decremento considerable en todos los ratones tratados con 5 (M5 y Coc-M5) y 10 mg/kg (M10 y Coc-M10) de MDMA ($p < 0.05$). Las conductas de “escape/evitación” fueron más pronunciadas en los 4 grupos de animales tratados con cocaína ($p < 0.05$), aunque no se obtuvo un efecto específico de grupo.

	M0	M5	M10	M20	COC	COC-M5	COC-M10	COC-M20
Aseo corporal	13 ± 2	5 ± 2	6 ± 2	5 ± 1	3.3 ± 1	2 ± 1	2 ± 1	3.9 ± 1
Escarbar	13 ± 3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Exploración no social	460 ± 14	366 ± 39	421 ± 32	506 ± 12	487 ± 10	448 ± 24	374 ± 45	509 ± 19
Exploración a distancia	18 ± 2	25 ± 7	52 ± 14**	56 ± 92	44 ± 7**	64 ± 10**	89 ± 23**	50 ± 9**
Investigación social	98 ± 15	198 ± 43*	77 ± 28	12 ± 2*	50 ± 6	65 ± 24	60 ± 19	35 ± 15
Unidad de investigación social	4.4 ± 0.8	10 ± 2.1**	3.5 ± 1	0.8 ± 0.2*	3.7 ± 0.4	3.4 ± 0.7	3.5 ± 0.91	1.8 ± 0.5*
Evitación/huída	0.8 ± 0.6	0.1 ± 0.1	2.3 ± 2	1.6 ± 1.1	1.8 ± 0.8	5 ± 1.8	3.4 ± 0.9	2 ± 1

Tabla 3. Media del tiempo acumulado (en segundos) con el error estándar asignada a las diferentes categorías de la conducta espontánea en ratones adolescentes (M0, ratones tratados con salino n=10; M5, ratones tratados con 5 mg/kg de MDMA n=10; M10, ratones tratados con 10 mg/kg de MDMA n=10; M20, ratones tratados con 20 mg/kg de MDMA n=10; Coc, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y salino, n=10; Coc-M5, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 5 mg/kg de MDMA n=10; Coc-M10, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 10 mg/kg de MDMA n=10; Coc-M20, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 20 mg/kg de MDMA n=12). Diferencias significativas con respecto al grupo control (M0) * p<0.05, **p<0.01.

10.4.4. Evitación pasiva

Los resultados de la prueba de evitación pasiva están representados en la Figura 13. El ANOVA reveló que, a pesar de que todos los grupos presentaron mayores latencias de cruce en la sesión de retención [$F(1,57)=99.771$; $p<0.0001$], en comparación con la sesión de adquisición ($p<0.01$), los animales tratados con 20 mg/kg de MDMA (M20 y Coc-M20) [$F(3,57)=6.934$; $p<0.0005$] mostraron una latencia de entrada al compartimiento oscuro más corta en comparación con el resto de los grupos ($p<0.01$). Hemos de resaltar que tras recibir el tratamiento, algunos animales no cruzaron al compartimiento oscuro durante la sesión de adquisición, por lo que estos ratones no realizaron la prueba de retención: M0, 0 ratones; M5, 2 ratones; M10, 4 ratones; M20, 4 ratones; Coc, 0 ratones; Coc-M5, 2 ratones; Coc-M10, 5 ratones; y Coc-M20, 5 ratones.

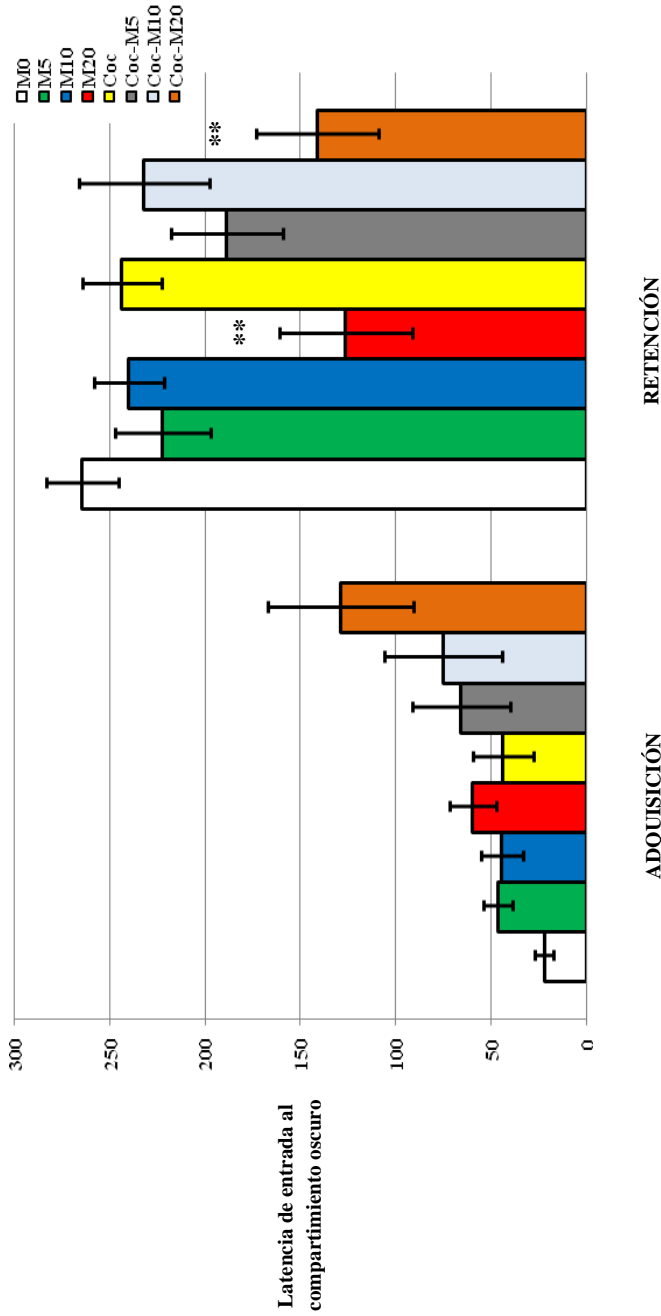


Figura 13. Efectos de la administración de la MDMA sola o en combinación con cocaína en ratones adolescentes, sobre la latencia de entrada al compartimiento oscuro durante la fase de adquisición y la fase de retención (24 horas después) de la prueba de evitación pasiva (**M0**, ratones tratados con salino n=10; **M5**, ratones tratados con 5 mg/kg de MDMA n=10; **M10**, ratones tratados con 10 mg/kg de MDMA n=10; **M20**, ratones tratados con 20 mg/kg de MDMA n=10; **Coc**, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y salino, n=10; **Coc-M5**, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 5 mg/kg de MDMA n=12; **Coc-M10**, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 10 mg/kg de MDMA n=10; **Coc-M20**, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 20 mg/kg de MDMA n=11). Los datos muestran la media \pm el error estándar. Diferencias significativas con respecto resto de los grupos durante la fase de retención ** p<0.01.

10.4.5. Análisis de monoaminas cerebrales

Los datos referentes a las concentraciones cerebrales de monoaminas se representan en la Tabla 4. El Tratamiento afectó los niveles de DA en el estriado [$F(1,74)=6.234$; $p<0.01$], observándose los valores más bajos en los grupos que recibieron cocaína ($p<0.05$). La concentración del DOPAC también fue afectada por el tratamiento con cocaína [$F(1,72)=145.066$; $p<0.0001$], siendo mayor en los animales que recibieron esta droga. Este metabolito también fue afectado por la dosis de MDMA [$F(3,72)=17.017$; $p<0.0001$]. Los animales que recibieron 10 mg/kg de MDMA (M10 y M10-Coc) mostraron los niveles más altos con respecto a aquellos que no recibieron esta droga (M0 and Coc, $p<0.01$). La interacción entre el Tratamiento y la dosis de MDMA reveló que la mayor dosis de esta droga (M20), cuando se administró sola, produjo un decremento significativo en las concentraciones del DOPAC en comparación con los grupos que recibieron las dosis más bajas de MDMA ($p<0.5$ con respecto a M10 y $p<0.01$ con respecto a M0 y M5). Sin embargo, los grupos tratados con 10 o 20 mg/kg de MDMA en combinación con cocaína, mostraron mayores niveles de este metabolito en comparación con los grupos Coc y Coc-M5 ($p<0.01$). La concentración del HVA fue afectada por el tratamiento con cocaína [$F(1,70)=4.308$; $p<0.04$], siendo mayor en los grupos tratados con esta droga ($p<0.05$), y también por la dosis de MDMA empleada [$F(3,70)=5.272$; $p<0.002$], observándose la menor concentración con la dosis de 5 mg/kg ($p<0.05$). De acuerdo con lo anterior, el “turnover” (recambio) de DA (DOPAC/DA) [$F(3,72) = 7.487$; $p<0.0002$] fue mayor en los grupos tratados con ambas drogas ($p<0.05$ para los grupos Coc-M5 y Coc-M20, y $p<0.01$ para el grupo Coc-M10). El turnover HVA/DA también se mostró elevado [$F(1,74) = 7.036$; $p<0.009$] en todos los grupos tratados con cocaína ($p<0.01$).

La concentración de 5-HT en el estriado fue afectada por el tratamiento con cocaína [$F(1,70)=11.159$; $p<0.001$], registrándose mayores niveles en los grupos que recibieron esta droga ($p<0.01$). Similares resultados se observaron en la corteza [$F(1,57)=229.857$; $p<0.0001$], donde los mayores niveles de este neurotransmisor se observaron en los grupos tratados con la cocaína ($p<0.01$). La dosis de MDMA también afectó la concentración de 5-

Estudio 1

HT [F(3,57)=56.413; $p<0.0001$]. Las dos dosis más altas de esta droga (M10, M20, Coc-M10 y Coc-M20) aumentaron los niveles de este neurotransmisor en la corteza ($p<0.01$ con respecto a M0, Coc, M5 y Coc-M5). La interacción del tratamiento y la dosis de MDMA, reveló que este efecto podría atribuirse a los grupos tratados con cocaína en combinación con 10 o 20 mg/kg de MDMA ($p<0.01$ con respecto a los grupos Coc y Coc-M5).

En el estriado, el tratamiento con la cocaína afectó la concentración del 5-HIAA [F(1,72)=5.625; $p<0.02$], la cual, fue menor en los grupos tratados con esta droga ($p<0.05$). Además, este decremento se acompañó de una disminución del turnover de 5-HT (5-HIAA/5-HT) [F(1,70) = 12.267; $p<0.0008$] en estos grupos ($p<0.01$). Los niveles de este metabolito también fueron afectados por la dosis de MDMA empleada [F(3,72)=5.044; $p<0.003$], observándose una disminución significativa en los grupos que recibieron la dosis más alta ($p<0.05$ con respecto a M0, Coc y $p<0.01$ con respecto a M5 y Coc-M5). En la corteza, la concentración del 5-HIAA también fue afectada por el tratamiento con cocaína [F(1,63)=44.018; $p<0.0001$], ya que se observó una disminución en los grupos tratados con esta droga ($p<0.01$). Igualmente, estos efectos se acompañaron de un decremento en el *turnover* de 5-HT [F(3,64) = 6.288; $p<0.0008$] sólo en el caso de los grupos tratados con ambas drogas ($p<0.01$). Por último, no se observaron cambios significativos en las concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA en el hipocampo.

	M0	M5	M10	M20	COC	COC-M5	COC-M10	COC-M20
ESTRIADO								
DA	8072 ± 630	9573 ± 930	8764 ± 455	8061 ± 362	8522 ± 574	7552 ± 598	7597 ± 516	7086 ± 505
DOPAC	1390 ± 125	1409 ± 80	1272 ± 64	1002 ± 21**	1541 ± 90	1844 ± 96**	2298 ± 33**	2129 ± 120**
HVA	301 ± 32	286 ± 21	416 ± 59	392 ± 12	454 ± 31	308 ± 32	423 ± 36	405 ± 26
DOPAC/DA	0.190 ± 0.03	0.155 ± 0.01	0.149 ± 0.01	0.126 ± 0.006	0.182 ± 0.004	0.270 ± 0.03*	0.319 ± 0.03**	0.235 ± 0.03*
HVA/DA	0.039 ± 0.001	0.031 ± 0.001	0.048 ± 0.01	0.049 ± 0.001	0.053 ± 0.001	0.041 ± 0.001	0.058 ± 0.01	0.062 ± 0.01
5-HT	379 ± 59	378 ± 65	390 ± 14	376 ± 39	440 ± 20	426 ± 29	468 ± 18	541 ± 28
SHIAA	465 ± 112	526 ± 31	435 ± 21	423 ± 7	461 ± 24	432 ± 40	423 ± 15	376 ± 12
5-HIAA/5-HT	1.40 ± 0.17	1.4 ± 0.3	1.121 ± 0.06	1.316 ± 0.23	1.070 ± 0.08	1.001 ± 0.05	0.916 ± 0.05	0.785 ± 0.06
CORTEZA								
5-HT	140 ± 13	131 ± 11	131 ± 10	144 ± 9	119 ± 10	210 ± 13	444 ± 17	452 ± 29
5-HIAA	78 ± 10	67 ± 4	72 ± 4	71 ± 7	51 ± 4	36 ± 4	43 ± 4	48 ± 7
5-HIAA/5-HT	0.573 ± 0.07	0.542 ± 0.05	0.567 ± 0.04	0.498 ± 0.04	0.456 ± 0.05	0.154 ± 0.01**	0.099 ± 0.01**	0.114 ± 0.01**
HIPOCAMPO								
5-HT	288 ± 41	203 ± 12	258 ± 7	242 ± 7	226 ± 7	225 ± 9	243 ± 6	266 ± 38
5-HIAA	131 ± 36	94 ± 6	103 ± 5	121 ± 9	122 ± 1	105 ± 5	97 ± 3	75 ± 4
5-HIAA/5-HT	0.519 ± 0.13	0.467 ± 0.02	0.404 ± 0.02	0.499 ± 0.03	0.530 ± 0.01	0.478 ± 0.03	0.404 ± 0.02	0.318 ± 0.03

Tabla 4. Efectos de la administración de la MDMA sola o en combinación con cocaína sobre las concentraciones de las monoaminas cerebrales en el estriado, la corteza, y el hipocampo de ratones adolescentes (M0, ratones tratados con salino n=10; M5, ratones tratados con 5 mg/kg de MDMA n=10; M10, ratones tratados con 10 mg/kg de MDMA n=10; M20, ratones tratados con 20 mg/kg de MDMA n=10; Coc, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y salino, n=10; Coc-M5, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 5 mg/kg de MDMA n=10; Coc-M10, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 10 mg/kg de MDMA n=11; Coc-M20, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 20 mg/kg de MDMA n=11). Los datos muestran la media ± el error estándar. Diferencias significativas con respecto al grupo control *p<0.05; ** p<0.01.

10.5. Discusión

Este estudio intenta descifrar los efectos conductuales y neuroquímicos agudos de la MDMA sola, o en combinación con cocaína, mediante el empleo de un modelo basado en ratones. Los resultados indican que los efectos conductuales y neuroquímicos de la MDMA son afectados cuando esta droga es administrada en combinación con cocaína. En ratones adolescentes, sólo la dosis más alta de MDMA produjo efectos conductuales caracterizados por una reducción de los contactos sociales, un incremento de la actividad motora, y déficits en la prueba de evitación pasiva. No obstante, los animales tratados con ambas drogas mostraron un marcado perfil ansiolítico en el LEC, una clara abstinencia social en la prueba de interacción social, un incremento de las conductas de evitación y huida, y una prolongada hiperactividad. Aunque la administración única de la MDMA no produjo diferencias significativas en los niveles de monoaminas cerebrales, la administración combinada de la MDMA y la cocaína redujo ligeramente la concentración de DA, e incrementó las concentraciones del DOPAC y del HVA en el estriado, lo cual, reflejó un incremento del *turnover* de DA. En contraste, los niveles de 5-HT aumentaron en el estriado y la corteza, y se produjo un decremento paralelo en la concentración del 5-HIAA en estas mismas estructuras, lo cual, reflejó un decremento en el *turnover* de la 5-HT.

Diversos estudios han indicado que los consumidores del éxtasis muestran problemas de ansiedad (Baylen y Rosenberg, 2006), no obstante, nuestros resultados revelan que la MDMA por sí sola no afecta los niveles de ansiedad de los ratones adolescentes. En nuestro estudio, observamos una tendencia ansiogénica únicamente con la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg), la cual, produjo un decremento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del LEC. Los pocos estudios realizados sobre la administración aguda de la MDMA han mostrado que esta induce efectos ansiogénicos o ansiolíticos dependiendo de la dosis empleada en ratones sometidos al LEC. Navarro y cols., (2002) observaron que una dosis intermedia de esta droga (8 mg/kg) induce un efecto ansiogénico, mientras que una dosis más alta (15 mg/kg), o más baja (1 mg/kg), no producen efectos significativos. Por otra parte, Lin y cols., (1999) obtuvieron una respuesta paradójica dependiente de la dosis

utilizada. A dosis bajas (4 mg/kg), estos autores encontraron una acción ansiogénica con hiperactividad, mientras que a dosis altas (20 mg/kg) obtuvieron una respuesta ansiolítica. Efectos ansiogénicos o ansiolíticos de la MDMA en el LEC también han sido demostrados en las ratas (Bhattacharya y cols., 1998; Ho y cols., 2004; Palenicek y cols., 2005). Cabe destacar que todos estos estudios han sido realizados en animales adultos y, a pesar de que los ratones adolescentes no muestran una conducta particular en el LEC (Hefner y Holmes, 2007), se ha descrito que a esta edad, los animales muestran una sensibilidad alterada a la administración de agentes psicoestimulantes (Laviola y cols., 1999; Schramm-Sapyta y cols., 2006; Åberg y cols., 2007). Al parecer, los animales adolescentes son más “resistentes” a las propiedades adversas relacionadas con los psicoestimulantes (Laviola y cols., 1999), y los pequeños cambios observados en nuestro estudio (un ligero efecto ansiogénico con la dosis más alta) concuerdan con esta teoría.

La literatura disponible indica que la administración aguda de cocaína induce un efecto ansiogénico en las ratas y los ratones adultos (Yang y cols., 1992; Erhardt y cols., 2006), pero en nuestro estudio, la cocaína no afectó las diversas conductas evaluadas en el LEC. Se ha demostrado que las ratas adolescentes muestran una menor sensibilidad en la prueba de la aversión gustativa condicionada inducida por la cocaína (Schramm-Sapyta y cols., 2006), lo cual apoyaría la teoría de que los efectos aversivos de las drogas de abuso disminuyen durante la adolescencia. Por el contrario, cuando la MDMA y la cocaína se administraron simultáneamente, se observó un poderoso efecto ansiolítico. Los ratones tratados con ambas drogas permanecieron durante más tiempo en los brazos abiertos del LEC, así como también, mostraron elevados porcentajes de entradas y tiempo de permanencia en estos brazos. El número de entradas totales aumentó sólo en los grupos tratados con la dosis intermedia de MDMA (M10 y Coc-M10), lo que sugiere que el efecto motor no es la causa principal de la respuesta ansiolítica observada tras la administración simultánea de las dos drogas.

A pesar de que la MDMA incrementa, al parecer, los contactos sociales en los seres humanos e induce un fuerte deseo por la compañía y la conversación (Vollenweider y cols.,

Estudio 1

1998), esta droga también puede producir ansiedad generalizada y ataques de pánico (Whitaker-Azmitia y Aronson; 1989; McCann y Ricaurte, 1992; Solowij y cols., 1992; Vollenweider y cols., 1998). Después de una sola exposición a la dosis más elevada de MDMA, los ratones mostraron una reducción considerable en el número de contactos sociales y un decremento en la media del tiempo que dedicaron a cada contacto, no siendo estos efectos contrarrestados por completo tras la co-administración con cocaína. Sin embargo, la dosis más baja de MDMA indujo resultados opuestos, un incremento en el tiempo dedicado y en la media del tiempo de cada encuentro, los cuales si fueron bloqueados por la cocaína. En ratones adultos, se ha descrito que la administración aguda de la MDMA produce un efecto ansiogénico (Maldonado y Navarro, 2001; Navarro y Maldonado, 2002), no obstante, en las ratas se ha observado que esta droga produce un efecto ansiolítico pro-social (Morley y McGregor, 2000; Morley y cols., 2005). Por otro lado, y de acuerdo con estudios previos llevados a cabo en ratones adultos, la cocaína muestra un perfil ansiogénico en la prueba de interacción social (Estelles y cols., 2004; Morley y cols., 2005). La administración simultánea de ambas drogas produjo básicamente un perfil conductual similar al de la cocaína, con una reducción de los contactos sociales, largos periodos del tiempo dedicado a la “exploración a distancia”, un tiempo medio bajo empleado en cada contacto, y un incremento de las conductas de evitación y huida, los cuales, son efectos comúnmente observados en los ratones adultos que han recibido cocaína (Estelles y cols., 2004; 2007; Lluch y cols., 2005).

Nuestros resultados demuestran que la co-administración de la MDMA y la cocaína produce un perfil ansiolítico en el LEC, pero un efecto ansiogénico en la prueba de la interacción social. Nuestro grupo de investigación ha obtenido resultados similares en el estudio de las consecuencias a largo plazo de la administración de cocaína (Estelles y cols., 2007). Los ratones expuestos a la cocaína durante la adolescencia muestran un decremento de los contactos sociales, pero permanecen más tiempo en los brazos abiertos del LEC cuando se evalúan dos semanas después. Estos dos modelos animales estudian la ansiedad desde dos perspectivas diferentes, durante una prueba etológicamente aversiva que determina la ansiedad general (LEC), o en presencia de un compañero co-específico

(prueba de interacción social). Con respecto a la MDMA, diversos estudios han sugerido que esta droga produce un efecto dual sobre la ansiedad, el cual, varía dependiendo de la dosis, la especie, y el método empleado (Bhattacharya y cols., 1998; Lin y cols., 1999; Morley y McGregor, 2000; Maldonado y Navarro, 2001; Navarro y Maldonado, 2002; Cornish y cols., 2003; Morley y cols., 2005; Navarro y cols., 2004). El presente estudio sugiere que la administración combinada de la MDMA y la cocaína, crea un perfil conductual bimodal que confirma que la MDMA es capaz de activar mecanismos neuronales excitatorios e inhibitorios que regulan la ansiedad (Lin y cols., 1999).

Nuestros resultados corroboran que la administración simultánea de la MDMA y la cocaína inducen un incremento de la actividad locomotora espontánea en roedores adolescentes (Koenig y cols., 2005) y adultos (Balogh y cols., 2004; Bankson y Cunningham, 2002; Maldonado y cols., 2006). La hiperactividad producida por la cocaína es debida principalmente al bloqueo del DAT (Uhl y cols., 2002), mientras que la MDMA podría tener componentes dopaminérgicos y serotoninérgicos, implicando a los receptores D₁, D₂, y 5-HT₂ (Green y cols., 2003). La actividad motora registrada 25 minutos después de la administración de la droga mostró que todos los grupos, excepto aquellos animales tratados con suero fisiológico y 5 mg/kg de MDMA, presentaron un incremento de la actividad motora durante la realización de las pruebas conductuales. Sin embargo, observamos incrementos que no correspondieron con el número de entradas totales o el tiempo dedicado a la “exploración no social”, parámetros que son medidas típicas de actividad motora en el LEC y en la prueba de interacción social, respectivamente. En un estudio previo, nuestro grupo de investigación observó esta falta de concordancia al evaluar los efectos a largo plazo en animales que recibieron dosis diarias de cocaína, ya que dos semanas después de haber finalizado el tratamiento, la actividad espontánea de estos ratones aumentó considerablemente, pero no observamos ningún incremento en el número de entradas totales en el LEC, o en el tiempo dedicado a la “exploración no social” (Estelles y cols., 2007). En el presente trabajo, la actividad motora es evaluada en varias circunstancias – una situación estresante (LEC), una confrontación co-específica (prueba de interacción social), o una arena nueva (actividad motora espontánea) – lo cual hace difícil el comparar los

Estudio 1

resultados obtenidos. Por otra parte, los efectos específicos que hemos observado en el LEC y en la prueba de interacción social, tras la co-administración de ambas drogas, no se pueden atribuir únicamente a la hiperactividad, ya que esta se observó también en los grupos tratados sólo con la MDMA. Podríamos hacer una excepción para el efecto ansiolítico en la prueba de interacción social, producido por la dosis más baja de MDMA cuando se administra sola, puesto que fue el único grupo en el cual no se indujo hiperactividad.

Habitualmente, los consumidores del éxtasis muestran déficits de memoria, y estos han sido correlacionados con el grado de exposición a la droga (Bolla y cols., 1998; Morgan y cols., 1999; Parrott y cols., 1998; Laws y Kokkalis, 2007). Se ha descrito que la administración aguda de MDMA, antes de la fase de adquisición del aprendizaje de la prueba de evitación pasiva, perjudica la retención 24 horas después (Barrionuevo y cols., 2000; Moyano y cols., 2004). No obstante, existen resultados contradictorios que sugieren que las ratas no son afectadas en ninguna forma tras la administración repetida de la MDMA (McNamara y cols., 1995), la exposición prenatal (St Omer y cols., 1991), o el tratamiento con un régimen neurotóxico de MDMA (Timar y cols., 2003). En todos nuestros animales, la latencia de cruce al compartimiento oscuro fue significativamente mayor en la fase de retención, demostrando que los ratones recordaron lo aprendido en la sesión de entrenamiento. No obstante, el tratamiento con la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg), sola o en combinación con cocaína, produjo una medida mucho más corta, lo que sugiere que la administración de la droga antes de la sesión de adquisición perjudica la memoria o el aprendizaje condicionado de los animales. De hecho, el tratamiento combinado con la dosis más alta de MDMA y la cocaína perjudicó la realización de los animales en la fase de adquisición. Podríamos argumentar que la “mala” sesión de entrenamiento podría afectar a los resultados obtenidos 24 horas después, sin embargo, aunque estos ratones necesitaron más tiempo para cruzar al compartimiento oscuro, fueron sometidos al mismo estímulo aversivo al igual que el resto de animales. Por tanto, el deterioro observado no puede atribuirse a la administración de la cocaína, sino a la elevada dosis de MDMA administrada. La depleción serotoninérgica producida por la MDMA no parece ser necesaria para observar un deterioro

en el desempeño en diferentes pruebas de aprendizaje y memoria (Rogerio y Takahashi, 1992a; Ricaurte y cols., 1993; Moyano y cols., 2005), sino que el efecto perjudicial de la MDMA ha sido atribuido a un exceso en la liberación de 5-HT (Barrionuevo y cols., 2000). El tratamiento agudo con esta droga podría contribuir a un daño en la retención del aprendizaje, produciendo diversos cambios en mecanismos moleculares tempranos (como una reducción en la expresión membranal sináptica de las subunidades NR₁ y NR₂ del receptor NMDA, y de la CaMKII en el hipocampo de la rata), los cuales serían necesarios para la consolidación de la memoria aversiva (Moyano y cols., 2004).

Treinta minutos después de la administración aguda de la MDMA, no se observaron alteraciones en las concentraciones de las monoaminas o de sus metabolitos en ninguna de las estructuras estudiadas. La única excepción, fue el decremento en la concentración del DOPAC en el estriado, el cual se observó en los animales que recibieron la dosis más alta de MDMA. En estudios previos, se ha observado un modesto decremento de las concentraciones de 5-HT y de DA 3 horas después de haber administrado dosis moderadas y altas de MDMA en ratones (Logan y cols., 1988; O'Shea y cols., 2001; Escobedo y cols., 2005). Dado que numerosos trabajos han demostrado que la MDMA promueve la liberación de DA en el estriado, y de 5-HT en diversas estructuras cerebrales (Gudelsky y Yamamoto, 2008), estos efectos neurotóxicos podrían indicar que la MDMA induce un aumento en la liberación de DA y un incremento en la liberación, un descenso en la recaptación, y una inhibición de la triptófano hidroxilasa en el caso de la 5-HT. Las discrepancias entre nuestros resultados y aquellos estudios podrían deberse al hecho de que nuestras determinaciones fueron realizadas casi inmediatamente (30 minutos después de administrar la droga), y posiblemente a que las dosis empleadas fueron más bajas que las utilizadas en los trabajos mencionados anteriormente. La edad de los animales también podría ser relevante ya que todos los estudios previos fueron llevados a cabo en animales adultos, y nuestros resultados han confirmado que los ratones adolescentes muestran una menor sensibilidad a los efectos neurotóxicos de la MDMA (Reveron y cols., 2005).

Estudio 1

El tratamiento simultáneo con la MDMA y la cocaína produjo un decremento en la concentración de DA, y un incremento de los niveles del DOPAC y del HVA en el estriado, lo cual, representa un incremento en el *turnover* de la DA. En contraste, los niveles de 5-HT y su metabolito disminuyeron en el estriado y la corteza, reflejando un decremento del *turnover* de la 5-HT. Aunque la MDMA y la cocaína actúan sobre los mismos sistemas de neurotransmisión, los mecanismos de acción de ambas drogas son diferentes, al igual que los efectos obtenidos. La cocaína incrementa los niveles sinápticos de la DA, la 5-HT, y la NA mediante su unión con los transportadores de estos neurotransmisores, e inhibiendo su re-captación hacia el interior de las terminales presinápticas. Por otro lado, el complejo mecanismo de acción de la MDMA produce una liberación aguda de 5-HT y DA desde las terminales nerviosas (Colado y cols., 2004), y muestra una mayor potencia de inhibición para el SERT y el NAT que para el DAT, mientras que la cocaína bloquea estos tres transportadores monoaminérgicos a concentraciones similares (Han y Gu, 2006). Además, la MDMA presenta una afinidad moderada por una amplia variedad de receptores, incluyendo los α_2 -adrenérgicos, los 5-HT₂ serotoninérgicos, los M₁ muscarínicos, y los H₁ histaminérgicos, cuya activación podría modular ciertos efectos de esta droga (Battaglia y cols., 1988). La literatura sugiere que la 5-HT juega un papel sumamente importante en los efectos psicotrópicos de la MDMA, más que en los de la cocaína (Itzhak y Ali, 2006). Cuando ambas drogas son administradas al mismo tiempo, la cocaína podría bloquear la entrada de la MDMA al interior de las terminales nerviosas, lo que entonces inhibiría la liberación de monoaminas inducida por la MDMA, afectando principalmente a la 5-HT. Por otra parte, los efectos del bloqueo de la re-captación de estos compuestos podrían ser un aspecto extra a estas circunstancias, aumentando la disponibilidad de la DA en la sinapsis, lo cual, podría ser la causa del incremento del *turnover* dopaminérgico. Este balance DA/5-HT, observado solo en los grupos tratados con ambas drogas, podría ser en parte el responsable de los efectos ansiolíticos observados en el LEC, y sólo cuando la cocaína y la MDMA son administradas simultáneamente.

Un estudio reciente ha indicado que la administración combinada de la MDMA y la cocaína produce un antagonismo entre ambas drogas que podría revertirse a dosis altas (Diller y

cols., 2007). La cocaína es capaz de suprimir un CPL inducido por dosis moderadas de MDMA, aunque la falta de CPL inducido por una dosis alta de MDMA puede ser revertido por la cocaína. En base a una relación inversa entre la actividad serotoninérgica y dopaminérgica (en general, el decremento en la neurotransmisión serotoninérgica produce un incremento de la función dopaminérgica), los autores sugieren que la cocaína reduce la liberación de 5-HT modulada por la MDMA, más que la liberación de DA, incrementando entonces el umbral reforzante. Nuestros resultados respaldan esta hipótesis, ya que hemos observado un incremento en el *turnover* de DA y un bajo *turnover* de 5-HT en el estriado y la corteza. Estos descubrimientos podrían reflejar un incremento en la disponibilidad de la DA junto con la liberación de 5-HT en pequeñas cantidades o en una menor proporción, conduciendo a un decremento en su *turnover*.

Se han descrito diferencias en la vulnerabilidad a largo plazo a los efectos neurotóxicos y conductuales de la MDMA en función del estado del desarrollo al cual se expone a la droga (Morley-Fletcher y cols., 2002). Los estudios en los que se ha administrado MDMA a animales adolescentes han indicado que existen adaptaciones de largo plazo que afectan la respuesta de los animales a la cocaína (Achat-Mendes y cols., 2003; Åberg y cols., 2007, Bull y cols., 2003; 2004). Aunque tales estudios son de valor incuestionable, se desconocen los efectos de la administración simultánea de la MDMA y la cocaína en los animales adolescentes. La elevada frecuencia del uso combinado de ambas drogas en los consumidores adolescentes demanda una evaluación de su interacción. El presente estudio demuestra que el uso combinado de la MDMA y la cocaína produce un perfil conductual y neuroquímico diferente al observado cuando cada droga es administrada de forma individual. De acuerdo con estudios previos, los efectos aversivos de administración de la MDMA y/o la cocaína disminuyen en los animales adolescentes, lo cual, podría ayudar a comprender por qué la adolescencia es un periodo de particular vulnerabilidad al desarrollo del abuso de drogas.

Estudio 2. Efectos conductuales y neurotóxicos a largo plazo de la MDMA, sola o en combinación con cocaína, en ratones adolescentes



11. Estudio 2. Efectos conductuales y neurotóxicos a largo plazo de la MDMA, sola o en combinación con cocaína, en ratones adolescentes

Este estudio ha sido publicado en “*European Journal of Pharmacology (2008) 590:204-11*”, ver anexo II.

11.1. Introducción

Se asume que conforme aumenta el riesgo percibido ante el consumo de una droga, se produce un decremento en la extensión o la intensidad del consumo de la misma. En un reciente estudio realizado en estudiantes españoles de enseñanzas secundarias (14 a 18 años de edad) se ha observado que estos percibían como de elevado riesgo el consumo habitual (una vez a la semana o con mayor frecuencia) de heroína, éxtasis o cocaína (92, 96.8 y 97% respectivamente) (ESTUDES, 2007). A pesar de ello, el informe anual del Observatorio Europeo sobre Drogas y Toxicomanías (2006) ha indicado que el éxtasis es una de las sustancias de mayor consumo en el continente, y sugiere que esta droga se concentra en un número reducido de personas. Además, los estudiantes que han probado el éxtasis describen un alto consumo de cocaína y drogas alucinógenas.

El uso del éxtasis podría implicar la introducción del individuo en un ámbito donde la disponibilidad de otras drogas aumenta, y donde el consumo de dichas sustancias es observado como normal o habitual (Reid y cols., 2006). Los consumidores recreacionales del éxtasis comúnmente toman además de la MDMA una gran variedad de drogas psicoactivas (Scholey y cols., 2004). El consumo de cocaína se presenta en un elevadísimo porcentaje en estos sujetos, gran parte de ellos adolescentes (Butler y Montgomery; 2004). No obstante, no existen estudios dirigidos a determinar las consecuencias del consumo simultáneo de ambas drogas, ya que por lo general las publicaciones disponibles describen los efectos del uso conjunto del éxtasis y alcohol o cannabis, excluyendo casi por completo el empleo de otras sustancias de gran consumo, como la cocaína. De hecho, se desconocen

Estudio 2

los efectos conductuales y neuroquímicos producidos a largo plazo como consecuencia del consumo de este psicoestimulante junto con la MDMA.

Algunos estudios han descrito que la exposición a la MDMA podría producir diversas alteraciones a largo plazo. Por ejemplo, los ex-consumidores del éxtasis muestran una menor respuesta hormonal ante una dosis de fenfluramina, así como también síntomas depresivos, disforia, elevados niveles de agresividad, y un patrón conductual de búsqueda de nuevas sensaciones (Gerra y cols., 1998). Por otro lado, las ratas y los ratones expuestos a la MDMA durante la adolescencia, muestran cambios a largo plazo en la conducta social (Fone y cols., 2002; Morley-Fletcher y cols., 2002), la actividad motora (Balogh y cols., 2004), o en los niveles de ansiedad (Mechan y cols., 2002a; Ho y cols., 2004; Faria y cols., 2006; Clemens y cols., 2007). Nuestro equipo de investigación ha demostrado recientemente que la administración de cocaína durante la adolescencia también induce efectos a largo plazo, como un incremento de las conductas de evitación y huida, así como también un decremento de los contactos sociales en la prueba de interacción social (Estelles y cols., 2006). Además, se considera que los consumidores de la MDMA y la cocaína habitualmente utilizan un patrón *binge*, el cual, ha sido asociado con una elevada prevalencia de psicosis y adicción inducidas por los psicoestimulantes (Gawin, 1991; Segal y Kuczenski, 1997).

El primer objetivo de este estudio es investigar si la cocaína altera a largo plazo los efectos producidos por la administración de la MDMA, durante el periodo adolescente, sobre la ansiedad en los ratones. Los niveles de ansiedad serán evaluados mediante la prueba de interacción social, la cual se realizará 3 semanas después de administrar la MDMA sola, o en combinación con cocaína. Diversos estudios han demostrado que la MDMA induce daños neurotóxicos, y en los ratones, esta droga afecta especialmente a las terminales nerviosas dopaminérgicas (Logan y cols., 1988; Lavery y Logan, 1990; Miller y O'Callaghan, 1994; Colado y cols., 2001; O'Shea y cols., 2001; Saadat y cols., 2006b). Por lo tanto, nuestro segundo objetivo será determinar si los cambios conductuales producidos por la exposición a estas drogas durante la adolescencia, están relacionados con un posible

daño neurotóxico. Analizaremos las concentraciones cerebrales de la DA, la 5-HT, así como también de sus metabolitos, en diferentes estructuras como el estriado, el hipocampo, y la corteza, 3 semanas después de que nuestros animales hayan recibido la MDMA sola, o en combinación con cocaína.

11.2. Material y Métodos

11.2.1. Sujetos

En la realización de este estudio se utilizaron un total de 299 ratones albinos macho de la cepa OF1 comercialmente adquiridos a los laboratorios Charles River (Barcelona, España): 208 ratones fueron usados en la prueba de interacción social (104 como sujetos experimentales y 104 como oponentes estándar) y los restantes se utilizaron para los análisis de monoaminas cerebrales. Los animales tenían 21 días de edad (10-13 gr) a su llegada a nuestro laboratorio y fueron alojados en grupos de 4 en cajas de plástico opacas (28 cm x 28 cm x 14.5 cm).

Las condiciones ambientales del laboratorio se controlaron permanentemente y fueron las siguientes: temperatura constante (21 ± 2 °C), ciclo de luz 12/12 h (fase con luz apagada de 7:30 a 19:30 h). Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento, excepto durante las pruebas conductuales. La limpieza de las jaulas se realizó una vez por semana.

Los procedimientos de tratamiento y cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices marcadas por la comunidad internacional recogidas en: European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 de noviembre de 1986).

11.2.2. Tratamiento farmacológico y diseño experimental

Los animales fueron inyectados intraperitonealmente (ip) con diferentes dosis de hidrocloreuro de MDMA (Laboratorios SIGMA-ALDRICH, España), e hidrocloreuro de

Estudio 2

cocaína (Laboratorios Alcaliber, Madrid). Las dosis fueron administradas de forma proporcional al peso del animal en un volumen de 0.01 ml/g y disueltas en solución salina fisiológica (NaCl 0,9%). Los ratones de los grupos control fueron inyectados con suero fisiológico.

A los 28 días de edad (DP 28), tras un periodo de adaptación al laboratorio (7 días), los animales adolescentes recibieron un tratamiento farmacológico consistente en dos inyecciones diarias (8 am y 8 pm) de una misma dosis de MDMA (5, 10, y 20 mg/kg), sola o en combinación con cocaína (25 mg/kg), durante 3 días consecutivos (6 administraciones) desde los 28 (DP 28) hasta los 30 días de edad (DP 30). De este modo, los animales fueron clasificados en los siguientes grupos: M0, M5, M10, M20, Coc, Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20. La dosis de cocaína fue elegida en base a estudios previos realizados con la misma cepa de ratones (Estelles y cols., 2005; Ribeiro Do Couto y cols., 2005b; LLuch y cols., 2005).

Tres semanas después de haber finalizado el tratamiento (DP 51), los ratones fueron evaluados en la prueba de interacción social, o empleados para la determinación de los niveles de monoaminas cerebrales. El peso corporal fue registrado durante el procedimiento y algunos ratones fueron seleccionados aleatoriamente para el análisis de la temperatura rectal, el cual se llevó a cabo después de cada una de las inyecciones del tratamiento.

11.2.3. Aparatos y procedimiento

11.2.3.1. Prueba de interacción social

Los aparatos y el procedimiento empleados fueron similares a los descritos en el estudio 1.

11.2.3.2. Análisis de monoaminas cerebrales

Los aparatos y el procedimiento empleados fueron similares a los descritos en el estudio 1.

11.2.3.3. Determinación de la temperatura rectal

La temperatura corporal de los ratones fue analizada mediante un termómetro europeo Technomed (*Medical Diagnosis Accessories*, Holanda) y una sonda rectal lubricada (serie YSI-400), 30 minutos después de cada administración de la(s) droga(s). El ratón era inmovilizado manualmente durante 10 segundos aproximadamente, la sonda fue introducida en el recto hasta obtener el registro de una lectura constante.

11.3. Análisis estadístico

Los datos de la prueba de interacción social y de las monoaminas cerebrales en cada estructura cerebral, fueron analizadas mediante una ANOVA de dos vías (Tratamiento x Dosis), con dos variables *entre*: Tratamiento con cocaína (de dos niveles, salino o cocaína) y Dosis de MDMA empleadas (con 4 niveles 0, 5, 10 y 20 mg/kg). Las comparaciones posteriores se realizaron con una prueba de Newman-Keuls o de efectos simples. Todos los resultados son expresados como la media \pm el error estándar.

El análisis estadístico de los valores de temperatura rectal y del peso corporal se realizó con un ANOVA de tres vías (Tratamiento x Dosis x Tiempo), con dos variables *entre*: Tratamiento con cocaína (de dos niveles, salino o cocaína) y Dosis de MDMA empleadas (con 4 niveles 0, 5, 10 y 20 mg/kg), y una variable *intra*: Tiempo (con 6 niveles para cada inyección de la droga en el caso del análisis de la temperatura; y 5 niveles 21, 28, 29, 30, y 51 días de edad para los datos del peso corporal).

Estudio 2

11.4. Resultados

11.4.1. Prueba de interacción social

Los datos de los diferentes tipos de conducta evaluados en el test de interacción social se presentan en la Tabla 5. El tiempo en “exploración no social” mostró un efecto del tratamiento [$F(1,85)=7.960$; $p<0.0060$]. En comparación con los ratones tratados únicamente con la MDMA, los animales tratados con cocaína, sola o en combinación con MDMA mostraron un decremento en el tiempo dedicado a esta conducta (prueba de Newman-Keuls $p<0.01$).

La “exploración a distancia” fue afectada por el tratamiento [$F(1,88)=16.071$; $p<0.0001$], y por la interacción entre el tratamiento x dosis [$F(3,86)=3.984$; $p<0.0104$]. La administración de cocaína por sí sola (Coc) incrementó el tiempo que los animales dedicaron a esta conducta ($p<0.05$).

El tiempo de “investigación social” aumentó como consecuencia del tratamiento con la MDMA [$F(3,86)=6.760$; $p<0.0004$], y la administración de cocaína no modificó este efecto (prueba de Newman-Keuls $p<0.01$). La unidad de investigación social mostró resultados similares [$F(3,84)=4.470$; $p<0.0058$], aumentando en aquellos animales que recibieron la MDMA (prueba de Newman-Keuls $p<0.01$ con respecto a los grupos M0 o Coc). Asimismo, los ratones tratados con la MDMA en combinación con cocaína [$F(1,84)=10.664$; $p<0.0016$] mostraron un gran aumento en este parámetro conductual (prueba de Newman-Keuls $p<0.01$).

La “amenaza” exhibió un efecto del tratamiento [$F(1,88)=4.012$; $p<0.0483$], observándose sólo en los animales que fueron expuestos a la cocaína (Coc, Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20) (prueba de Newman-Keuls $p<0.05$).

Por último, indicar que las conductas de “evitación” y “huida” sólo se observaron en los ratones que recibieron únicamente la cocaína (Coc) [$F(3,88)=5.430$; $p<0.0018$], los cuales, pasaron más tiempo en estas conductas que el resto de los grupos (Newman-Keuls y $p<0.01$).

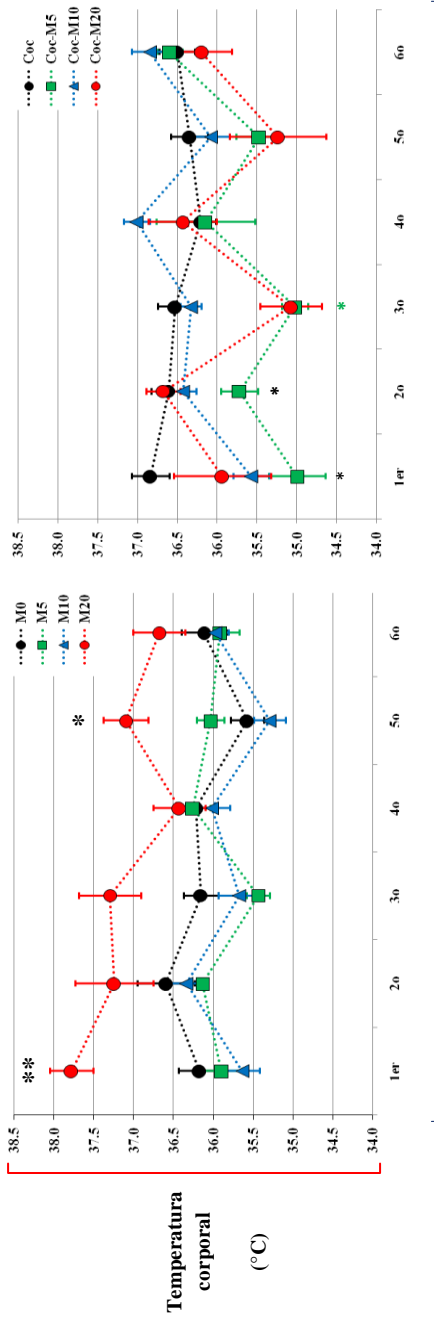
	M0	M5	M10	M20	COC	COC-M5	COC-M10	COC-M20
Aseo corporal	18 ± 2	12 ± 1	18 ± 2	21 ± 3	18 ± 2	18 ± 3	17 ± 3	19 ± 3
Escarbar	47 ± 6	48 ± 7	39 ± 5	34 ± 3	40 ± 7	30 ± 6	25 ± 4	33 ± 5
Exploración no social	473 ± 5	443 ± 9	442 ± 13	464 ± 12	424 ± 17	437 ± 15	416 ± 18	427 ± 12
Exploración a distancia	10 ± 1	15 ± 1	14 ± 2	10 ± 2	26 ± 2*	16 ± 4	16 ± 2	18 ± 2
Investigación social	51 ± 7	84 ± 9**	89 ± 8**	70 ± 6**	52 ± 7	101 ± 12**	102 ± 14**	90 ± 11**
Unidad de investigación social	3.1 ± 0.3	3.6 ± 0.3**	3.6 ± 0.2**	3.7 ± 0.3**	3.2 ± 0.1	5 ± 0.3**	4.3 ± 0.4**	4.8 ± 0.4**
Amenaza	0 ± 0	1 ± 0.5	1 ± 0.5	0 ± 0.1	27 ± 14*	2 ± 1*	20 ± 12*	7 ± 3*
Ataque	0 ± 0	0 ± 0	0.5 ± 0.4	0 ± 0	7 ± 5	0 ± 0	3 ± 1	2 ± 0.5
Evitación/huida	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 1**	0 ± 0	0 ± 0.2	0 ± 0.1

Tabla 5. Media del tiempo acumulado (en segundos) con el error estándar asignada a las diferentes categorías de la conducta espontánea en ratones adultos tratados en la adolescencia con dos inyecciones por día de la misma dosis de MDMA (5, 10 y 20 mg/kg) sola o en combinación con cocaína (25 mg/kg) durante tres días (6 administraciones) (M0, ratones tratados con salino n=12; M5, ratones tratados con 5 mg/kg de MDMA n=16; M10, ratones tratados con 10 mg/kg de MDMA n=16; M20, ratones tratados con 20 mg/kg de MDMA n=12; Coc, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y salino, n=12; Coc-M5, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 5 mg/kg de MDMA n=12; Coc-M10, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 10 mg/kg de MDMA n=12; Coc-M20, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 20 mg/kg de MDMA n=12). Diferencias significativas con respecto al grupo control ** p<0.01, * p<0.05.

11.4.2. Efecto de la administración *binge* de MDMA sobre la temperatura rectal

La interacción entre el tratamiento x dosis x tiempo [$F(15,230)=2.517$; $p<0.0018$] mostró un ascenso de la temperatura rectal de los animales (Figura 14) tras la administración de la primera dosis de 20 mg/kg de MDMA, con respecto al resto de los grupos ($p<0.01$). Esta respuesta también se observó después de la 3ª y 5ª inyección, aunque en menor grado ($p<0.05$ con respecto al grupo salino en la 5ª administración). Por el contrario, se detectó un descenso de la temperatura corporal en los animales tratados con cocaína y la dosis más baja de MDMA (5 mg/kg) con respecto a los controles tras la primera, segunda, y tercera administración ($p<0.05$).

La temperatura de los animales fue afectada por la dosis de MDMA empleada [$F(3,46)=3.401$; $p<0.0254$], siendo más baja tras la administración de 5 mg/kg de MDMA sola o en combinación con cocaína (prueba de Newman-Keuls $p<0.05$) en comparación con el resto de los grupos. Considerando a todos los grupos como un conjunto, tras el 3^{er} y 5^o *binge* [$F(5,230)=2.710$; $p<0.0001$], la temperatura rectal de los animales fue menor que el resto de las inyecciones (prueba de Newman-Keuls $p<0.01$ para la segunda y la cuarta administración, y $p<0.05$ para la primera y la sexta).



ADMINISTRACIONES (BINGES)

Figura 14. Efecto de la MDMA y la cocaína sobre la temperatura rectal, 30 minutos después de la administración de una inyección de 5, 10, y 20 mg/kg de MDMA sola, o en combinación con 25 mg/kg de cocaína. La temperatura basal media fue de $36.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar. Diferencias con respecto a los ratones tratados con salino (M0): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

11.4.3. Peso corporal

El peso corporal de los ratones fue afectado por el tiempo [F(4,308)=3008; $p<0.0001$], aumentando en todos los grupos durante el procedimiento (prueba de Newman-Keuls $p<0.001$). La interacción tratamiento x dosis x tiempo [F(12,308)=2.075; $p<0.0184$] reveló que en el segundo y en el tercer día de tratamiento (Figura 15), el peso de los animales tratados con 20 mg/kg de MDMA disminuyó en comparación con los grupos control ($p<0.05$). Al tercer día del *binge*, los ratones que recibieron cocaína junto con 5 o 20 mg/kg de MDMA también mostraron una pérdida de peso corporal ($p<0.05$).

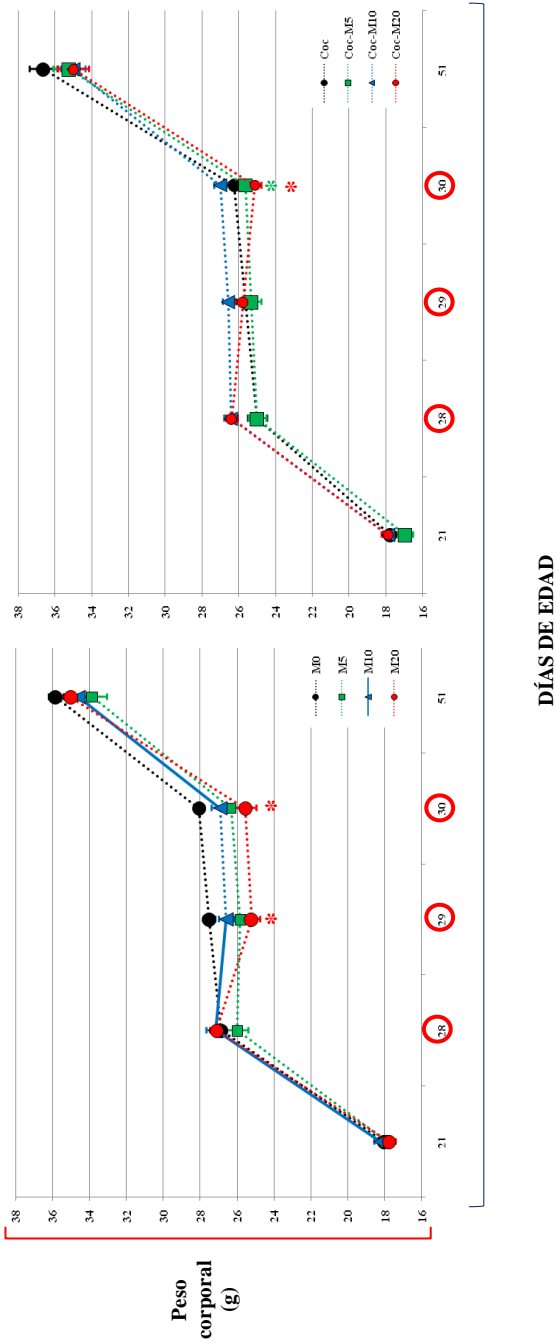


Figura 15. Efecto de la MDMA y la cocaína sobre el peso corporal en cada uno de los tres días que recibieron 5, 10, y 20 mg/kg de MDMA sola, o en combinación con 25 mg/kg de cocaína. Los datos se muestran como la media \pm el error estándar. Diferencias con respecto a los ratones tratados con salino (M0): * $p < 0.05$.

○ Días de tratamiento

11.4.4. Análisis de monoaminas cerebrales

Los datos de las concentraciones de monoaminas cerebrales se muestran en la Tabla 6. Los análisis de la concentración de DA en el estriado mostraron un efecto del tratamiento [$F(1,75)=27.101$; $p<0.0001$] y una interacción tratamiento x dosis [$F(3,75)=5.340$; $p<0.0022$]. Los niveles de este neurotransmisor en el estriado fueron más bajos en los ratones tratados únicamente con la MDMA (M5, M10 y M20), en comparación con los animales que recibieron también cocaína (Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20) ($p<0.01$). Los ratones tratados únicamente con la dosis alta de MDMA (M20) mostraron un decremento significativo de la concentración de DA con respecto al grupo control (M0) ($p<0.01$).

Los niveles de DOPAC en el estriado mostraron un efecto de la dosis de MDMA [$F(3,78)=4.821$; $p<0.004$] y la interacción tratamiento x dosis [$F(3,78)=10.193$; $p<0.0001$]. En comparación con los ratones que recibieron salino o únicamente cocaína (M0 y Coc), los animales que fueron tratados con MDMA mostraron una mayor concentración de DOPAC ($p<0.01$).

Específicamente, los animales que fueron tratados con ambas drogas exhibieron un incremento de los niveles de DOPAC [$F(3,44)=21.770$; $p<0.0001$], mayor que los ratones que recibieron cocaína ($p<0.05$ con respecto al grupo Coc-M10 y $p<0.01$ con respecto al resto de los grupos).

La concentración del HVA fue afectada por el tratamiento [$F(1,71)=13.661$; $p<0.0004$], la dosis de MDMA [$F(3,71)=3.423$; $p<0.002$] y la interacción tratamiento x dosis [$F(3,71)=9.695$; $p<0.0001$]. Los ratones que recibieron MDMA (5, 10 o 20 mg/kg) en combinación con cocaína (Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20) mostraron altos niveles de este metabolito [$F(3,44)=56.407$; $p<0.0001$] en comparación con los que recibieron sólo cocaína ($p<0.01$).

Estudio 2

El nivel de 5-HT en el estriado mostró un efecto del tratamiento [$F(1,76)=17.777$; $p<0.0001$], siendo más elevado en aquellos animales que recibieron la cocaína en comparación con los ratones tratados con la MDMA ($p<0.01$). Igualmente, se observó un efecto del tratamiento en el hipocampo [$F(1,80)=20.139$; $p<0.0001$], pero en esta estructura, los niveles de este neurotransmisor fueron más bajos en los animales tratados con cocaína junto con cualquiera de las dosis de MDMA (Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20) ($p<0.01$). La concentración de 5-HT en la corteza mostró un efecto de la interacción tratamiento x dosis [$F(3,77)=2.958$; $p<0.03$], donde los niveles más bajos se observaron en los ratones tratados con 20 mg/kg de MDMA en combinación con cocaína (Coc-M20), en comparación con los animales que únicamente recibieron esta dosis de MDMA (M20) ($p<0.01$).

La concentración del 5-HIAA en el estriado fue afectado por el tratamiento [$F(1,76)=17.777$; $p<0.0001$], la dosis de MDMA [$F(3,76)=4.065$; $p<0.009$] y la interacción tratamiento x dosis [$F(3,76)=5.751$; $p<0.0013$]. Los ratones que recibieron la MDMA en combinación con cocaína (Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20) mostraron mayores niveles de este metabolito [$F(3,44)=11.510$; $p<0.0001$] con respecto al grupo que recibió únicamente la cocaína (Coc) ($p<0.01$).

El nivel del 5-HIAA en el hipocampo también fue afectada por el tratamiento [$F(1,77)=18.281$; $p<0.0001$], la dosis de MDMA [$F(3,77)=3.147$; $p<0.02$] y la interacción tratamiento x dosis [$F(3,77)=7.831$; $p<0.0001$]. Los animales que recibieron la dosis más alta de MDMA (M20) exhibieron un decremento en el nivel de este metabolito [$F(3,43)=5.494$; $p<0.003$] en comparación con el resto de los grupos tratados con MDMA ($p<0.01$).

La concentración del 5-HIAA en la corteza fue afectado únicamente por el tratamiento [$F(1,76)=11.824$; $p<0.001$]. Los niveles más bajos de este metabolito se observaron en los animales que recibieron ambas drogas (Coc-M5, Coc-M10 y Coc-M20) ($p<0.01$).

	M0	M5	M10	M20	COC	COC-M5	COC-M10	COC-M20
ESTRIADO								
DA	10765 ± 1403	7852 ± 1102	7376 ± 871	5499 ± 840**	10055 ± 295	13022 ± 1418	10784 ± 1420	12536 ± 711
DOPAC	1996 ± 186	1598 ± 251	2496 ± 445	1992 ± 422	1232 ± 134	3307 ± 462**	1965 ± 136*	3080 ± 223**
HVA	168 ± 14	198 ± 52	105 ± 12	89 ± 11	94 ± 3	213 ± 25**	203 ± 12**	261 ± 17
5-HT	434 ± 44	351 ± 61	363 ± 27	364 ± 24	467 ± 81	484 ± 57	467 ± 33	477 ± 66
5-HIAA	318 ± 49	291 ± 43	277 ± 55	284 ± 63	233 ± 33	464 ± 76**	413 ± 33**	567 ± 70**
CORTEZA								
5-HT	217 ± 10	192 ± 18	257 ± 18	265 ± 12	251 ± 19	201 ± 13	236 ± 28	185 ± 23
5-HIAA	159 ± 17	196 ± 22	250 ± 9	239 ± 10	127 ± 14	185 ± 53	132 ± 37	142 ± 24
HIPOCAMPO								
5-HT	364 ± 43	316 ± 25	350 ± 67	313 ± 64	217 ± 20	185 ± 21	262 ± 31	232 ± 22
5-HIAA	230 ± 19	189 ± 14	232 ± 57	83 ± 15**	92 ± 7	116 ± 10	119 ± 21	142 ± 24

Tabla 6. Efectos a largo plazo de la administración de la MDMA sola o en combinación con cocaína sobre las concentraciones de las monoaminas cerebrales en el estriado, la corteza, y el hipocampo de ratones adolescentes. Todos los animales recibieron dos inyecciones al día de una misma dosis de MDMA (5, 10, y 20 mg/kg) sola o en combinación con cocaína (25 mg/kg) durante tres días (6 administraciones) (M0), ratones tratados con salino n=12; M5, ratones tratados con 5 mg/kg de MDMA n=9; M10, ratones tratados con 10 mg/kg de MDMA n=12; M20, ratones tratados con 20 mg/kg de MDMA n=10; Coc, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y salino, n=12; Coc-M5, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 5 mg/kg de MDMA n=12; Coc-M10, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 10 mg/kg de MDMA n=12; Coc-M20, ratones tratados con 25 mg/kg de cocaína y 20 mg/kg de MDMA n=12). Los datos muestran la media ± el error estándar. Diferencias significativas con respecto al grupo control ** p<0.01; * p<0.05.

Estudio 2

11.5. Discusión

Los resultados obtenidos en estos experimentos amplían las observaciones realizadas en el primer estudio. Podemos resumir que la administración de la MDMA y/o la cocaína durante la adolescencia promueve diferentes efectos conductuales y neuroquímicos a largo plazo en los ratones. Las consecuencias producidas por cada droga en particular, no son comparables con las alteraciones que se inducen cuando ambas sustancias son inyectadas al mismo tiempo.

Entre las fases del desarrollo de los seres humanos y de los animales, la adolescencia es un periodo único que se caracteriza por diversos cambios conductuales, neurobiológicos y neuroendócrinos (Laviola y cols., 1999; Spear, 2000b). Los roedores periadolescentes son hiperactivos, y muestran conductas filiales y de juego que son de suma importancia para el establecimiento de las relaciones sociales adultas (Cirulli y cols., 1996; Terranova y cols., 1993; 1998). En nuestro estudio, hemos observado que la exposición a la MDMA durante la adolescencia favorece a largo plazo el contacto social en los ratones. Además, este efecto no es afectado por la administración simultánea de cocaína.

En la prueba de interacción social, los ratones con experiencia previa a la MDMA sola, o en combinación con cocaína, dedicaron más tiempo a las conductas sociales cuando alcanzaron la edad adulta. Tres semanas después de haber administrado 5, 10, o 20 mg/kg de MDMA, se observó un incremento en el tiempo de investigación social, así como también en el tiempo medio (Unidad de Investigación Social) que los ratones dedicaron a cada contacto con el oponente co-específico. Cuando esta droga fue administrada junto con la cocaína, ambos factores de la interacción social mostraron los mismos resultados, o incluso se incrementaron, lo cual sugiere que la cocaína no modifica los efectos pro-sociales de la MDMA. Estas observaciones coinciden con las realizadas por Morley-Fletcher y cols., (2002), quienes describieron que los ratones tratados con MDMA (en un protocolo de tratamiento similar al nuestro) durante la adolescencia temprana (28 días de edad), exhiben un aumento de los contactos sociales cuando alcanzan la edad adulta. En

contraste, algunos estudios sugieren que la MDMA disminuye a largo plazo el contacto social en los ratones (Navarro y Maldonado, 1999; Maldonado y Navarro, 2001; Navarro y cols., 2004). Sin embargo, a pesar de utilizar la misma cepa de animales (OF1), hemos de tener en cuenta que los tratamientos y las pruebas conductuales empleados en estas investigaciones fueron llevadas a cabo en ratones adultos, los cuales además, fueron aislados durante un largo periodo de tiempo (30 días).

Por lo general, los efectos producidos por la MDMA sobre la prueba de interacción social se han estudiado en ratas adultas. Cuando estos animales son expuestos a la MDMA durante la adolescencia, se observa un decremento en el tiempo de investigación social, lo que refleja un incremento de la ansiedad (Fone y cols., 2002; Bull y cols., 2003, 2004; Clemens y cols., 2005; 2007). Estos resultados contrastan con los datos obtenidos en nuestro estudio, pero es necesario mencionar que nosotros no empleamos ratas, sino ratones adolescentes. Asimismo, la mayoría de estos estudios utilizan animales que además de ser oponentes sin manipulaciones del sistema olfativo, también son animales experimentales que han recibido tratamiento. Con respecto a nuestro procedimiento, los ratones oponentes no reciben ningún tipo de tratamiento farmacológico, muestran un comportamiento constante durante la prueba, y son incapaces de establecer algún contacto con el ratón experimental debido a la inhibición temporal de su sistema olfativo (son temporalmente anósmicos). De este modo, la conducta de los ratones experimentales es la única que se evalúa, y no es afectada por los animales oponentes. Otra diferencia importante es que en estos trabajos incluyen bajo el término de conducta social diversas conductas como agresividad, evitación, pasividad y exploración, las cuales son analizadas por separado en nuestro estudio.

Ya habíamos observado que en los ratones, la administración de cocaína durante la adolescencia no altera la conducta social a largo plazo (Estelles y cols., 2006). Similares resultados se han obtenido en este estudio, pero además hemos observado que la cocaína tampoco modificó los efectos pro-sociales de la MDMA. No obstante, esta droga aumentó la agresión de los animales, encontrándose más conductas de amenaza en los ratones que

Estudio 2

recibieron cocaína, sola o en combinación con MDMA, aunque en menor grado en los grupos que recibieron ambas drogas. Si bien estos ratones también mostraron un incremento de las conductas de ataque estas no alcanzaron un valor significativo. No existen resultados homogéneos sobre los efectos de la cocaína y las conductas agresivas en los seres humanos (Moeller y cols., 1997; Dhossche, 1999), o en los animales (Miczek, 1979; Miczek y O'Donnell, 1978; Estelles y cols., 2004). En un estudio previo realizado por nuestro laboratorio, demostramos que la administración de cocaína durante la adolescencia no incrementa la agresión en los animales cuando estos alcanzan la edad adulta (Estelles y cols., 2006). Sin embargo, estos efectos no pueden compararse con los resultados observados en el presente estudio ya que el régimen de tratamiento que empleamos en el primero (3 *binges* de 3 dosis separados por un intervalo de 48 horas con un total de 9 dosis), fue diferente al utilizado en el experimento actual. Por otro lado, los hámsteres tratados con una dosis baja de cocaína durante la adolescencia muestran mayores niveles de agresión (Harrison y cols., 2000). Asimismo, la administración prenatal de cocaína, si bien no aumenta la agresión, disminuye la respuesta antiagresiva de la morfina en ratones (Estelles y cols., 2006). Al igual que en nuestros estudios con cocaína, se ha descrito un incremento de las conductas de evitación y huida (Estelles y cols., 2004). Por lo tanto, podríamos sugerir que la MDMA interactúa con estos efectos debido a que los ratones expuestos a ambas drogas no exhiben este tipo de conductas.

En definitiva, la exposición a la MDMA durante la adolescencia indujo un aumento de la sociabilidad de los animales cuando estos fueron evaluados durante la edad adulta, lo cual indica que esta droga produce un efecto ansiolítico a largo plazo en la prueba de interacción social. Además, esta conducta no fue afectada por la administración simultánea de cocaína, aunque si bien, los ratones que recibieron ambas drogas al mismo tiempo mostraron un aumento significativo de la interacción social, este se acompañó de un incremento de las conductas agresivas, revelando así un perfil conductual distinto.

Es importante mencionar que en una serie de estudios previos (Daza-Losada, 2005, Efectos conductuales a largo plazo de la administración de MDMA y cocaína durante la

adolescencia en ratones, Trabajo de Investigación de la Universidad de Valencia) hemos determinado que la exposición a la MDMA durante la adolescencia no produce cambios aparentes a largo plazo, cuando los ratones son evaluados en la edad adulta. La experiencia previa con esta droga no afecta la actividad motora espontánea, la ansiedad (evaluada con el LEC), o la memoria (evaluada mediante la prueba de evitación pasiva) de los animales que han recibido MDMA durante el periodo adolescente. Sin embargo, la administración de la MDMA en combinación con cocaína aunque no produce cambios significativos en la actividad locomotora, y ni produce déficits de memoria a largo plazo, induce diferencias importantes en los niveles de ansiedad de los animales. En particular, los ratones que recibieron ambas drogas durante la adolescencia, fueron más impulsivos y menos temerosos cuando fueron evaluados en la edad adulta en el LEC, permaneciendo durante más tiempo en los brazos abiertos del laberinto. En un estudio reciente, hemos observado que la exposición a la cocaína durante la adolescencia produce este mismo perfil conductual, es decir falta de miedo e impulsividad (Estelles y cols., 2007).

Los efectos a largo plazo de la MDMA sobre la ansiedad, pueden evaluarse desde dos perspectivas diferentes, mediante la confrontación entre los animales experimentales y un oponente co-específico (prueba de interacción social) o con una prueba etológicamente aversiva (LEC). El LEC es empleado habitualmente como una herramienta en la evaluación de los efectos ansioselectivos de las drogas (Carobrez y Bertoglio, 2005). Las sustancias ansiolíticas con eficacia clínica son capaces de incrementar el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto elevado, o el número de entradas en estos brazos (Lister, 1987; Pellow y cols., 1985). Mediante el uso del LEC hemos observado que la experiencia con cocaína durante la adolescencia induce un decremento de la ansiedad a largo plazo que no es afectado por la co-administración con la MDMA (Daza-Losada, 2005, Trabajo de Investigación). Sin embargo, en este mismo estudio observamos que la exposición a la MDMA durante la adolescencia no induce cambios significativos en LEC cuando estos animales son evaluados en la edad adulta, lo cual, contrasta con las alteraciones observadas en los ratones tratados con cocaína, sola o en combinación con MDMA. Estos animales incrementan el tiempo y el porcentaje del tiempo de permanencia

Estudio 2

en los brazos abiertos del laberinto, así como también el número y el porcentaje de entradas en estos brazos. Asimismo, se observa un decremento en el tiempo y en el porcentaje del tiempo de permanencia en los brazos cerrados, así como también un menor porcentaje de entradas en estos brazos (Daza-Losada, 2005, Trabajo de Investigación).

Hasta ahora, no se habían realizado estudios que evaluaran los efectos a largo plazo de la administración de la MDMA en ratones en función los resultados observados tras la administración aguda de las dosis empleadas. La administración aguda o subcrónica de bajas dosis de MDMA (1 a 8 mg/kg) aumenta la ansiedad, pero a dosis altas (20 mg/kg), no se encuentran cambios o incluso podría observarse un efecto ansiolítico (Lin y cols., 1999; Navarro y Maldonado, 2002). Existen pocos estudios en los que se evalúe la administración de la MDMA en ratas adolescentes no presentado resultados concordantes. Tras el tratamiento crónico con 10 mg/kg de MDMA durante la adolescencia, se ha observado un efecto ansiolítico 5 días después de la última administración de la droga, caracterizado por un incremento en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Piper y Meyer, 2004). Sin embargo, 10 días después de haber administrado el mismo tratamiento no se observan alteraciones significativas en el LEC (Piper y cols., 2005). Recientemente, Faria y cols., (2006) han descrito un incremento de la ansiedad (disminución del número de entradas en los brazos abiertos) en ratas adolescentes, 10 días después de haber administrado 3 inyecciones de 10 mg/kg de MDMA. Muchos de los estudios que evalúan los efectos a largo plazo de la MDMA sobre la ansiedad se han realizado con ratas adultas, en los cuales una vez más se han observado incrementos (Gurtman y cols., 2002; Walker y cols., 2007), decrementos (Mechan y cols., 2002a), o ningún cambio (Sumnall y cols., 2004; Ho y cols., 2004; Cassel y cols., 2005) en los niveles de ansiedad. Estos resultados divergentes podrían explicarse en principio por el uso de diferentes especies (ratas vs ratones), en los cuales la MDMA ha demostrado una interacción diferente sobre los sistemas monoaminérgicos (Easton y Marsden, 2006). Asimismo, la mayor parte de estos estudios emplean diferentes protocolos de tratamientos (dosis y número de exposiciones), así como también diferentes intervalos de tiempo entre la última administración de la droga y la realización de las pruebas conductuales.

La cocaína induce un efecto ansiogénico en el LEC tras la inyección aguda, (Rogerio y Takahashi, 1992a; 1992b; Yang y cols., 1992), el tratamiento crónico (Hayase y cols., 2005), o después de un periodo de abstinencia (Paine y cols., 2002; Hayase y cols., 2005). No obstante, se ha encontrado una reducción en la aversión tras el tratamiento crónico con esta droga con la prueba de la caja blanco/negro (Costall y cols., 1989). En fechas recientes, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, hemos descrito que los ratones adolescentes tratados con un patrón *binge* de cocaína (9 dosis) son, cuando alcanzan la edad adulta, menos ansiosos que los animales tratados únicamente con suero fisiológico (Estelles y cols., 2007). Posteriormente confirmamos y ampliamos estos resultados al observar que este efecto ansiolítico no es afectado por la co-administración con MDMA (Daza-Losada, 2005, Trabajo de investigación). Los grupos expuestos a ambas drogas incluso pasan más tiempo en los brazos abiertos del laberinto. En resumen, aunque la conducta en el LEC no es afectada en ratones expuestos a la MDMA durante la adolescencia, cuando se administra cocaína se observa un perfil ansiolítico a largo plazo que se mantiene o incluso aumenta cuando ambas drogas se inyectan al mismo tiempo.

Teniendo en cuenta los estudios realizados, podemos concluir que la exposición a la MDMA durante la adolescencia provoca un incremento del tiempo que los animales adultos pasan interactuando con sus co-específicos, no modificándose este efecto al coadministrar cocaína. La experiencia con cocaína durante esta fase del desarrollo incrementa el tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos del LEC, presentado un perfil ansiolítico que no se afecta con la administración de MDMA. En consecuencia, los ratones expuestos a ambas drogas durante la adolescencia presentan un perfil conductual específico en la edad adulta, siendo menos ansiosos y más sociables.

Algunos autores han descrito que en ratones adultos (Itzhak y Achat-Mendes, 2004), la exposición a la MDMA durante la adolescencia induce un daño dopaminérgico en el estriado. No obstante, no se ha observado neurotoxicidad cuando la MDMA fue administrada junto con la cocaína. Por otro lado, el tratamiento con la MDMA no disminuye la concentración de 5-HT, e incluso tras recibir ambas drogas se detecta un

Estudio 2

incremento en el estriado, aunque observamos decrementos no significativos en el hipocampo y en la corteza.

En este estudio, no encontramos cambios en la concentración de 5-HT tras la administración de la MDMA, lo cual, concuerda con datos obtenidos por otros investigadores (Battaglia y cols., 1988; O'Callaghan y Miller, 1994; Colado y cols., 2001; O'Shea y cols., 2001; Escobedo y cols., 2005; Saadat y cols., 2006b). No obstante, Achat-Mendes y cols., (2005) han descrito que los ratones de la cepa Swiss Webster muestran una disminución de los niveles de 5-HT tras la administración de la MDMA. Cabe destacar que esta droga habitualmente es administrada en ratones adultos, los cuales, además de exhibir una respuesta hipertérmica más intensa, son más sensibles a los daños neurotóxicos inducidos por esta sustancia (Reveron y cols., 2005).

Habitualmente se menciona que los daños producidos por la MDMA en los ratones son especialmente dopaminérgicos (Logan y cols., 1988; Laverty y Logan, 1990; Miller y O'Callaghan, 1994; Colado y cols., 2001; O'Shea y cols., 2001; Saadat y cols., 2006b), lo cual, ha sido confirmado por nuestros estudios. Por otro lado, la co-administración de cocaína y la MDMA no produjo daños neurotóxicos dopaminérgicos o serotoninérgicos. Esta falta de neurotoxicidad podría tener diversas explicaciones. En primer lugar, el efecto conjunto de la cocaína y la MDMA sobre la temperatura rectal es completamente diferente al que se observa tras la administración única de la MDMA. En general, se sugiere que la prevención de la respuesta hipertérmica inducida por la MDMA es suficiente para bloquear los efectos neurotóxicos de esta droga (Colado y cols., 2001). Con nuestro régimen de tratamiento, sólo aquellos animales que recibieron 20 mg/kg de MDMA exhibieron un aumento de la temperatura corporal, mientras que los ratones que recibieron ambas drogas (a cualquier dosis estudiada) no mostraron cambios significativos. Una segunda posibilidad podría ser que la cocaína interfiriera con el sistema de recaptación de DA, mediante el bloqueo de la entrada de la MDMA al interior de la terminal nerviosa. Algunos autores han observado que el tratamiento previo con el GBR 12909 previene la pérdida a largo plazo de la concentración de 5-HT en el estriado de los ratones de la cepa Swiss Webster (O'Shea y

cols., 2001). Sin embargo, algunos estudios con microdiálisis han demostrado que el bloqueo de los sitios de recaptación de DA no inhibe la liberación de DA inducida por la MDMA en el estriado (Mechan y cols., 2002a; Camarero y cols., 2002), lo que indica que esta sustancia penetra la terminal nerviosa dopaminérgica mediante difusión, más que a través del DAT. Nuestros resultados concuerdan con esta hipótesis, ya que los animales tratados con ambas drogas muestran respuestas conductuales similares, o incluso más potentes que las observadas en los grupos tratados sólo con la MDMA. En este sentido, algunos investigadores han obtenido los mismos resultados mediante el empleo de inhibidores de la recaptación de DA (Marek y cols., 1990; O'Shea y cols., 2001). En tercer lugar, la cocaína podría impedir la entrada de algún metabolito neurotóxico de la MDMA, al interior de la terminal pre-sináptica mediante el bloqueo del DAT. Esto podría explicar porque que el GBR 12909 no afecta la hipertermia producida por la MDMA, pero si previene los efectos neurotóxicos de esta droga (O'Shea y cols., 2001). Nuestros estudios apoyan la teoría de que el aumento de la temperatura corporal es un elemento clave en las alteraciones producidas por la MDMA. No obstante, los efectos neurotóxicos de esta droga podrían ser resultado de otros mecanismos añadidos a los metabolitos tóxicos de la MDMA, como la deaminación de la DA y/o la autooxidación (Sprague y Nichols, 2005). La cocaína probablemente afecta a uno o varios de estos procesos, lo que en consecuencia, bloquearía la neurodegeneración dopaminérgica inducida por la MDMA en el cerebro de los ratones.

Los ratones podrían ser empleados como un modelo animal en el estudio de la neurotoxicidad inducida por la MDMA, lo cual, sería de gran ayuda en la caracterización de las consecuencias conductuales de la disfunción del sistema dopaminérgico (Itzhak y Achat-Mendes, 2004). Los transportadores monoaminérgicos en los seres humanos y en los ratones son similares en cuanto a su sensibilidad a la MDMA (Han y Gu, 2006). El hecho de que esta droga funcione como una neurotoxina dopaminérgica en los ratones es, para algunos autores, una consecuencia de la producción de algún metabolito neurotóxico. Este fenómeno podría depender de diversos factores como los protocolos de dosificación, de la selectividad de los metabolitos por las terminales nerviosas monoaminérgicas, o quizás al

Estudio 2

estado funcional de los mecanismos de captación de radicales libres característicos de ciertas terminales nerviosas (Colado y cols., 2004). Estas observaciones apoyan las hipótesis de Itzhak y Achat-Mendes (2004), quienes proponen el desarrollo de un modelo animal para el estudio de la neurotoxicidad dopaminérgica y serotoninérgica inducida por la administración repetida de altas dosis de MDMA, como por ejemplo el empleo de los ratones de la cepa Swiss Webster.

El presente estudio indica que los efectos conductuales producidos por la MDMA, ya sea sola o en combinación con cocaína, no están relacionados con los cambios neuroquímicos inducidos por esta droga a largo plazo. Hemos observado que la administración única de MDMA promueve una lesión especialmente dopaminérgica en los ratones de la cepa OF1, e incrementa los contactos sociales de estos animales en la prueba de interacción social. Sin embargo, cuando esta droga es administrada junto con la cocaína no se producen daños neurotóxicos significativos, pero los efectos pro-sociales de la MDMA continúan manifestándose. Por tal motivo, sugerimos que los efectos conductuales producidos por la MDMA no dependen de los daños neurotóxicos dopaminérgicos producidos por esta droga a largo plazo. Por otro lado, la exposición a la cocaína y a la MDMA durante la adolescencia promueve cambios conductuales más complejos, los cuales, podrían observarse aún en ausencia de daños neuroquímicos. Por lo tanto, el decremento de la actividad dopaminérgica observada en los ratones tratados con la MDMA, al parecer no está relacionado con la respuesta conductual de los animales.

Al analizar las consecuencias del consumo simultáneo de cocaína y la MDMA, hemos de considerar los diferentes mecanismos de acción que caracterizan a ambas drogas. Por una parte, la cocaína tiene la capacidad de unirse a los transportadores monoaminérgicos, con lo cual, inhibe la recaptación de DA, la 5-HT y la NA y en consecuencia, se produce un aumento los niveles de estos neurotransmisores en el espacio extracelular. Por otro lado, el mecanismo de acción de la MDMA es más complejo, y comprende la liberación de 5-HT y DA durante la fase aguda (Colado y cols., 2004). La MDMA inhibe principalmente al SERT (constante de inhibición $K_i = 0.64 \mu\text{M}$), y en menor grado al NAT ($K_i = 1.75 \mu\text{M}$) y

al DAT ($K_i = 4.87 \mu\text{M}$). Por otro lado, la cocaína es capaz de inhibir estos transportadores con un rango de concentración más reducido ($K_i = 0.23, 0.48$ y $0.74 \mu\text{M}$; DAT>NAT>SERT respectivamente) (Han y Gu, 2006). Igualmente, la MDMA muestra una afinidad moderada por una amplia variedad de receptores, incluyendo los α_2 -adrenérgicos, los 5-HT₂ serotoninérgicos, M1 muscarínicos and H1 histaminérgicos, cuya activación podría modular ciertos efectos de esta droga (Battaglia y cols., 1988). De hecho, la 5-HT tiene un papel fundamental en los efectos psicotrópicos de la MDMA, más que en los de la cocaína (Itzhak y Ali, 2006).

La administración repetida de cocaína o MDMA altera los sistemas de neurotransmisión sobre los que actúan. La cocaína modifica la función de los receptores y afecta los procesos de transducción (Anderson y Pierce, 2005). La exposición repetida a esta droga produce una regulación a la alza de la vía de señalización del AMPc (Nestler, 2004a; 2004b), la cual, aumenta la actividad del factor de transcripción del AMPc que responde a la proteína de unión (CREB) (Walters y cols., 2003). La actividad del sistema dopaminérgico central de los animales jóvenes varía en función de los cambios que se producen en las concentraciones de las moléculas que son críticas para el desarrollo normal, las cuales, están relacionadas con los receptores dopaminérgicos y el AMPc (Teicher y cols., 1993; Andersen y cols., 2002). De esta forma, la exposición a los psicoestimulantes durante la adolescencia, podría producir diferentes respuestas moleculares cualitativas y/o cuantitativas, como alteraciones en la expresión del ΔFosB (Ehrlich y cols., 2002). Por otra parte, la administración repetida de bajas dosis de MDMA induce sensibilización en las ratas (Spanos y Yamamoto, 1989; Kalivas y cols., 1998). Asimismo, este fenómeno está asociado con un incremento de la concentración extracelular de DA, el cual, se produce después de cada administración de la droga (Kalivas y cols., 1998). En los ratones, la MDMA induce sensibilización a dosis subsecuentes de la misma droga, o de cocaína (sensibilización cruzada), aunque el mantenimiento de esta sensibilización está relacionada con el grado de neurotoxicidad que se produce (Itzhak y cols., 2003).

Estudio 2

En definitiva, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían ayudar a explicar las consecuencias del uso combinado de la cocaína y la MDMA en los policonsumidores, y confirman que la adolescencia es un periodo crítico durante el cual, los efectos a las drogas psicoactivas inducen consecuencias a largo plazo. Además, nuestros resultados indican que la exposición a la MDMA y a la cocaína durante la adolescencia, produce diversas alteraciones conductuales cuando los animales alcanzan la edad adulta, las cuales, podrían observarse aún en ausencia de daños neurotóxicos dopaminérgicos.

Estudio 3. Efectos reforzantes y reinstauración del CPL inducido por la MDMA en ratones adolescentes



12. Estudio 3. Efectos reforzantes y reinstauración del CPL inducido por la MDMA en ratones adolescentes

Este estudio ha sido publicado en “*Neuropsychopharmacology* (2007) 32:1750-9”, ver anexo III.

12.1. Introducción

El consumo de la MDMA ha aumentado en los últimos 15 años, especialmente entre los adolescentes y adultos jóvenes asiduos a las fiestas *raves* o a las discotecas, siendo una de las drogas de abuso más populares en Europa (Cole y Sumnall, 2003a). En las ratas, esta sustancia favorece la liberación presináptica de DA y 5-HT (Schmidt y cols., 1987; Yamamoto y Spanos, 1988; Hiramatsu y Cho, 1990; Gough y cols., 1991; Koch y Galloway, 1997; Kankaanpaa y cols., 1998), y aumenta los niveles de estos neurotransmisores en el NAcc (White y cols., 1994; Kankaanpaa y cols., 1998; O’Shea y cols., 2005), en especial, favorece la transmisión dopaminérgica en el *Shell* del NAcc, en comparación con el *Core* (Cadoni y cols., 2005). Asimismo, tras el incremento inicial de la concentración extracelular de 5-HT, los niveles de este neurotransmisor, así como también la densidad del SERT, disminuyen a largo plazo en estos animales (Ricaurte y cols., 1985; Boot y cols., 2002; McGregor y cols., 2003b). En los ratones, la administración repetida de esta droga produce un decremento sustancial de la concentración de DA en el estriado, pero no afecta los niveles de 5-HT (Stone y cols., 1987b; Colado y cols., 2004; Escobedo y cols., 2005). La MDMA también estimula la liberación de la ACh en la CPF, el estriado, y el hipocampo dorsal de la rata (Acquas y cols., 2001; Nair y Gudelsky, 2006a).

Los efectos reforzantes de la MDMA han sido demostrados mediante el procedimiento de la AA. Los primates (Beardsley y cols., 1986; Lamb y Griffiths, 1987; Fantegrossi y cols., 2002; 2004; Lile y cols., 2005), las ratas (Braida y Sala, 2002; Cornish y cols., 2003; Schenk y cols., 2003; Daniela y cols., 2004; Braida y cols., 2005), y los ratones (Trigo y

Estudio 3

cols., 2006) aprenden a realizar una respuesta operante con la finalidad de obtener una infusión de MDMA, lo cual sugiere que esta droga posee potencial adictivo.

El CPL es un modelo animal empleado en el estudio de las propiedades afectivas o apetitivas de las drogas. Este procedimiento se basa en la asociación de estímulos ambientales neutros con una droga, lo que resulta en la adquisición de una preferencia por aquellos estímulos específicos (secundarios o refuerzo condicionado). Con el empleo de este modelo animal se ha observado que la MDMA produce preferencia de lugar en las ratas (Bilsky y Reid, 1991; Bilsky y cols., 1990, 1991; 1998; Schechter, 1991; Marona-Lewicka y cols., 1996; Meyer y cols., 2002; Cole y cols., 2003; Braida y cols., 2005; Herzig y cols., 2005) y en los ratones (Salzmann y cols., 2003; Robledo y cols., 2004a; 2004b).

A pesar de que las propiedades reforzantes de la MDMA han sido demostradas repetidamente, aún no se conoce completamente el potencial adictivo de esta droga. La adicción puede ser considerada como un desorden crónico caracterizado por la “recaída” en el consumo de la droga. El *craving* es una sensación subjetiva de intenso deseo por la sustancia, experimentada por los sujetos adictos que les motiva a buscar la droga y en consecuencia puede producir la recaída a su consumo (O’Brien, 1997). En animales de laboratorio es difícil evaluar el *craving*, pero es posible examinar la recaída de forma directa si tras la adquisición y la subsecuente extinción de una respuesta conductual particular (como el presionar una palanca para obtener una inyección de una droga por ejemplo), el animal reinicia esta respuesta, la cual, habitualmente es referida como reinstauración (Carroll y Comer, 1996). Al parecer, esta recuperación de la repuesta aprendida refleja la re-inducción del *craving*, conduciendo a la búsqueda de la droga tras un periodo de extinción. Recientemente, el paradigma del CPL ha sido empleado para estudiar el fenómeno de la recaída en los animales de laboratorio. En este procedimiento, los animales son entrenados a adquirir un CPL, el cual, se extingue mediante la exposición de los sujetos al compartimiento previamente asociado con la droga (en ausencia de los efectos farmacológicos producidos por la misma). Se ha observado que el mismo estímulo que

reinstaura la AA, es capaz de inducir la reinstauración de la preferencia de lugar. Los eventos ambientales más importantes que podrían conducir a la reinstauración son la re-exposición a la droga, la presentación de claves ambientales asociadas a la misma, y la exposición a situaciones estresantes (Shalev y cols., 2002; Shaham y cols., 2003; Weiss y cols., 2005; Ribeiro Do Couto y cols., 2005a; 2005b; 2006; Maldonado y cols., 2006).

Este trabajo es el primero en determinar los efectos a largo plazo de la MDMA sobre la extinción y la reinstauración del CPL en ratones adolescentes. Teniendo en cuenta que el protocolo de condicionamiento podría influir en la adquisición del CPL, realizaremos dos experimentos (por separado) empleando dos protocolos diferentes durante la fase de adquisición de la preferencia de lugar. En el primer experimento, los animales serán entrenados bajo un protocolo de dos sesiones por día durante la fase de condicionamiento del CPL (la MDMA y el suero fisiológico serán administrados el mismo día durante 4 días consecutivos), mientras que en el segundo experimento, los animales serán entrenados con un protocolo de días alternos (4 inyecciones de MDMA y suero fisiológico administradas cada 48 horas). Estas serán las únicas modificaciones realizadas en los procedimientos. Tras la adquisición del CPL inducido por la MDMA, todos los animales serán sometidos a sesiones de extinción hasta que no existan diferencias significativas con respecto a la prueba de pre-condicionamiento, y posteriormente, evaluaremos los efectos reinstauradores de la re-exposición a la MDMA.

Estudio 3

12.2. Material y métodos

12.2.1. Sujetos

En la realización de este estudio se utilizaron un total de 200 ratones albinos macho de la cepa OF1 adquiridos a los laboratorios Charles River (Barcelona, España). Los animales tenían 21 días de edad (10-13 gr) a su llegada a nuestro laboratorio y fueron alojados en grupos de 4 en cajas de plástico opacas (25 cm x 25 cm x 14.5 cm) siete días antes del comienzo de los experimentos. Las condiciones ambientales del laboratorio se controlaron permanentemente y fueron las siguientes: temperatura constante (21 ± 2 °C), ciclo de luz 12/12 h (fase con luz apagada de 7:30 a 19:30 h). Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento, excepto durante las pruebas conductuales. La limpieza de las jaulas se realizó una vez por semana.

Los animales fueron manipulados (acariciados suavemente) dos días antes de la fase de precondicionamiento, con intención de reducir los niveles de estrés en respuesta a los procesos experimentales. Los procedimientos de tratamiento y cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices marcadas por la comunidad internacional recogidas en: European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 de noviembre de 1986).

12.2.2. Tratamiento farmacológico

Los animales fueron inyectados ip con 5, 10 o 20 mg/kg de MDMA (hidrocloruro de \pm 3,4-metilendioximetanfetamina, Laboratorios Sigma-Aldrich, España), en un volumen de 0,01 ml/g. Los grupos control recibieron solución salina fisiológica (NaCl 0,9%), la cual, también fue empleada para disolver la droga.

12.2.3. Aparatos y procedimiento

Los diferentes aparatos empleados en la realización de este estudio se muestran en la Figura 16.

12.2.3.1. Condicionamiento de la preferencia de lugar

Para el condicionamiento de la preferencia de lugar se emplearon 8 cajas idénticas de plexiglas con dos compartimientos de igual tamaño (30.7 cm de largo X 31.5 cm de ancho X 34.5 cm de alto), separadas por un área central de color gris (13.8 cm de largo X 31.5 cm de ancho X 34.5 cm de alto). Los compartimientos tienen paredes de diferente color (blancas vs negras) y distinta textura de suelo (liso en el compartimiento negro y rugoso para el blanco). Ambos compartimientos presentan una puerta movable, tipo guillotina, que los separa del compartimiento o pasillo central. Cada uno de los compartimientos de condicionamiento cuenta con 4 células fotoeléctricas, mientras que la zona central tiene 6, lo que permite el registro de la posición del animal y los cruces de un compartimiento al otro. El equipo es controlado por dos computadoras IBM PC mediante el uso de un software MONPRE 2z (CIBERTEC, SA, España).

Fase de adquisición

El condicionamiento de lugar consiste en 3 fases, las cuales se llevaron a cabo durante el ciclo de oscuridad y siguiendo un procedimiento “no sesgado” en términos de la preferencia inicial espontánea (Manzanedo y cols., 2001). Durante la primera fase o pre-condicionamiento (Pre-C), los ratones tuvieron libre acceso a ambos compartimientos del aparato durante 15 minutos (900 s) cada día durante 3 días. Al tercer día, el tiempo que cada animal pasa en cada compartimiento fue registrado durante 900 s. Los animales que muestran una fuerte aversión (menos del 33% del tiempo de la sesión, es decir menos de 300 s) o una fuerte preferencia (más del 67%, es decir más de 600 s) por alguno de los

Estudio 3

compartimientos son descartados del procedimiento. De acuerdo con lo anterior, se descartaron un total de 25 animales que no cumplían con los criterios establecidos.

Uno de los compartimientos se elige para ser asociado con el fármaco y el otro con el vehículo, de tal manera que dentro de cada grupo, la mitad de los animales reciben la MDMA, o la solución salina fisiológica, en el lugar menos preferido y la otra mitad en el más preferido, balanceándose también el color del compartimiento. No deben existir diferencias significativas en el tiempo que los animales han pasado en el compartimiento asociado al fármaco o al vehículo en la fase de pre-condicionamiento. Esta medida es de gran importancia para el procedimiento experimental ya que ayuda a evitar que exista algún tipo de sesgo en la preferencia antes de comenzar el experimento. Después de asignar los compartimientos, un ANOVA demostró que no hubo diferencias significativas entre el tiempo que pasan en el compartimiento asociado con la droga y los compartimientos asociados con el vehículo durante la fase de Pre-C.

En la segunda fase (condicionamiento), los animales fueron condicionados con MDMA, o salino, mediante 4 asociaciones con el compartimiento respectivo. En el **experimento 1**, los animales recibieron 2 asociaciones (MDMA y vehículo) cada día: los animales del grupo MDMA recibieron una inyección de solución salina fisiológica antes de ser confinados al compartimiento asociado con el vehículo durante 30 minutos, y después de un intervalo de 4 horas, recibieron MDMA antes de ser confinados al compartimiento asociado con la droga durante 30 min; los animales control recibieron una inyección de salino fisiológico antes de ser confinados durante 30 minutos al primer compartimiento, y después de un intervalo de 4 horas, los animales recibieron una nueva inyección de suero fisiológico y fueron confinados 30 minutos al segundo compartimiento (días 4 al 7, 30-33 días de edad). En el **experimento 2**, los ratones recibieron solo una asociación (MDMA o vehículo) por día: los animales del grupo MDMA recibieron una inyección de MDMA inmediatamente antes de ser confinados al compartimiento asociado con la droga durante 30 minutos en los días 4, 6, 8 y 10 (30, 32, 34 y 36 días de edad respectivamente) y recibieron suero fisiológico antes de ser confinados al compartimiento asociado al vehículo durante 30

minutos en los días 5, 7, 9 y 11; los animales del grupo control recibieron una inyección de suero fisiológico antes de ser confinados durante 30 minutos al primer compartimiento en los días 4, 6, 8 y 10, y de nuevo otra inyección de suero fisiológico tras la cual se confinan 30 min en el otro compartimiento en los días 5, 7, 9 y 11. El área central no fue utilizada durante el condicionamiento y su acceso fue bloqueado mediante puertas tipo guillotina. Durante la tercera fase o post-condicionamiento (Post-C), el 8º día (experimento 1) o el 12º día (experimento 2), las puertas guillotina que separaban ambos compartimientos eran retiradas y el tiempo que los ratones, sin ningún tipo de tratamiento, pasaban en cada compartimiento fue registrado durante 900 s. La diferencia en segundos entre el tiempo que los animales permanecen en el compartimiento asociado con la droga durante la prueba de Post-C, y el tiempo que pasan durante la prueba de Pre-C es una medida del grado de condicionamiento inducido por la droga. Si esta diferencia es positiva entonces la droga ha inducido una preferencia por el compartimiento asociado con la misma, mientras que lo opuesto indica la inducción de una aversión.

Fase de extinción

Los grupos control y los grupos condicionados con MDMA fueron sujetos a una sesión de extinción semanal, la cual, consistió en colocar los animales en el aparato (sin las puertas guillotina que separan los compartimientos) durante 15 minutos. Este procedimiento se repitió hasta que el tiempo que permanecían en el compartimiento asociado con la droga para cada grupo condicionado con MDMA fuese similar a lo observado en el Pre-C. Así, en cada grupo, todos los animales recibieron el mismo número de sesiones de extinción, independientemente de sus valores individuales, puesto que el criterio de extinción fue una falta de diferencias significativas con respecto a los valores del Pre-C. Los grupos condicionados con salino sólo realizaron una sesión de extinción para confirmar la falta de CPL. La extinción del CPL siempre es confirmada por una segunda sesión llevada a cabo 48 horas después de la última prueba de extinción. La extinción semanal fue elegida en base a un estudio previo donde se empleó este protocolo con la finalidad de evaluar la

Estudio 3

reinstauración del CPL inducido por D-metanfetamina tras la administración una dosis *priming* (Li y cols., 2002).

Fase de reinstauración

Los efectos de una dosis *priming* de MDMA fueron evaluados 48 horas después de la confirmación de la extinción. Las pruebas de reinstauración (llevadas a cabo entre las 10:00 y las 14:00 hrs.) fueron las mismas que para las sesiones de Post-C (deambular libremente durante 15 minutos) excepto que los animales fueron sometidos a la prueba de reinstauración 15 minutos después de recibir una administración “no contingente” de la dosis respectiva de MDMA.



Figura 16. Equipo de condicionamiento de la preferencia de lugar.

12.2.3.2. Análisis de monoaminas cerebrales

Para llevar a cabo esta prueba se emplearon 8 nuevos grupos de animales por separado, los cuales, recibieron los mismos tratamientos aplicados en el primer y segundo experimento, es decir, administración de vehículo o MDMA (5, 10 o 20 mg/kg) diariamente durante 4 días consecutivos (protocolo diario), o una inyección diaria de vehículo o MDMA (5, 10 o 20 mg/kg) en días alternos (protocolo de días alternos). El día correspondiente de la prueba, 24 (protocolo diario) o 48 (protocolo intermitente) horas después de la última inyección de MDMA, los ratones fueron sacrificados por fractura cervical. El procedimiento empleado para la determinación de las monoaminas cerebrales fue similar al descrito en el Estudio 1.

12.3. Análisis estadístico

Para evaluar la adquisición del CPL en ambos experimentos, los datos del tiempo de permanencia en el compartimiento asociado con la droga fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) mixto con una variable *entre* “dosis de MDMA” con cuatro niveles (SAL, MDMA 5, 10 y 20), y una variable *intra* “días” con dos niveles (Pre-C y Post-C). Las comparaciones posteriores se realizaron con la prueba de Newman Keuls. Con los datos del Post-C, se realizó una ANOVA de una vía con un factor *entre* (dosis de MDMA) cuando la variable dosis MDMA resultó significativa con respecto al Post-C. Durante las pruebas de extinción y reinstauración, las diferencias en el tiempo de permanencia en el compartimiento asociado con la droga entre el Pre-C y cada sesión de extinción o de reinstauración fueron analizadas con una prueba “*t de student*”. Cada monoamina o metabolito en cada estructura cerebral estudiada fue analizada mediante un ANOVA de dos vías con dos variables *entre* “protocolo de tratamiento” con dos niveles (diario y alterno) y “dosis de MDMA” con cuatro niveles (SAL, MDMA 5, 10 y 20).

Estudio 3

12.4. Resultados

12.4.1. Experimento 1. Efectos de la MDMA sobre la adquisición, la extinción y la reinstauración de la preferencia de lugar utilizando un protocolo de dos sesiones/día durante la adquisición del CPL.

Los resultados obtenidos en el Experimento 1 están representados en la Figura 17.

Fase de adquisición

El ANOVA realizado con los resultados obtenidos en la prueba Post-C reveló un efecto significativo de la variable “Días” ($F(1,36) = 4.830$; $p < 0.0345$), lo que indica que tras la fase de condicionamiento, los ratones pasaron más tiempo en el compartimento asociado con el fármaco (Post-C vs Pre-C). Por otro lado, la variable “dosis MDMA” ($F(3,36) = 0.736$; $p < 0.5376$) y la interacción dosis MDMA x días [$F(3,36) = 1.224$; $p < 0.315$] no mostraron cambios significativos.

Fase de extinción

Los animales tratados con salino no exhibieron CPL en el Post-C, y no mostraron CPL en la primera sesión de extinción. Por el contrario, aunque los animales condicionados con 5 mg/kg de MDMA no mostraron CPL en el Post-C, si exhibieron un claro CPL cuando fueron sometidos a la primera sesión de extinción, realizada una semana después del Post-C ($p < 0.001$, diferencias significativas con respecto al Pre-C), y este CPL duró una semana más ($p < 0.01$). De la misma forma, en la primera sesión de extinción los animales condicionados con 10 y 20 mg/kg mostraron CPL, el cual se mantuvo durante 12 ($p < 0.05$) y 21 semanas más ($p < 0.05$), respectivamente.

Fase de reinstauración

La dosis de 2.5 mg/kg de MDMA no produce reinstauración en los animales condicionados con solución salina. Por otra parte, en los animales condicionados con 5, 10, o 20 mg/kg de MDMA tras la confirmación de la extinción, la administración de la mitad de la dosis utilizada para el condicionamiento (2.5, 5 o 10 mg/kg, respectivamente) no produce reinstauración de la preferencia de lugar.

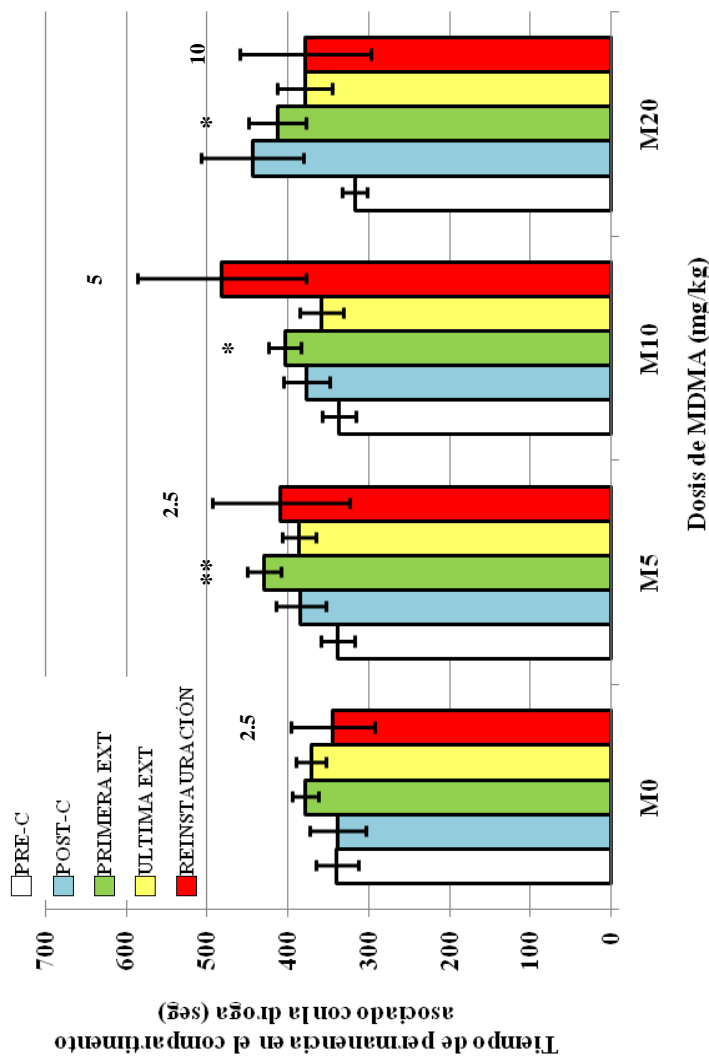


Figura 17. Adquisición, extinción y reinstauración del CPL inducido por la MDMA, utilizando un **protocolo de dos sesiones/día** (diario) durante la fase de condicionamiento en cuatro grupos de animales (n=10): M0, animales que reciben salino en ambos compartimentos; M5, M10 y M20, animales que reciben 5, 10 o 20 mg/kg de MDMA (respectivamente) en el compartimento asociado con la droga. Las barras representan la media (\pm error estándar) del tiempo de permanencia en el compartimento asociado con la droga antes de las sesiones de condicionamiento (barras blancas), después de las sesiones de condicionamiento (barras azules), en la primera sesión de extinción (barras amarillas), en la última sesión de extinción (barras rojas), y en la prueba de reinstauración (barras verdes). Sobre cada barra de reinstauración se muestra la dosis *priming* de MDMA (mg/kg) empleada. **p<0.01, *p<0.05, diferencias significativas en el tiempo de permanencia en la sesión Post-C vs la sesión Pre-C o pruebas de reinstauración.

12.4.2. Experimento 2. Efectos de la MDMA sobre la adquisición, la extinción y la reinstauración de la preferencia de lugar utilizando un protocolo de días alternos durante la adquisición del CPL.

Los resultados obtenidos en el Experimento 2 están representados en la Figura 18.

Fase de adquisición

La ANOVA reveló un efecto significativo de las variables “dosis MDMA” [$F(3,53) = 2.837$; $p < 0.0467$] y días [$F(1,53) = 44.581$; $p < 0.0001$] y la interacción “dosis MDMA x días” [$F(3,53) = 8.021$; $p < 0.0002$]. Los efectos simples de la interacción indicaron que el efecto de los “días” fue significativo en los grupos que recibieron MDMA ($p < 0.001$). Los efectos de la “dosis de MDMA” fueron significativos sólo en el Post-C ($p < 0.001$). Una ANOVA realizada por separado con los datos del Post-C [$F(3,53) = 8.378$; $p < 0.0001$] demostró que los animales tratados con MDMA permanecieron más tiempo en el compartimiento asociado con la droga en comparación con los animales que recibieron salino ($p < 0.01$).

Fase de extinción

Los animales tratados con salino no exhibieron CPL durante el Post-C, y tampoco durante la primera sesión de extinción. Por el contrario, aquellos animales que fueron tratados con 5 o 20 mg/kg de MDMA mostraron CPL durante 4 sesiones de extinción ($p < 0.05$), esta preferencia desapareció en la quinta sesión (falta de diferencias significativas con el Pre-C). Los animales tratados con 10 mg/kg de MDMA exhibieron CPL solo en la primera sesión de extinción ($p < 0.05$) pero no en la segunda.

Estudio 3

Fase de reinstauración

La dosis de 10 mg/kg de MDMA no produjo la reinstauración del CPL en los animales condicionados con suero fisiológico. Por otro lado, en los ratones condicionados con 5 mg/kg de MDMA, tras la confirmación de la extinción, la dosis de 2.5 mg/kg indujo reinstauración ($p < 0.05$) que duró 1 semana ($p < 0.05$). Después de la confirmación de una nueva extinción, una dosis de 1.25 mg/kg de MDMA no produjo reinstauración (aproximadamente 8 semanas después del Post-C). En los animales condicionados con 10 mg/kg de MDMA, después de la confirmación de la extinción, la dosis de 5 mg/kg de MDMA provocó la reinstauración del CPL ($p < 0.01$), el cuál duró una semana ($p < 0.05$). Después de la confirmación de una nueva extinción, una dosis de 2.5 mg/kg MDMA produjo nuevamente reinstauración ($p < 0.05$), aproximadamente ocho semanas después del Post-C. Después de la confirmación de una nueva extinción, la dosis de 1.25 mg/kg de MDMA no causó reinstauración. En los animales condicionados con 20 mg/kg de MDMA, después de la confirmación de la extinción, una dosis de 10 mg/kg no produjo la reinstauración del CPL, aproximadamente 5 semanas después del Post-C.

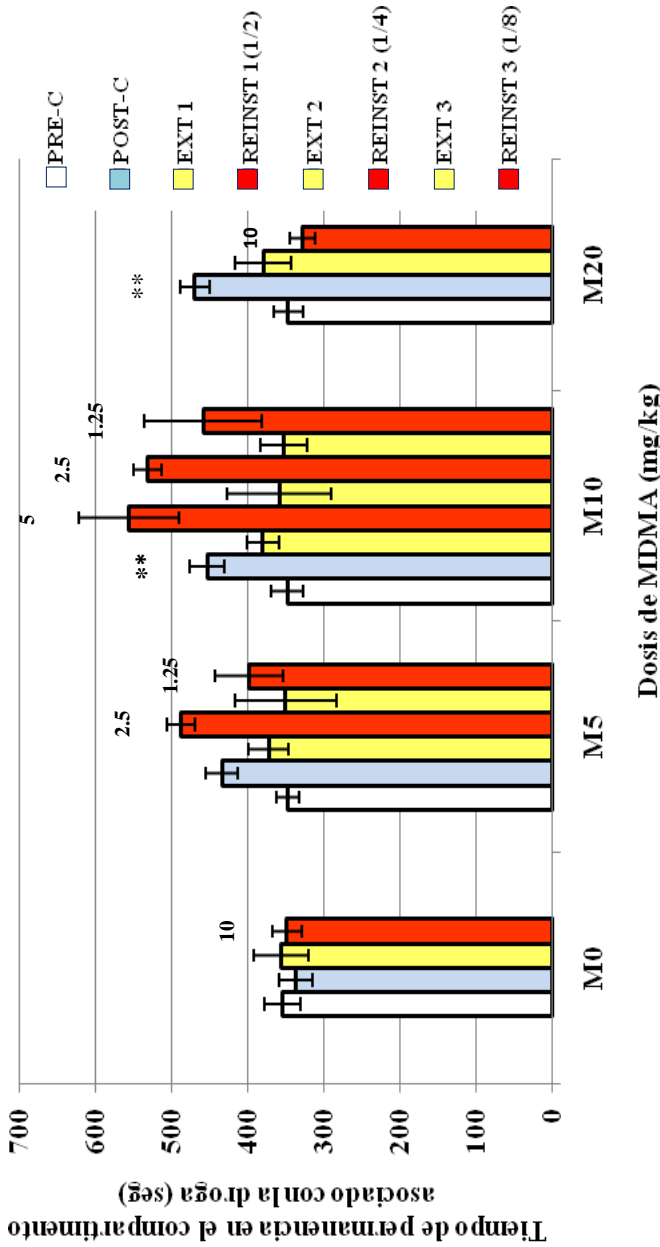


Figura 18. Adquisición, extinción y reinstauración del CPL inducido por la MDMA, utilizando un protocolo de días alternos durante la fase de condicionamiento en cuatro grupos de animales: M0, animales que reciben salino en ambos compartimentos (n=14), M5, M10 y M20, animales que reciben 5, 10 o 20 mg/kg de MDMA en el compartimento asociado con la droga (n=14, 13, y 14 respectivamente). Las barras representan la media (\pm error estándar) del tiempo de permanencia en el compartimento asociado con la droga antes de las sesiones de condicionamiento (barras blancas), después de las sesiones de condicionamiento (barras azules), en la última sesión de extinción (barras amarillas), y en la prueba de reinstauración (barras rojas) tras administrar una dosis *priming* de MDMA igual a la mitad de la dosis utilizada para inducir el CPL (1/2). En aquellos grupos que exhibieron reinstauración del CPL, después de confirmar la extinción, los efectos de una dosis *priming* correspondiente a un cuarto (1/4) y un octavo (1/8) de la dosis empleada para inducir el CPL. Sobre cada barra de reinstauración se muestra la dosis *priming* de MDMA (mg/kg) empleada. **p<0.01, *p<0.05, diferencias significativas en el tiempo de permanencia en la sesión Pre-C vs la sesión Post-C o pruebas de reinstauración.

Estudio 3

12.4.3. Análisis de monoaminas cerebrales

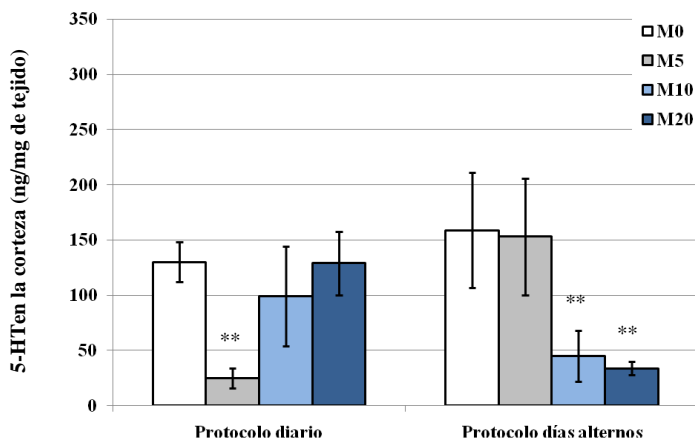
Los resultados obtenidos están representados en las Figuras 19 a 22.

Corteza

El ANOVA para la concentración de 5-HT (Figura 19 “a”) reveló diferencias significativas para la interacción [$F(3,69) = 4.606$; $p < 0.0054$], pero no así para el “protocolo” [$F(1,69) = 0.008$; $p < 0.9288$] o las “dosis de MDMA” [$F(3,69) = 1.982$; $p < 0.1247$]. Los ratones tratados con 5 mg/kg de MDMA con el protocolo diario mostraron un decremento del nivel de 5-HT en comparación con los grupos control ($p < 0.01$). Por otro lado, la administración de 10 o 20 mg/kg de MDMA en días alternos también produjo un decremento de la concentración de 5-HT en esta estructura cerebral ($p < 0.05$). En comparación con el protocolo de días alternos, se observó una menor concentración de este neurotransmisor en los animales que recibieron 5 mg/kg de MDMA con el protocolo de dos sesiones por día ($p < 0.006$), pero fueron más elevados tras la administración de 20 mg/kg del fármaco.

Los resultados para la concentración del 5-HIAA en la corteza se encuentran representados en la Figura 19 “b”. El análisis estadístico mostró diferencias significativas para el “protocolo” [$F(1,73) = 5.709$; $p < 0.0195$], las “dosis de MDMA” [$F(3,73) = 7.049$; $p < 0.0003$], y la interacción [$F(3,73) = 6.865$; $p < 0.0004$]. La concentración de este metabolito serotoninérgico fue más alta con el protocolo diario ($p < 0.05$). Sin importar el régimen de tratamiento empleado, la administración de 10 mg/kg de MDMA produjo un incremento de la concentración del 5-HIAA, en comparación con los otros grupos ($p < 0.05$). Ninguno de los grupos tratados con el protocolo de dos sesiones por día mostró un decremento en la concentración de este metabolito, incluso se observó un incremento de los niveles del mismo tras la administración de 10 mg/kg de MDMA ($p < 0.01$). En contraste, la inyección de 20 mg/kg de MDMA redujo el nivel del 5-HIAA en los animales tratados con el protocolo de días alternos ($p < 0.01$).

A



B

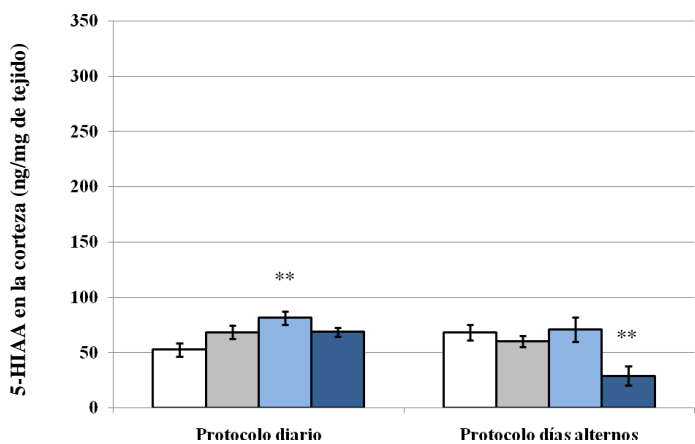


Figura 19. Efectos de la MDMA (5, 10 o 20 mg/kg) sobre las concentraciones de 5-HT (a) y 5HIAA (b) en la corteza después de la administración de un protocolo diario o de días alternos. ** $p < 0.01$, diferencias significativas con respecto al grupo salino.

Estudio 3

Hipocampo

La ANOVA para la concentración de 5-HT (Figura 20 “a”) mostró diferencias significativas para las “dosis de MDMA” [$F(3,64) = 7.292$; $p < 0.0003$], pero no así para el “protocolo” [$F(1,64) = 0.372$; $p < 0.5443$] o la interacción [$F(3,64) = 1.771$; $p < 0.1616$]. Irrelevantemente del protocolo empleado, los ratones tratados con salino o la dosis más baja de MDMA (5 mg/kg) presentaron una elevada concentración de 5-HT, en comparación con las dosis más altas de MDMA ($p < 0.01$ para el salino y $p < 0.05$ para M5).

Los resultados para los niveles del 5-HIAA (Figura 20 “b”) en el hipocampo mostraron diferencias significativas para las “dosis de MDMA” [$F(3,71) = 6.394$; $p < 0.007$] y para la interacción [$F(3,71) = 4.960$; $p < 0.0035$], pero no así para el “protocolo” [$F(1,71) = 0.035$; $p < 0.8520$]. En los dos protocolos, las dosis más altas de MDMA (10 y 20 mg/kg) disminuyeron la concentración de este metabolito en esta estructura cerebral, en comparación con los otros 2 grupos de tratamiento ($p < 0.01$ para el grupo M20 y $p < 0.05$ para el grupo M10). La dosis intermedia de MDMA (10 mg/kg) redujo el nivel del 5-HIAA con el protocolo de dos sesiones por día ($p < 0.01$).

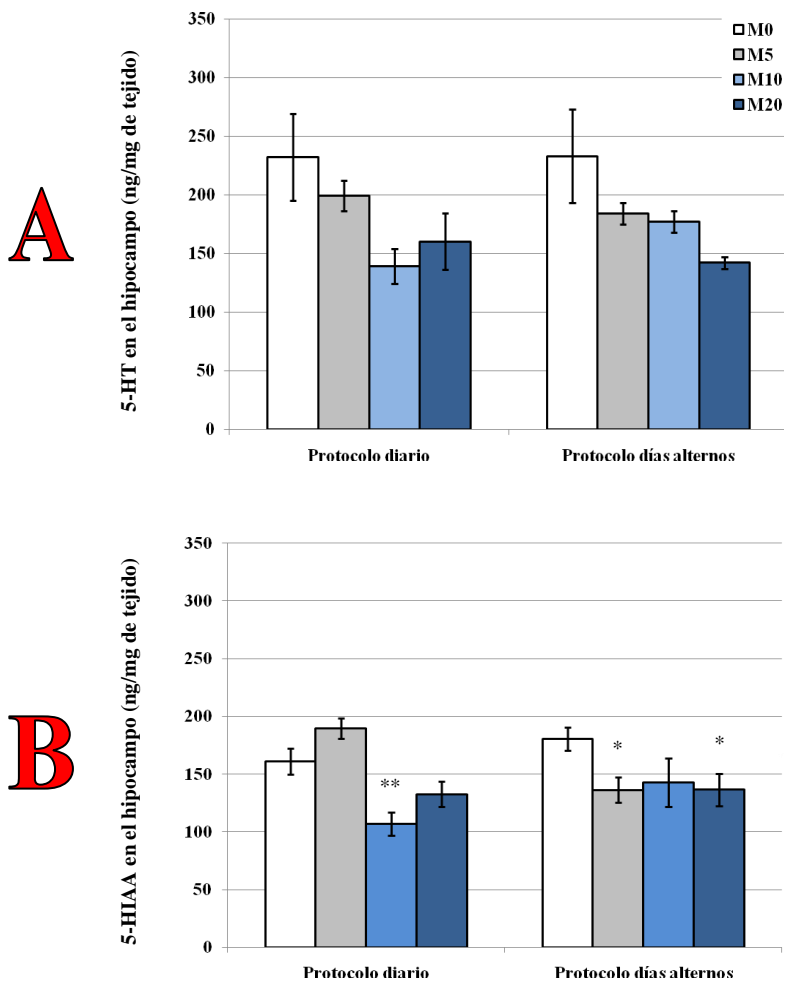


Figura 20. Efectos de la MDMA (5, 10 o 20 mg/kg) sobre las concentraciones de 5-HT (a) y 5HIAA (b) en el hipocampo después de la administración de un protocolo diario o de días alternos. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, diferencias significativas con respecto al grupo salino.

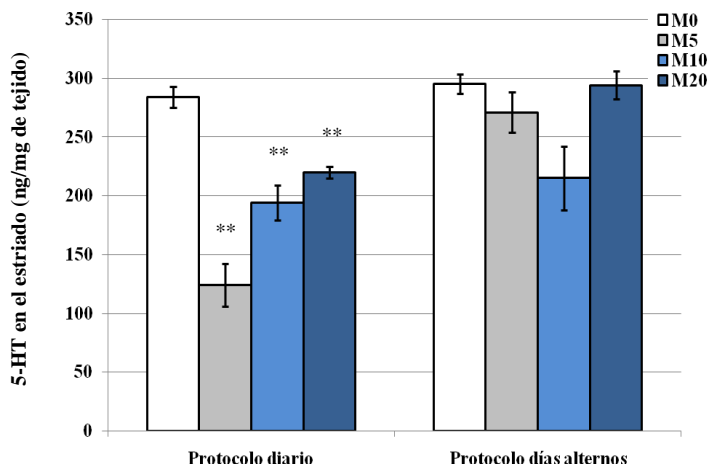
Estudio 3

Estriado

El ANOVA para la concentración de 5-HT en el estriado (Figura 21 “a”) reveló diferencias significativas para el “protocolo” [$F(1,73) = 18.738$; $p < 0.0001$], las “dosis de MDMA” [$F(3,73) = 17.575$; $p < 0.0001$], y la interacción [$F(3,73) = 10.512$; $p < 0.0001$]. Los animales tratados con el protocolo de días alternos mostraron elevados niveles de 5-HT en esta estructura cerebral ($p < 0.01$). Por otra parte, los ratones tratados con MDMA mostraron un decremento de este neurotransmisor ($p < 0.01$), aunque este efecto se observó especialmente en los grupos tratados con el protocolo diario ya que los animales que recibieron el fármaco en días alternos no mostraron diferencias significativas.

El análisis estadístico para la concentración del 5-HIAA (Figura 21 “b”) mostró diferencias significativas para el “protocolo” [$F(1,73) = 9.420$; $p < 0.0030$] y las “dosis de MDMA” [$F(3,73) = 17.052$; $p < 0.0001$], pero no así para la interacción [$F(3,73) = 0.724$; $p < 0.5409$]. Los animales que recibieron el fármaco en días alternos presentaron una mayor concentración de este metabolito serotoninérgico ($p < 0.01$). La dosis baja e intermedia de MDMA redujeron los niveles del 5-HIAA en comparación con el resto de los grupos ($p < 0.01$ para el grupo M5 y $p < 0.05$ para el grupo M10).

A



B

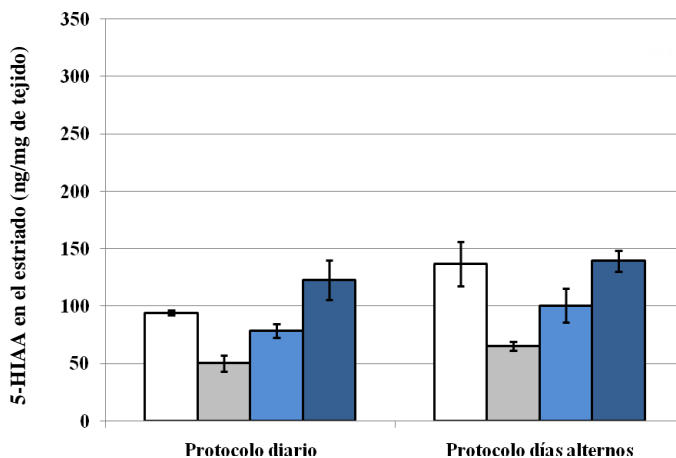


Figura 21. Efectos de la MDMA (5, 10 o 20 mg/kg) sobre las concentraciones de 5-HT (a) y 5HIAA (b) en estriado después de la administración de un protocolo diario o de días alternos. **p<0.01, diferencias significativas con respecto al grupo salino.

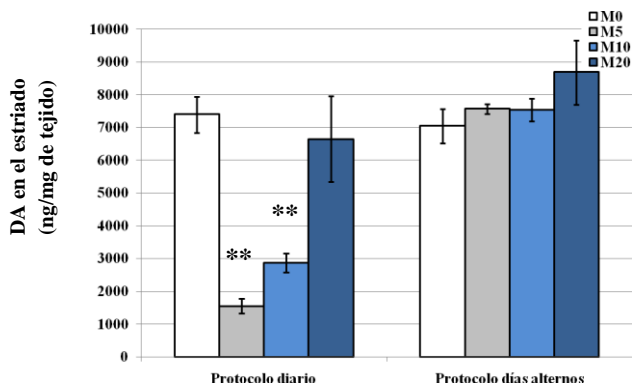
Estudio 3

El ANOVA para la concentración de DA en el estriado (Figura 22 “a”) reveló diferencias significativas para el “protocolo” [$F(1,73) = 47.805$; $p < 0.0001$], las “dosis de MDMA” [$F(3,73) = 11.436$; $p < 0.0001$], y la interacción [$F(3,73) = 9.992$; $p < 0.0001$]. Los animales tratados con el protocolo diario mostraron un menor nivel de DA ($p < 0.01$). La administración de 5 o 10 mg/kg de MDMA disminuyó la concentración de DA en comparación con los otros 2 grupos ($p < 0.01$). Este efecto se debió a los ratones tratados con el protocolo de dos sesiones por día, ya que no se observaron diferencias significativas en los grupos tratados con el protocolo de días alternos.

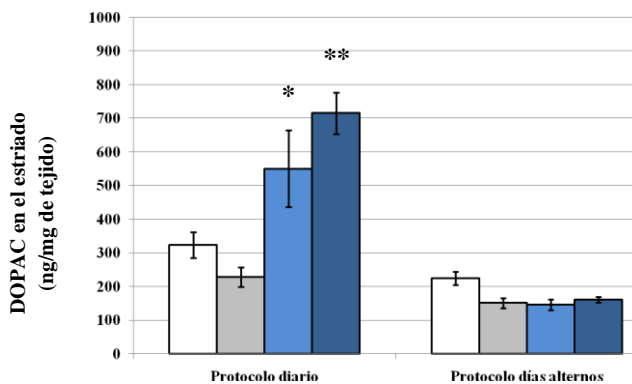
El análisis estadístico realizado a los niveles de DOPAC en el estriado (Figura 22 “b”) mostró diferencias significativas para el “protocolo” [$F(1,73) = 63.128$; $p < 0.0001$], las “dosis de MDMA” [$F(3,73) = 8.841$; $p < 0.0001$], y la interacción [$F(3,73) = 10.778$; $p < 0.0001$]. Los animales tratados con el protocolo diario mostraron una mayor concentración de este metabolito dopaminérgico ($p < 0.01$). La administración de 10 o 20 mg/kg de MDMA produjo un aumento de los niveles del DOPAC en comparación con los otros 2 grupos ($p < 0.01$). Este efecto se debió al protocolo de dos sesiones por día, ya que no se observaron diferencias significativas en los animales tratados con el protocolo de días alternos.

Por último, el ANOVA para la concentración del HVA en el estriado (Figura 22 “c”) reveló diferencias significativas para el “protocolo” [$F(1,73) = 25.379$; $p < 0.0001$], las “dosis de MDMA” [$F(3,73) = 24.863$; $p < 0.0001$], y la interacción [$F(3,73) = 8.801$; $p < 0.0001$]. Los animales tratados con el protocolo de dos sesiones por día mostraron un mayor nivel de este metabolito dopaminérgico ($p < 0.01$). La administración de 5 o 10 mg/kg de MDMA produjo un decremento de la concentración del HVA en comparación con los otros dos grupos ($p < 0.01$). Asimismo, la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg) produjo un decremento del nivel de este metabolito sólo con el protocolo de días alternos ($p < 0.01$).

A



B



C

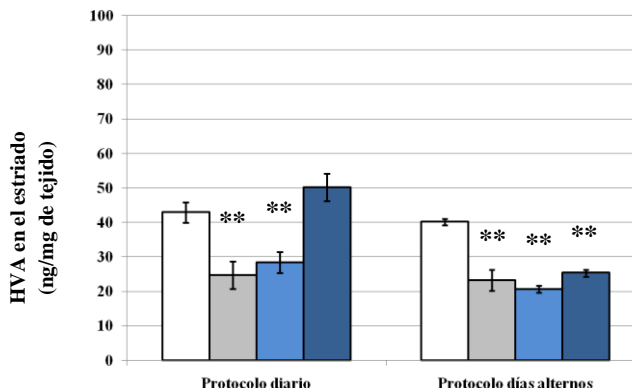


Figura 22. Efectos de la MDMA (5, 10 o 20 mg/kg) sobre las concentraciones de DA (a), DOPAC (b), y HVA (c) en estriado después de la administración de un protocolo diario o de días alternos. **p<0.01, *p<0.05, diferencias significativas con respecto al grupo salino.

12.5. Discusión

Este tercer estudio demuestra que la administración diaria o intermitente de MDMA promueve diferentes efectos conductuales y neuroquímicos. Hemos observado como el empleo de dos protocolos distintos en el condicionamiento con MDMA durante la fase de adquisición induce diferentes efectos sobre el CPL (evaluado mediante la adquisición, la extinción y la reinstauración de la preferencia de lugar en ratones). Igualmente, en este estudio hemos demostrado que una dosis *priming* es capaz de reinstaurar el CPL inducido por esta sustancia. Por lo tanto, nuestros resultados confirman la MDMA posee efectos reforzantes y demuestran que esta sustancia induce efectos a largo plazo que podrían influir en la vulnerabilidad de los animales a la recaída tras un periodo de abstinencia.

Reinstauración del CPL inducido por la MDMA

Los resultados más importantes y originales encontrados en este estudio son los efectos a largo plazo de la MDMA sobre los procesos de la recompensa, así como también los efectos reinstauradores de la exposición a la MDMA tras un periodo de extinción, resultados que no habían sido evaluados previamente. En el CPL, la re-exposición a la MDMA, tras la extinción de la preferencia de lugar, reinstaura los efectos reforzantes condicionados inducidos por esta droga. Además, estos efectos se observaron tras la administración de la mitad de la dosis empleada durante la fase de condicionamiento (adquisición), es decir, tras la administración de una dosis *priming* de 2.5 y 5 mg/kg de MDMA en los ratones que fueron condicionados con 5 y 10 mg/kg (respectivamente) de esta sustancia. En los animales que recibieron 10 mg/kg de MDMA durante la fase de condicionamiento, se reinstauró la preferencia de lugar mediante la administración de una dosis *priming* de 5 mg/kg de MDMA, y después de una nueva fase de extinción, estos animales mostraron nuevamente reinstauración del CPL tras la inyección de la cuarta parte de la dosis empleada en la fase de condicionamiento (*priming* de 2.5 mg/kg). En contraste, los animales que recibieron la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg) durante la fase de condicionamiento, no mostraron reinstauración del CPL después de la administración de la

dosis *priming* de 10 mg/kg. A pesar de que las diferentes dosis empleadas produjeron el mismo grado de preferencia en todos los grupos, la sensibilidad a la reinstauración inducida por la re-exposición a la MDMA podría cambiar, siendo mayor en los ratones condicionados con 10 mg/kg. Una posible explicación ante la falta de efectos de la dosis alta sobre la reinstauración podría deberse al desarrollo de un proceso de sensibilización, el cual, pudo producirse como consecuencia del tratamiento previo con la MDMA. Durante la fase de condicionamiento, los animales fueron expuestos a esta droga y, después de un periodo extinción de varias semanas, los efectos de la MDMA fueron evaluados nuevamente en la prueba de reinstauración. Si la exposición previa a esta sustancia indujo un incremento en los efectos de la misma (sensibilización), entonces la curva dosis-efecto se desplazaría hacia la izquierda y así, las dosis de 2.5 y 5 mg/kg producirían un efecto reforzante mayor que la dosis de 10 mg/kg, lo cual, podría producir efectos no reforzantes, o incluso aversivos en los animales pre-expuestos a la MDMA, interfiriendo de esta manera con los procesos de la reinstauración. En ratones, la MDMA exhibe una curva dosis-efecto en forma de U invertida en el paradigma de la AA, encontrándose una mayor motivación por las dosis bajas de MDMA, en comparación con las dosis altas. Aunque no se observaron cambios en el patrón o en la tasa de respuesta durante 15 días de AA de MDMA, sugiriendo una falta de tolerancia o sensibilización a las propiedades reforzantes de la droga, es posible que la sensibilización sólo se produzca tras un periodo de abstinencia a la droga (extinción) (Trigo y cols., 2006). De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado que los efectos motores de la MDMA en las ratas muestran un incremento dependiente de la dosis, el cual, se mantiene constante durante 6 días consecutivos de tratamiento (administración diaria de la droga). No obstante, tras un periodo de abstinencia de hasta 25 días, se observa un aumento de la actividad motora, lo cual, sugiere la expresión de sensibilización conductual (Modi y cols., 2006). Igualmente, nosotros hemos observado que la administración de una dosis baja de MDMA, 2 o 5 semanas después de la última inyección de la droga durante el condicionamiento, es capaz de reinstaurar el CPL. De hecho, la preferencia de lugar obtenida durante la fase de reinstauración puede ser incluso mayor que la preferencia observada durante la prueba Post-C.

Estudio 3

Los efectos reinstauradores de la MDMA podrían ser afectados probablemente por el tiempo que transcurre entre el condicionamiento (llevado a cabo durante la adolescencia) y la prueba de reinstauración, la cual se realizó entre los 56 y los 77 días de edad en los animales condicionados con el protocolo alterno, mientras que en los ratones condicionados con el protocolo diario, esta prueba se llevó a cabo cuando estos animales tenían entre 59 y 199 días de edad, sin embargo, nuestros resultados no concuerdan con esta hipótesis. Aunque los animales condicionados con 5 mg/kg de MDMA (en ambos protocolos) realizaron la prueba de reinstauración casi al mismo tiempo (59 o 77 días de edad, protocolo diario o de días alternos, respectivamente), la dosis *priming* de MDMA (2.5 mg/kg) sólo reinstauró el CPL en los ratones que fueron condicionados con el protocolo de días alternos. Por el contrario, la dosis de 10 mg/kg de MDMA no reinstauró el CPL en ninguno de los grupos condicionados con 20 mg/kg, sin importar el tiempo al cual se llevó a cabo la prueba de reinstauración (DP 199 vs DP 77). Finalmente, aunque la prueba de reinstauración se realizó a diferentes edades (DP 164 vs DP 56), en los dos grupos condicionados con 10 mg/kg de MDMA, la dosis *priming* de 5 mg/kg indujo un incremento en el tiempo de permanencia en el compartimiento asociado con la droga (incluso mayor que el obtenido en la prueba Post-C), aunque este efecto sólo fue significativo en los animales que fueron condicionados con el protocolo de días alternos. Es posible que la ausencia de efectos significativos en el grupo condicionado con el protocolo diario se debiera a la gran variabilidad entre los animales en respuesta a la dosis *priming* de MDMA (observar el gran error estándar en la Figura 17), ya que algunos animales permanecieron durante más tiempo en el compartimiento asociado con la droga, mientras que otros no. Por lo tanto, el intervalo temporal entre el condicionamiento y la prueba de reinstauración, al parecer, no es la causa de los cambios en la susceptibilidad a la reinstauración observados en los animales condicionados con el protocolo diario o con el protocolo de días alternos. Por tal motivo, es más plausible una explicación dirigida al tipo de condicionamiento adquirido por los animales en ambos protocolos. En comparación con el protocolo diario, la administración intermitente de la MDMA podría inducir sensibilización con mayor facilidad, modificando las vías cerebrales de la recompensa, en consecuencia, los animales

serían más sensibles a la reinstauración de la preferencia de lugar tras una re-exposición a la droga recibida durante la fase de condicionamiento.

Efectos de la administración diaria o en días alternos de MDMA en la adquisición y la extinción del CPL

Los efectos reforzantes de la MDMA sobre el CPL podrían variar en función de diversos factores, como el alojamiento de los animales o el procedimiento empleado para el condicionamiento. Por tal motivo, hemos empleado dos protocolos diferentes para la adquisición del condicionamiento de lugar. En esta línea, el condicionamiento durante cuatro días consecutivos no induce diferencias significativas en el tiempo que los ratones permanecen en el compartimiento asociado con la droga durante la sesión de Post-C, con respecto a la preferencia de lugar que estos animales mostraron en la prueba Pre-C. No obstante, la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg) mostró una tendencia a producir CPL. La falta de efectos en este grupo quizás se debió a la alta variabilidad en la respuesta de los animales, donde algunos mostraron un gran cambio en el tiempo que pasaron en el compartimiento asociado con la droga (>540 s), pero otros mostraron incluso un decremento (<223 s). Cuando los ratones fueron evaluados una semana después de confirmar la ausencia del CPL, sorprendentemente, observamos que los animales condicionados con la MDMA mostraron una preferencia de lugar considerable (ver Figura 17, barra de la primera sesión de extinción). Al igual que con otras drogas de abuso (Maldonado y cols., 2006; Ribeiro Do Couto y cols., 2005a), la duración del CPL inducido por la MDMA es dependiente de la dosis: los animales muestran preferencia de lugar 3, 13 y 22 semanas después de ser condicionados con una dosis baja, intermedia, y alta, respectivamente. Estos resultados indican que los animales han adquirido un CPL de larga duración, aunque este no se haya expresado 24 horas después de la última sesión de condicionamiento. Una posible explicación podría enfocarse al hecho de que la MDMA, podría producir un decremento temporal de uno o varios neurotransmisores implicados en la expresión del CPL, como la 5-HT o la DA. Por otro lado, el fenómeno de “incubación” de la respuesta a las señales de recompensa (Grimm y cols., 2001; Lu y cols., 2004)

Estudio 3

también podría contribuir al aumento de la preferencia de lugar con paso del tiempo tras finalizar el entrenamiento, siendo más evidente 1 o varias semanas después de la última sesión de condicionamiento (sesiones de extinción), más que solo 1 día después (Post-C).

Los efectos de la MDMA sobre el CPL siempre han sido evaluados mediante un protocolo de días alternos. De acuerdo con estudios previos realizados con ratones adultos (Robledo y cols., 2004a; 2004b; Salzman y cols., 2003), con este modelo hemos observado que todas las dosis de MDMA produjeron un notable CPL el día del Post-C, aunque la duración de la preferencia de lugar no dependió de las dosis empleadas. Los animales tratados con las dosis baja y alta de MDMA (5 y 20 mg/kg) mostraron CPL durante 4 semanas, mientras que los ratones que fueron condicionados con la dosis intermedia (10 mg/kg) sólo mostraron preferencia de lugar la primera semana posterior al condicionamiento. Por lo tanto, además de las diferencias en la adquisición, la duración del CPL difiere claramente dependiendo del protocolo empleado. Con el condicionamiento de 2 sesiones por día, las pruebas de extinción se extendieron desde el DP 41 hasta el DP 195, la preferencia de lugar perdura durante mucho tiempo, mientras que con el protocolo de días alternos, las sesiones de extinción se extendieron desde DP 45 hasta el DP 73, la preferencia de lugar se mantuvo durante pocas semanas. No está claro si los diferentes protocolos empleados para inducir el condicionamiento, siendo el diario más intenso (cuatro sesiones de condicionamiento en 4 días) que el de días alternos (cuatro sesiones de condicionamiento en 8 días), podrían explicar estas diferencias.

Efectos de la administración diaria o en días alternos de MDMA en las monoaminas cerebrales

En este estudio, evaluamos los niveles de 5-HT y DA, así como también de sus metabolitos en diversas estructuras cerebrales como la corteza, el hipocampo y el estriado de ratones tratados con MDMA durante 4 días consecutivos o en días alternos. Estas determinaciones se realizaron con el único objetivo de encontrar alguna correlación neuroquímica con los efectos observados en la adquisición del CPL. La administración diaria de MDMA reduce

la concentración de 5-HT en la corteza con la dosis baja, mientras que en el estriado se observa este efecto con todas las dosis empleadas (decremento del nivel de 5-HT del 56, 32 y 23% para la dosis baja, intermedia y alta, respectivamente). Asimismo, se observó un decremento de la concentración de DA tras la administración de las dosis baja e intermedia de MDMA (disminución del nivel de DA del 74 y 52%, respectivamente). La ausencia de efectos dependientes de la dosis sobre los niveles de 5-HT y DA podría deberse al hecho de que los animales tratados con la dosis más alta se encontraban aún bajo el efecto estimulante de la droga (debido a que los niveles de los neurotransmisores son evaluados sólo 24 hrs después de la última inyección). Es importante destacar que el patrón de las concentraciones de 5-HT y DA en el estriado y la corteza (sólo 5-HT) son similares: pérdidas elevadas con la dosis baja. Es posible que con la administración repetida diaria de la dosis alta de la MDMA se acumulen los efectos estimulantes de esta droga sobre la liberación de DA. Con la microdiálisis *in vivo* se ha confirmado que la concentración extracelular de DA en el estriado del ratón aumenta tras la administración de MDMA (Camarero y cols., 2002; Colado y cols., 2001; Reveron y cols., 2005), además, este efecto se potencia y se mantiene con la inyección de subsecuentes dosis (Camarero y cols., 2002; Colado y cols., 2001). La administración de MDMA mediante el protocolo de días alternos produce un decremento dosis dependiente de la concentración de 5-HT en la corteza, mientras que los niveles de 5-HT y la DA en el estriado no son afectados. En el hipocampo, independientemente del protocolo empleado, la concentración de 5-HT disminuye de forma dependiente de la dosis.

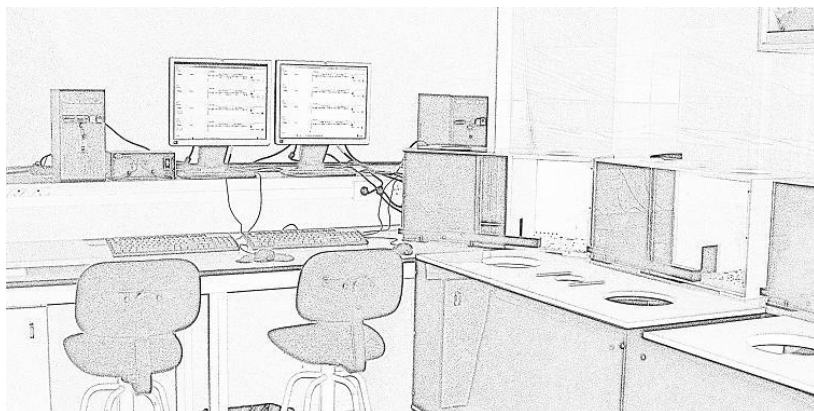
Tal como hemos comentado previamente, la aparente ausencia de CPL en los animales condicionados con el protocolo de 2 sesiones/día pudo deberse al decremento en los niveles de algún neurotransmisor como resultado de la administración diaria de la MDMA. El análisis bioquímico reveló un decremento de los niveles de DA y de 5-HT en el estriado, lo cual, podría estar relacionado con la ausencia del CPL. De hecho, los animales que recibieron la dosis alta de MDMA mostraron un ligero decremento de la concentración de DA, y un aumento considerable en el tiempo de permanencia en el compartimiento asociado con la droga, pero no así los animales que recibieron las dosis baja e intermedia,

Estudio 3

los cuales, mostraron una clara disminución de los niveles de DA. Cuando la MDMA es administrada a intervalos de 48 hrs, los efectos tóxicos de esta droga sobre la neurotransmisión monoaminérgica se previenen, de forma tal que los niveles de los neurotransmisores permanecen en valores normales que se correlacionan con una clara expresión de la preferencia de lugar en los animales condicionados con el protocolo de días alternos.

El paradigma del CPL, un modelo para el estudio de las drogas en un contexto de refuerzo condicionado, es de suma importancia en la investigación de la adicción debido a que un estímulo contextual (actuando como reforzadores secundarios) es capaz de inducir un deseo compulsivo (“*craving*”), lo cual a su vez podría conducir a la recaída (Childress y cols., 1999). Se considera que las drogas con propiedades reforzantes son capaces de producir dependencia y adicción. En nuestro estudio, hemos demostrado que la MDMA es capaz de producir CPL, lo cual, podría predecir estas propiedades. Además, los efectos a largo plazo de la MDMA sobre la susceptibilidad de los animales ante la reinstauración del CPL, inducido por la re-exposición a esta droga tras un periodo de extinción, apoya la idea de que la exposición a la MDMA podría modificar los substratos neuronales de la recompensa, haciendo al cerebro de los animales sea más vulnerable a la adicción.

Estudio 4. Efectos reforzantes y reinstauración del CPL inducido por la MDMA o cocaína en ratones adolescentes con experiencia previa en ambas drogas



13. Estudio 4. Efectos reforzantes y reinstauración del CPL inducido por la MDMA o cocaína en ratones adolescentes con experiencia previa en ambas drogas

Este estudio ha sido enviado a “Addiction Biology”.

13.1. Introducción

El uso combinado de diversas sustancias psicoactivas (policonsumo) es una práctica común en la cultura *rave*, donde el alcohol, el cannabis, la cocaína y las anfetaminas, se consumen habitualmente junto al “éxtasis” (Cole y Sumnall, 2003a; Winstock y cols., 2001). En general, el policonsumo es una práctica recurrente entre los usuarios de la MDMA, quienes en comparación con sujetos que no emplean esta droga, utilizan con mayor frecuencia otras sustancias como el cannabis o la cocaína (Scholey y cols., 2004; Maxwell, 2005; NSDUH, 2004; ESTUDES, 2007). Especialmente en España, entre los estudiantes de enseñanzas secundarias (14 a 18 años de edad) que han consumido el éxtasis en el último año, se ha descrito que el 75.5% ha consumido también cocaína, mientras que entre los consumidores anuales de cocaína, el 44.3% también ha consumido éxtasis (ESTUDES, 2007).

Existen muchos factores que contribuyen el desarrollo de la adicción a las drogas. Además de las características individuales, el ambiente o la droga en sí misma, los estudios epidemiológicos sugieren que existe una correlación inversa entre la edad de la primera exposición a las drogas de abuso y la probabilidad de desarrollar dependencia. Específicamente, un contacto antes de los 15 años es un potente predictor de vulnerabilidad a la dependencia (Robins y Przybeck 1985; Meyer y Neale, 1992). Lo que todavía no está totalmente aclarado es si el consumir drogas a una edad temprana induce el desarrollo de la dependencia (hipótesis del cerebro vulnerable), o si es que aquellos que experimentan con sustancias adictivas a una edad temprana ya están predispuestos a la dependencia por razones genéticas o ambientales (hipótesis de la predisposición común) (Compton y cols., 2000; De Wit y cols., 2000a, 2000b; McGue y cols., 2001a, 2001b; Zinkernagel y cols., 2001). El hecho de que la progresión de la mera experimentación a la adicción sea más

Estudio 4

rápida en los adolescentes que en los adultos, apoya la hipótesis de la vulnerabilidad (Clark y cols., 1998). Sin embargo, la elevada frecuencia de comorbilidad con otros problemas psiquiátricos apoya la hipótesis de la predisposición común. Los trabajos con modelos animales también apoyan ambas teorías. Por ejemplo diferentes cepas de ratones varían en su sensibilidad a las drogas de abuso (Dockstader y van der Kooy, 2001). No obstante, también parece claro que muchos procesos neurales importantes en la respuesta a las drogas de abuso se regulan en el desarrollo. En el cerebro adolescente se produce una superproducción y posterior poda de las sinapsis que afecta a las neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas entre otras. Además, se ha observado un constante incremento en la densidad del receptor DA con un pico en roedores alrededor de día postnatal 20 al 30 (Murrin y Zeng, 1986; 1990). Adicionalmente también se ha demostrado que el DAT presenta una mayor expresión durante la adolescencia en los seres humanos (Meng y cols., 1999).

La exposición crónica a las drogas de abuso produce cambios permanentes en los circuitos neurales que subyacen al proceso adictivo. Una consecuencia de este tipo de plasticidad dependiente de la experiencia, es el progresivo incremento en la respuesta a las drogas ante la re-exposición a las mismas. La investigación pre-clínica ha demostrado que la exposición repetida a dosis elevadas de MDMA altera las propiedades reforzantes de otras drogas como la cocaína y el alcohol. Esta exposición farmacológica podría producir cambios a conductuales a largo plazo, los cuales, algunos autores los describen como una consecuencia de procesos neurotóxicos y/o de sensibilización (Morgan y cols., 1997; Kalivas y cols., 1998; Horan y cols., 2000; Ratzenboeck y cols., 2001; Cole y cols., 2003). De hecho, se ha observado que el tratamiento previo con la MDMA favorece el aumento de la concentración extracelular de DA en el NAcc producido por la cocaína (Morgan y cols., 1997), así como también la estimulación motora producida por esta droga en las ratas (Kalivas y cols., 1998).

Algunos autores han demostrado que la administración previa de elevadas dosis de MDMA (2x20 mg/kg/día, durante 4 días), facilita la adquisición de la AA de cocaína en ratas

adultas (Fletcher y cols., 2001). Este régimen de MDMA es capaz de inducir la liberación de DA, e incluso ser neurotóxico para las neuronas serotoninérgicas, por lo que se ha sugerido que alguno o quizás ambos mecanismos podrían contribuir a la capacidad de la MDMA para facilitar la AA de cocaína (Fletcher y cols., 2001). Igualmente, la administración de MDMA en ratas adolescentes también favorece los efectos reforzantes de la cocaína cuando los animales alcanzan la edad adulta, aún en ausencia de neurotoxicidad serotoninérgica o dopaminérgica (Fone y cols., 2002). Cabe destacar que algunos investigadores han descrito que la MDMA no modifica a largo plazo el CPL inducido por la cocaína en ratas adultas (Cole y cols., 2003), sin embargo, la etapa del desarrollo en la cual se administra la droga podría jugar un papel fundamental en los efectos producidos a largo plazo. De acuerdo con lo anterior, Åberg y cols., (2007) han indicado que la experiencia previa a la MDMA favorece los efectos reforzantes de la cocaína en las ratas adolescentes, mientras que en los animales adultos dichos efectos se atenúan. Por lo tanto, se estima que la exposición a la MDMA durante la adolescencia, podría incrementar la vulnerabilidad a los efectos estimulantes de las drogas de abuso, como por ejemplo la cocaína (Horan y cols., 2000; Åberg y cols., 2007).

La adicción debe ser considerada como un desorden crónico recurrente caracterizado por la recaída (Koob y Le Moal, 2005). La elevada tasa de recaída al consumo de una droga, tras un periodo de desintoxicación o abstinencia, es un problema clínico importante y constituye el principal objetivo en el tratamiento del abuso de sustancias psicoactivas. El *craving* y la recaída son dos fenómenos que se observan habitualmente en los adictos abstinentes, quienes son vulnerables a los estímulos ambientales asociados con el consumo de una droga, a la droga misma o al estrés, incluso tras largos periodos de abstinencia (O'Brien, 1997; el-Guebaly y Hodgins, 1998). La tendencia a la recaída en la adicción sugiere que las drogas producen cambios permanentes en el cerebro (Nestler, 2004b), y en los animales de laboratorio es posible evaluar la recaída cuando, tras la adquisición y la subsecuente extinción de una respuesta conductual particular, el animal reinicia esta respuesta, la cual, es referida como una reinstauración (Carroll y Comer, 1996). En los estudios que evalúan la reinstauración, la recuperación de una respuesta aprendida (que representaría el volver a

Estudio 4

buscar la droga), ocurre cuando ratas o ratones son expuestos a las drogas, a las señales ambientales asociadas con la misma, o a factores estresantes tras un periodo de extinción (Shaham y cols., 2003; Aguilar y cols., 2008). Así, se ha observado que la inyección de dosis *priming* de una droga, que posee estímulos discriminativos en la AA (Morley y cols., 2004; Schenk y cols., 2008) o en el CPL (Ribeiro Do Couto y cols., 2005a; 2005b; 2005c; 2006; Daza-Losada y cols., 2007; 2008a; Maldonado y cols., 2006; 2007), es capaz de promover la búsqueda de drogas, lo que sugiere que dicha exposición podría precipitar una recaída. Schenk y cols., (2008) han demostrado que la administración de una dosis *priming* de cocaína y de MDMA, es capaz de reinstaurar la búsqueda de drogas en ratas entrenadas a auto-administrarse ambas drogas. Además, en el tercer estudio de la presente tesis doctoral hemos observado que la MDMA produce, tras un periodo de extinción, reinstauración de la preferencia de lugar en ratones, lo que sugiere que esta droga tiene la capacidad de inducir adicción (Achat-Mendes y cols., 2003; Daza-Losada y cols., 2007).

Tal y como hemos mencionado anteriormente, la MDMA y la cocaína son sustancias que se consumen habitualmente de forma simultánea, sin embargo, se han realizado pocos estudios enfocados a determinar los efectos que se producen, a corto o a largo plazo, tras la administración combinada de ambas drogas. Recientemente, Diller y cols., (2007) han observado que los efectos conductuales y neuroquímicos de la MDMA y la cocaína observados de forma individual en el CPL, se alteran dramáticamente cuando ambas drogas son administradas al mismo tiempo. La literatura sugiere que los efectos farmacológicos y conductuales de producidos de forma individual por la MDMA y la cocaína, son resultado del bloqueo de los transportadores monoaminérgicos, especialmente del SERT y del DAT (Cole y cols., 2003; Cole y Sumnall 2003a; 2003b; Green y cols., 2003; Gudelsky y Yamamoto, 2008). Por lo tanto, es posible que a nivel neuroquímico ambas drogas muestren una competencia por la ocupación de dichos transportadores, lo que en consecuencia, produciría una alteración en el impacto neuroquímico y conductual de los animales en respuesta a la MDMA y la cocaína. Por lo tanto, en este último trabajo hemos querido evaluar la relación existente entre una exposición temprana a drogas y la respuesta de los animales, en la edad adulta, a los efectos reforzantes de la cocaína y la MDMA. La

literatura existente hasta el momento se ha centrado en estudiar los efectos de una exposición a la MDMA o de otros psicoestimulantes en los efectos reforzantes de la cocaína, y hasta la fecha, no se han realizado estudios que evalúen este tratamiento sobre los efectos reforzantes de la MDMA. Tampoco se han llevado a cabo estudios en los cuales se realice una exposición combinada, ejemplo de policonsumo, a la MDMA más la cocaína. Por último, de todos los estudios realizados, muy pocos han evaluado la vulnerabilidad a la recaída en el consumo de estos animales expuestos tempranamente a drogas. Por todo ello creemos que es necesario ampliar los estudios existentes, en primer lugar, estudiando el impacto sobre las propiedades reforzantes de la MDMA, en segundo lugar evaluando el efecto del consumo temprano de cocaína más MDMA, y por último estudiando si se incrementa la vulnerabilidad a la reinstauración de la búsqueda de la droga en estos animales.

Estudio 4

13.2. Material y métodos

13.2.1. Sujetos

En la realización de este estudio se utilizaron un total de 224 ratones albinos macho de la cepa OF1 adquiridos a los laboratorios Charles River (Barcelona, España). Los animales tenían 21 días de edad (10-13 gr) a su llegada a nuestro laboratorio y fueron alojados en grupos de 4 en cajas de plástico opacas (25 cm x 25 cm x 14.5 cm) siete días antes del comienzo de los experimentos. Las condiciones ambientales del laboratorio se controlaron permanentemente y fueron las siguientes: temperatura constante (21 ± 2 °C), ciclo de luz 12/12 h (fase con luz apagada de 7:30 a 19:30 h). Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* al agua y al alimento, excepto durante las pruebas conductuales. La limpieza de las jaulas se realizó una vez por semana.

Los animales fueron manipulados (acariciados suavemente) durante algunos segundos dos días antes de la fase de pre-condicionamiento, con intención de reducir los niveles de estrés en respuesta a los procesos experimentales. Los procedimientos de tratamiento y cuidado de los animales se realizaron de acuerdo con las directrices marcadas por la comunidad internacional recogidas en: European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 de noviembre de 1986).

13.2.2. Tratamiento farmacológico

Los animales fueron inyectados ip con diferentes dosis de hidrocloreuro de MDMA (Laboratorios SIGMA-ALDRICH, España), e hidrocloreuro de cocaína (Laboratorios Alcaliber, Madrid). Las dosis fueron administradas de forma proporcional al peso del animal en un volumen de 0.01 ml/g y disueltas en suero fisiológico (NaCl 0.9%). Los ratones de los grupos control fueron inyectados con suero fisiológico.

A los 28 días de edad (DP 28), tras un periodo de adaptación al laboratorio (7 días), los animales adolescentes recibieron un tratamiento farmacológico consistente en dos inyecciones diarias (8 am y 8 pm) de MDMA (10 mg/kg) sola, o en combinación con cocaína (25 mg/kg), durante 3 días consecutivos (6 administraciones) desde los 28 (DP 28) hasta los 30 días de edad (DP 30). Así, los grupos de pre-tratamiento fueron clasificados en ratones tratados previamente: con suero fisiológico (**SF**); con 10 mg/kg de MDMA (**M**); con 25 mg/kg de cocaína (**C**); o con 10 mg/kg de MDMA y 25 mg/kg de cocaína (**M+C**). Posteriormente, estos animales fueron empleados para el CPL inducido por 1.5 o 25 mg/kg de cocaína, o por 1.25 o 10 mg/kg de MDMA.

13.2.3. Aparatos y procedimiento

13.2.3.1. Condicionamiento de la preferencia de lugar

Tres semanas después de haber finalizado el tratamiento, los animales fueron evaluados en el CPL inducido por la MDMA o la cocaína.

Para las pruebas del CPL inducido por la MDMA empleamos 1.25 y 10 mg/kg de esta droga. De acuerdo al pre-tratamiento y al condicionamiento empleado, los animales fueron clasificados en:

Pre-tratamiento	Condicionamiento	Grupo
SF	MDMA 1.25 mg/kg	SF-M1.25
M		M-M1.25
C		C-M1.25
M+C		MC+M1.25
SF	MDMA 10 mg/kg	SF-M10
M		M-M10
C		C-M10
M+C		MC-M10

Estudio 4

Los aparatos y el procedimiento utilizados para la prueba del condicionamiento de lugar fueron similares a los descritos en el segundo experimento del estudio 3. Las sesiones de extinción se realizaron diariamente, como resultados de experimentos realizados a posteriori del tercer estudio que nos habían mostrado esta pauta de extinción no afecta a la sensibilidad para la reinstauración, acortando sin embargo la longitud de los experimentos. Las pruebas de reinstauración se llevaron a cabo 24 hrs después de la confirmación de la extinción de la preferencia de lugar.

Para las pruebas del CPL inducido por la cocaína empleamos 1.5 y 25 mg/kg de esta droga. De acuerdo al pre-tratamiento y al condicionamiento empleado, los animales fueron clasificados en:

Pre-tratamiento	Condicionamiento	Grupo
SF	Cocaína 1.5 mg/kg	SF-C1.5
M		M-C1.5
C		C-C1.5
M+C		MC+C1.5
SF	Cocaína 25 mg/kg	SF-C25
M		M- C25
C		C- C25
M+C		MC- C25

El procedimiento empleado en el CPL inducido por cocaína, difiere del utilizado con la MDMA en los siguientes aspectos de la fase de condicionamiento. En esta fase, los animales fueron tratados con cocaína, o suero fisiológico, mediante 4 asociaciones con el compartimiento respectivo. Los animales recibieron 2 asociaciones (cocaína y vehículo) cada día: los animales del grupo cocaína recibieron una inyección de suero fisiológico antes de ser confinados al compartimiento asociado con el vehículo durante 30 minutos, y después de un intervalo de 4 horas, recibieron la cocaína antes de ser confinados al compartimiento asociado con la droga durante 30 min. Por otro lado, los animales control recibieron una inyección de suero fisiológico antes de ser confinados durante 30 minutos al primer compartimiento, y después de un intervalo de 4 horas, los animales recibieron una

nueva inyección de suero fisiológico y fueron confinados durante 30 minutos al segundo compartimiento (días 4 al 7, 54-57 días de edad). El resto del procedimiento fue similar al descrito para la MDMA, a diferencia que las sesiones de extinción fueron semanales.

13.3. Análisis estadístico

Con el fin de evaluar la adquisición del CPL inducido por la cocaína o la MDMA, los datos del tiempo de permanencia en el compartimiento asociado con la droga fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) mixto para cada una de estas drogas, con dos variables *entre*, “pre-tratamiento recibido” con cuatro niveles (suero fisiológico, MDMA, cocaína y cocaína + MDMA) y “dosis” con dos niveles (1.5 y 25 g/kg para la cocaína y 1.25 y 10 mg/kg para el MDMA), y una variable *intra*, “días” con dos niveles (Pre-C y Post-C). Las comparaciones posteriores se realizaron con la prueba de Newman-Keuls.

Adicionalmente se realizó un ANOVA para cada grupo de pre-tratamiento (Suero fisiológico, MDMA, cocaína y MDMA + cocaína) con una variable *entre*, condicionamiento empleado con cuatro niveles (1.5 mg/kg de cocaína, 25 mg/kg de cocaína; 1.25 mg/kg de MDMA y 10 mg/kg de MDMA) una variable *intra*, “días” con dos niveles (Pre-C y Post-C). Las comparaciones posteriores se realizaron con la prueba de Newman-Keuls.

Durante las pruebas de extinción y reinstauración, las diferencias en el tiempo de permanencia en el compartimiento asociado con la droga entre el Pre-C y cada sesión de extinción o de reinstauración fueron analizadas con una prueba “*t de Student*”.

Estudio 4

13.4. Resultados

Post-Condicionamiento

CPL inducido por cocaína

El ANOVA realizado comparado el efecto del pre-tratamiento administrado a los animales y las dosis de cocaína empleadas en el condicionamiento, reveló un efecto de la variable días [F(1,89)=59.151; $p < 0.0001$], presentando en conjunto, todos los grupos un incremento significativo el tiempo pasado en el compartimiento asociado a la droga durante el Post-C ($p < 0.01$). También se mostró significativa la interacción entre la dosis empleada x días [F(1,89)=4.524; $p < 0.0362$], mostrando que los valores del Post-C son más elevados en los grupos condicionados con la dosis alta de cocaína, independientemente del pre-tratamiento recibido ($p < 0.05$).

CPL inducido por MDMA

El ANOVA realizado comparado el efecto del pre-tratamiento administrado a los animales y las dosis de cocaína empleadas en el condicionamiento, reveló un efecto de la variable días [F(1,115)=58.621; $p < 0.0001$], presentando en conjunto, todos los grupos un incremento significativo el tiempo pasado en el compartimiento asociado a la droga durante el Post-C ($p < 0.01$).

Análisis por pre-tratamiento recibido

Los ANOVAs realizados en cada grupo de pre-tratamiento revelaron un efecto de la interacción condicionamiento x días [F(3,50)=4.144; $p < 0.01$] en los grupos pre-tratados con suero fisiológico (ver Figura 23). Aquellos animales condicionados con cocaína (1.5 y 25 mg/kg) o 10 mg/kg de MDMA desarrollaron CPL ($p < 0.001$), mientras que no ocurrió así en los condicionados con 1.25 mg/kg de MDMA.

Los grupos pre-tratados con 10 mg/kg de MDMA o 25 mg/kg de cocaína mostraron un efecto significativo de la variable días [$F(1,57)=28.988$; $p<0.0001$] y [$F(1,49)=15.068$; $p<0.0003$], respectivamente. No resulto significativa en ninguno de estos casos la interacción condicionamiento x días, resultando por tanto que todos los grupos de tratamiento desarrollaron CPL (ver Figuras 24 y 25).

En los grupos pre-tratados con cocaína + MDMA se observó un efecto de los días [$F(1,51)=44.057$; $p<0.0001$] y de la interacción condicionamiento x días [$F(3,51)=3.108$; $p<0.034$] (ver Figura 26). Globalmente todos los grupos desarrollaron CPL ($p<0.01$), pero aquellos animales condicionados con 25 mg/kg de cocaína presentaron unos valores en el test de Post-C más elevados que recibieron la dosis más baja de esta misma droga (1.5 mg/kg) ($p<0.05$).

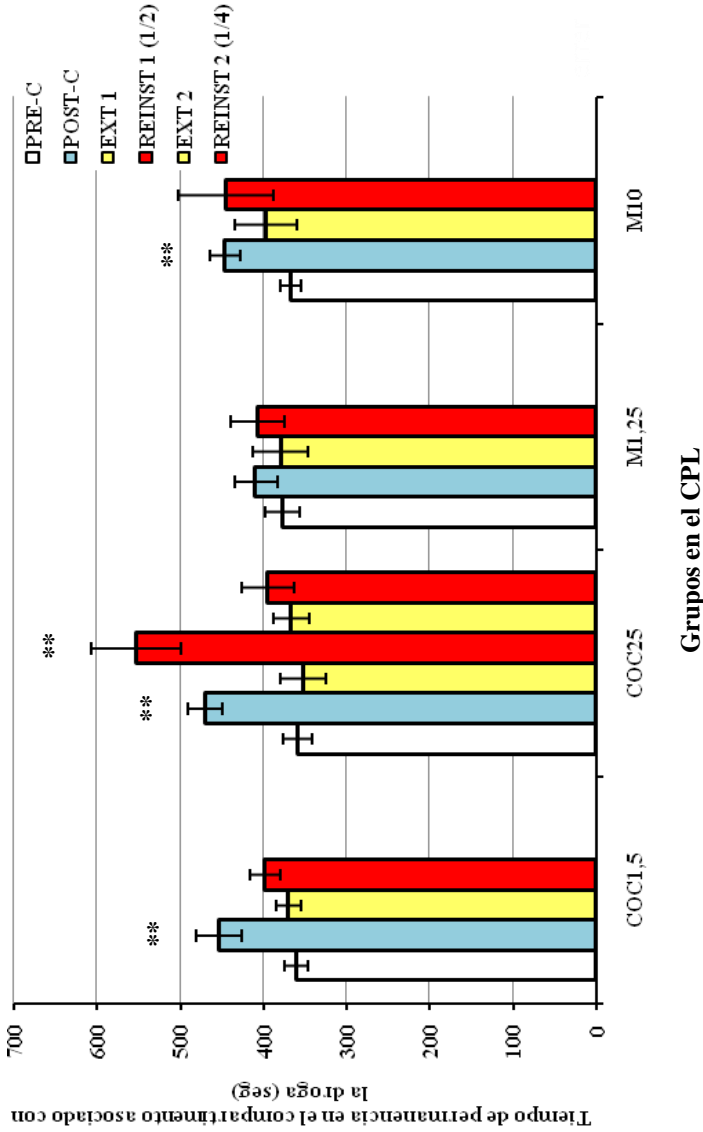


Figura 23. Condicionamiento de la preferencia de lugar inducido por cocaína (1.5 y 25 mg/kg) y MDMA (1.25 y 10 mg/kg) en ratones tratados previamente con **suero fisiológico** durante la adolescencia. *** $p < 0.001$ con respecto al Pre-C.

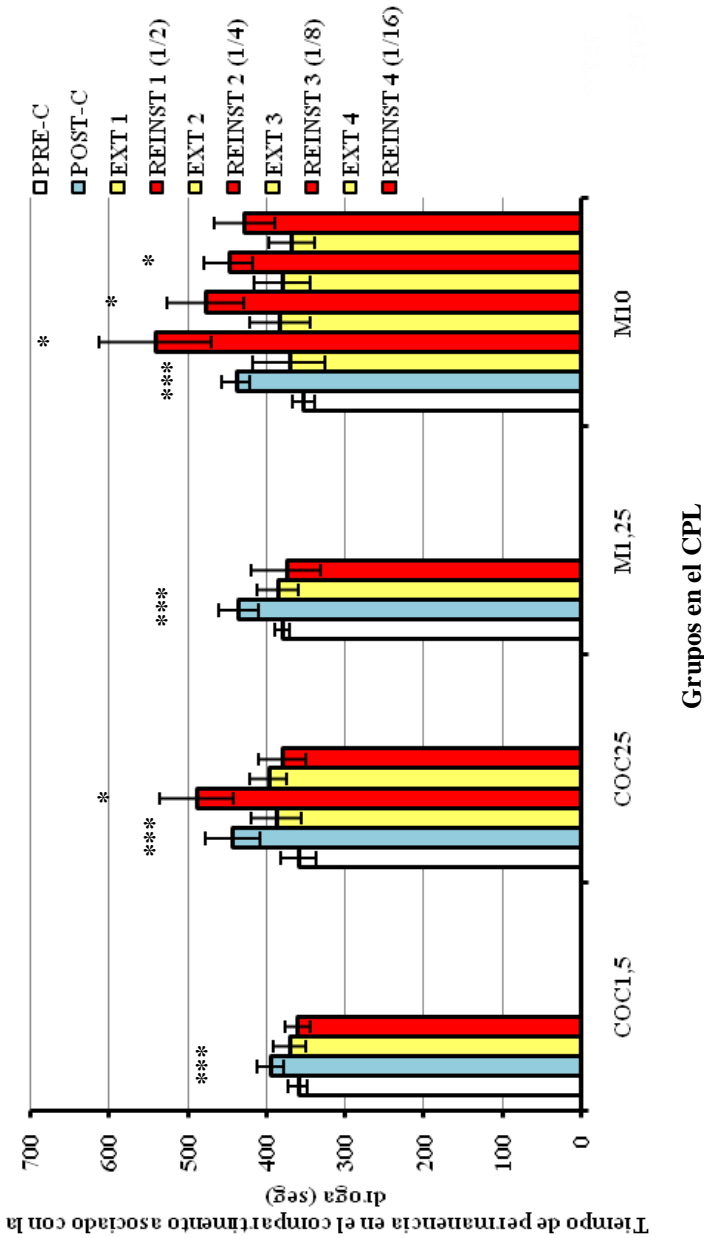


Figura 24. Condicionamiento de la preferencia de lugar inducido por cocaína (1.5 y 25 mg/kg) y MDMA (1.25 y 10 mg/kg) en ratones tratados previamente con **10 mg/kg de MDMA** durante la adolescencia. *p<0.05, *** p<0.001 con respecto al Pre-C.

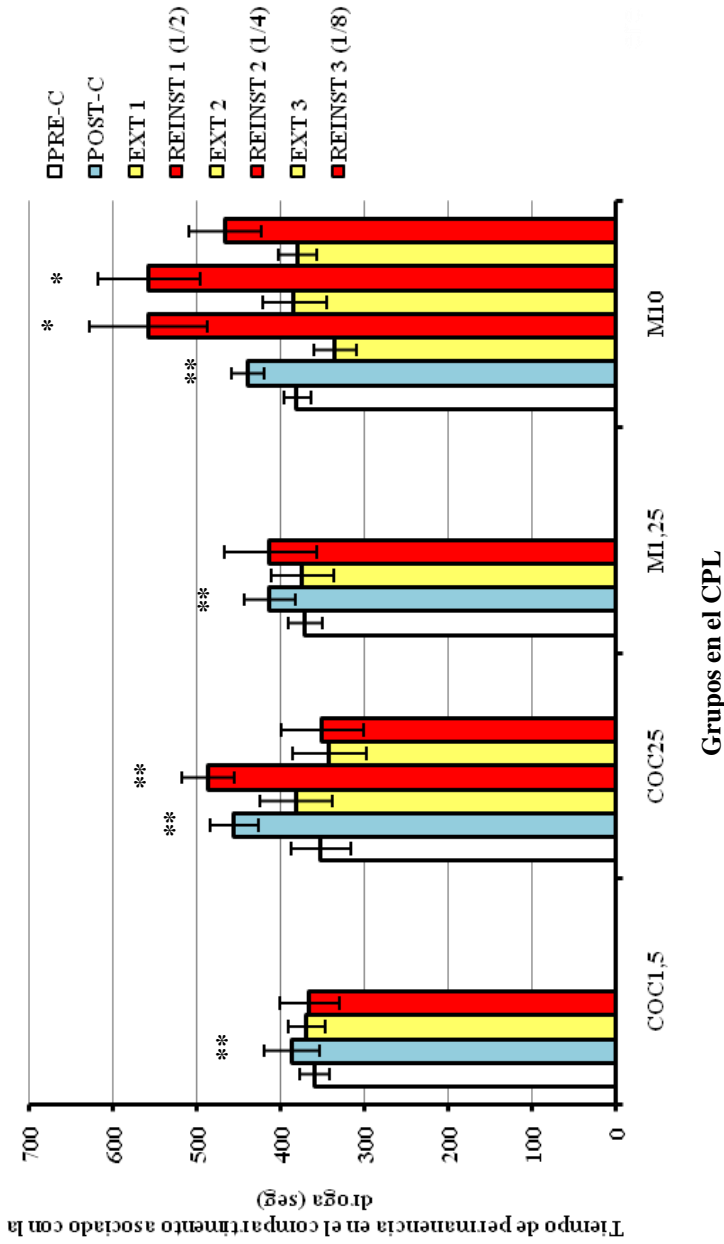


Figura 25. Condicionamiento de la preferencia de lugar inducido por cocaína (1.5 y 25 mg/kg) y MDMA (1.25 y 10 mg/kg) en ratones tratados previamente con 25 mg/kg de cocaína durante la adolescencia. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ con respecto al Pre-C.

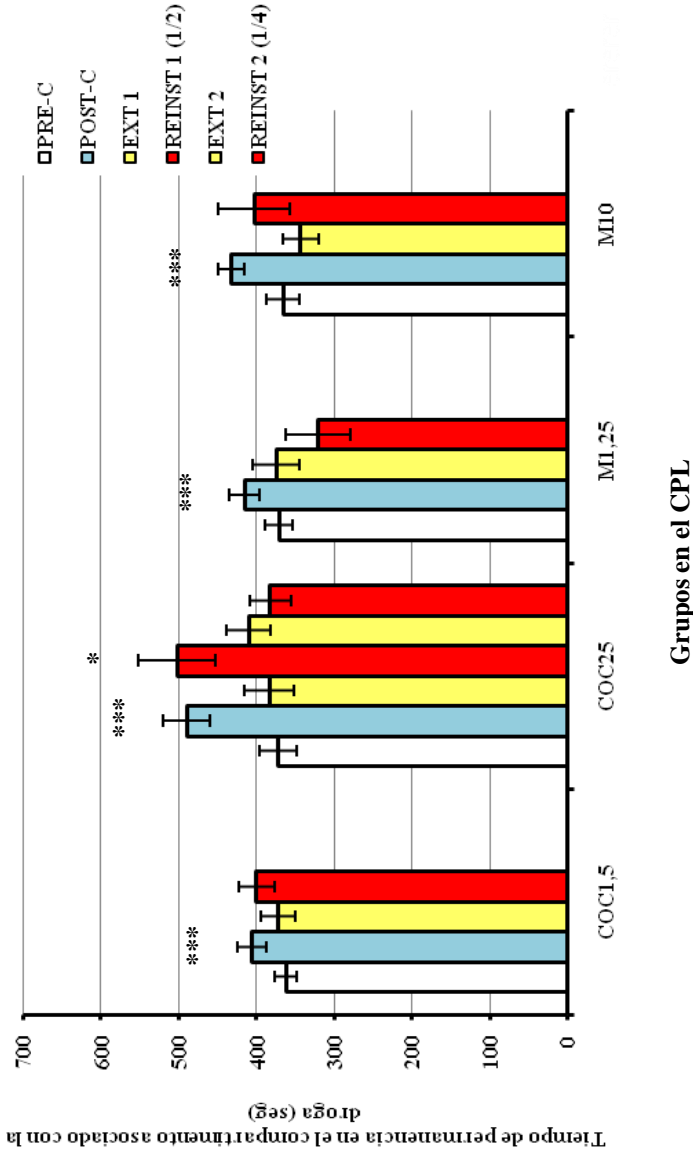


Figura 26. Condicionamiento de la preferencia de lugar inducido por cocaína (1.5 y 25 mg/kg) y MDMA (1.25 y 10 mg/kg) en ratones tratados previamente con **cocaína (25 mg/kg)** y **MDMA (10 mg/kg)** durante la adolescencia. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ con respecto al Pre-C.

Estudio 4

Extinción

El número de sesiones necesarias para extinguir la preferencia en los grupos pre-tratados con suero fisiológico fue de 3 para el grupo condicionado con 1.5 mg/kg de cocaína, 2 para el grupo condicionado con 25 mg/kg de cocaína, y 11 para el grupo condicionado con 10 mg/kg de MDMA.

El número de sesiones necesarias para extinguir la preferencia en los grupos pre-tratados con MDMA fue de 4 para el grupo condicionado con 1.5 mg/kg de cocaína, 16 para el grupo condicionado con 25 mg/kg de cocaína, 10 para el grupo condicionado con 1.25 mg/kg de MDMA, y 28 para el grupo condicionado con 10 mg/kg de MDMA.

El número de sesiones necesarias para extinguir la preferencia en los grupos pre-tratados con cocaína fue de 3 para el grupo condicionado con 1.5 mg/kg de cocaína, 2 para el grupo condicionado con 25 mg/kg de cocaína, 105 para el grupo condicionado con 1.25 mg/kg de MDMA, y 46 para el grupo condicionado con 10 mg/kg de MDMA.

Por último, el número de sesiones necesarias para extinguir la preferencia en los grupos pre-tratados con MDMA más cocaína fue de 2 para el grupo condicionado con 1.5 mg/kg de cocaína, 2 para el grupo condicionado con 25 mg/kg de cocaína, 4 para el grupo condicionado con 1.25 mg/kg de MDMA, y 9 para el grupo condicionado con 10 mg/kg de MDMA.

Reinstauración de la preferencia

La administración de 0.75 mg/kg de cocaína no reinstauró la preferencia en ninguno de los grupos condicionados con 1.5 mg/kg de cocaína (ver Fig. 27).

La administración de una dosis *priming* de 12.5 mg/kg de cocaína reinstauró la preferencia en todos los grupos condicionados con 25 mg/kg de cocaína ($p < 0.0001$ para los pre-tratados con suero fisiológico; $p < 0.02$ para los pre-tratados con MDMA; $p < 0.005$ para los pre-tratados con cocaína; $p < 0.04$ para los pre-tratados con MDMA más cocaína), ver Figura 28.

La administración de 0.625 mg/kg de MDMA no reinstauró la preferencia en ninguno de los grupos condicionados con 1.25 mg/kg de MDMA (ver Figura 29).

La administración de 5 mg/kg de MDMA no reinstauró la preferencia en aquellos grupos condicionados con 10 mg/kg de MDMA pre-tratados con suero fisiológico o MDMA más cocaína (ver Figura 30). Sin embargo, en el grupo pre-tratado con MDMA se indujo reinstauración de la preferencia con dosis *priming* de 5 mg/kg, 2.5 mg/kg ($p < 0.05$ en ambos casos) y 1.25 mg/kg ($p < 0.02$). Igualmente en el grupo de animales pre-tratados con cocaína se indujo reinstauración de la preferencia con dosis *priming* de 5 y 2.5 mg/kg ($p < 0.05$).

Estudio 4

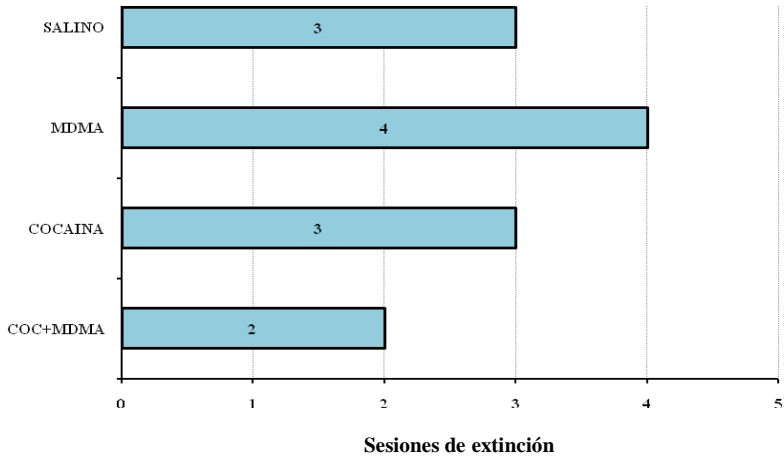


Figura 27. Grupos de **pre-tratamiento** condicionados con **1.5 mg/kg de cocaína**. Las columnas azules corresponden a las sesiones de extinción post-condicionamiento.

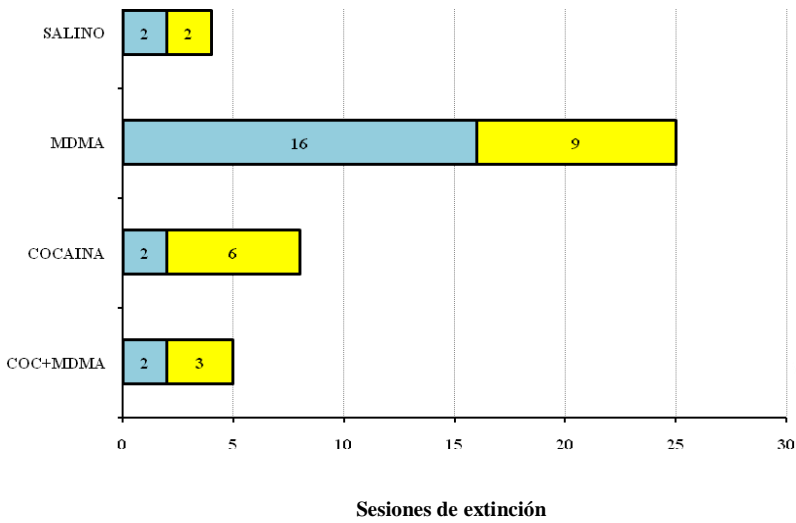


Figura 28. Grupos de **pre-tratamiento** condicionados con **25 mg/kg de cocaína**. Las columnas azules corresponden a las sesiones de extinción post-condicionamiento, mientras que las columnas amarillas corresponden a las sesiones de extinción tras la prueba de reinstauración inducida por la administración de una dosis una dosis *priming* de 12.5 mg/kg de cocaína.

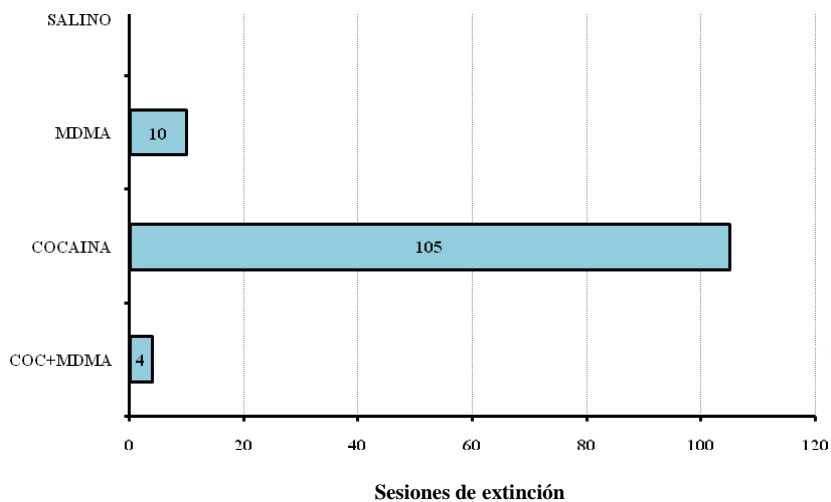


Figura 29. Grupos de **pre-tratamiento** condicionados con **1.25 mg/kg de MDMA**. Las columnas azules corresponden a las sesiones de extinción post-condicionamiento.

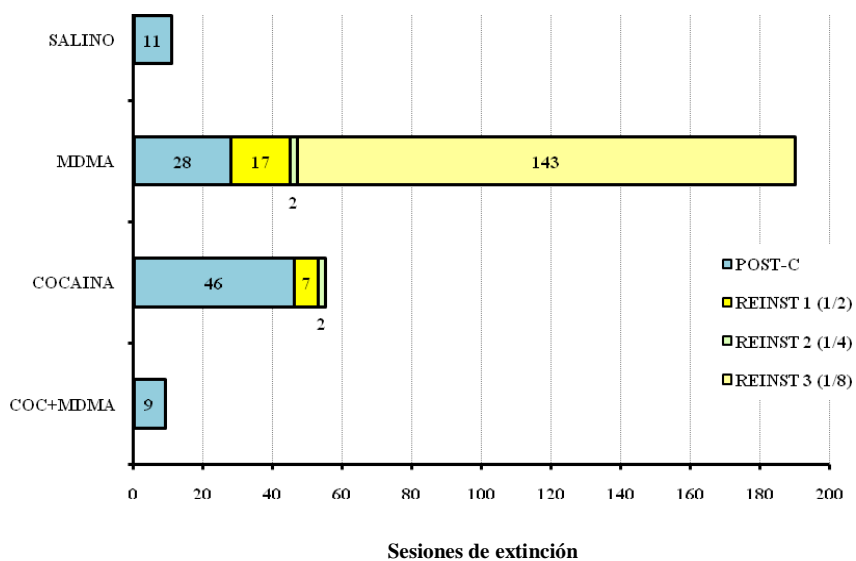


Figura 30. Grupos de **pre-tratamiento** condicionados con **10 mg/kg de MDMA**. Las sesiones de reinstauración se realizaron tras la administración de dosis *priming* de 5 mg/kg, 2.5 mg/kg y 1.25 mg/kg de MDMA (reinstauración 1/2, 1/4, 1/8, respectivamente).

13.5. Discusión

Los principales resultados de esta cuarto estudio se pueden resumir en los siguientes puntos. Hemos observado que la exposición durante la adolescencia a la MDMA, la cocaína, o a ambas drogas, incrementa el efecto reforzante de la MDMA cuando los animales ya son adultos. Además, el tiempo necesario para extinguir la preferencia al lugar asociado con cualquiera de las dosis empleadas de MDMA, fue mucho más largo en los animales que habían recibido cocaína durante la adolescencia. Igualmente, observamos que la exposición a la MDMA o a la cocaína (pero no a ambas drogas conjuntamente) durante la adolescencia, incrementó la sensibilidad a la reinstauración de la preferencia inducida por 10 mg/kg de MDMA, siendo la extinción de esta preferencia mucho más larga en los animales expuestos a la MDMA durante la adolescencia.

Por lo que respecta al CPL inducido por cocaína, a diferencia de lo que hemos observado con la MDMA, la pre-exposición a la MDMA, la cocaína, o a ambas drogas, durante la adolescencia no afectó al CPL inducido por cualquiera las dosis de cocaína empleadas. Sin embargo, el tiempo necesario para extinguir la preferencia en los animales condicionados con cualquiera de las dosis de cocaína fue sustancialmente más largo cuando los animales habían sido tratados con MDMA durante la adolescencia. Tampoco observamos un efecto del pretratamiento recibido durante la adolescencia al estudiar la vulnerabilidad a la reinstauración de la preferencia. Sin embargo, en el grupo condicionado con 25 mg/kg, el tiempo necesario para extinguir la preferencia tras la reinstauración con la dosis *priming* de 12.5 mg/kg, fue mucho más larga en los animales pre-tratados con MDMA durante la adolescencia.

CPL inducido por MDMA

Aunque analizados en conjunto todos los animales tratados con MDMA desarrollaron CPL, los ANOVAS realizados en función del pre-tratamiento recibido mostraron que aquellos animales que recibieron previamente suero fisiológico desarrollaron CPL con la dosis más

alta de MDMA, no mostrando sin embargo preferencia tras condicionarse con 1.25 mg/kg de MDMA (SF-M1.25). Cuando el pre-tratamiento consistió en la administración de MDMA o cocaína, ya fuera separadamente o de forma conjunta, todos los animales desarrollaron CPL con cualquiera de las dosis de MDMA empleadas. Pero además, sólo en aquellos expuestos exclusivamente a la cocaína, el proceso de extinción de la preferencia se alarga mucho más. Por ejemplo, en los animales condicionados con 1.25 de MDMA, aquellos pre-tratados con MDMA sola (M-M1.25), o más cocaína (MC-M1.25), necesitaron 10 y 4 sesiones de extinción respectivamente para extinguir la preferencia. Aquellos pre-tratados con cocaína (C-M1.25), sin embargo, necesitaron muchísimo más tiempo (105 sesiones). Recordemos que los animales pre-tratados con vehículo no desarrollaron CPL a esta dosis de MDMA. Tras ser condicionados con la dosis más alta de MDMA (10 mg/kg), también el grupo que recibió previamente cocaína requirió más tiempo para extinguir la preferencia (46 sesiones) que el resto (11 sesiones para los tratados con vehículo, 28 para los que recibieron MDMA y solo 9 para los que recibieron MDMA más cocaína). Por último deberíamos destacar que en todas las dosis estudiadas, la extinción ocurrió más rápidamente en los grupos que fueron pre-tratados con MDMA más cocaína.

Por lo que respecta a la reinstauración de la preferencia inducida por MDMA, aunque los grupos pre-tratados con cocaína, MDMA, o ambos, sí que desarrollaron preferencia al lugar asociado con la dosis baja de 1.25 mg/kg de MDMA, no obtuvimos reinstauración de la preferencia en ninguno de estos grupos. No ocurrió así en los animales condicionados con 10 mg/kg de MDMA. Aunque el tiempo pasado en el compartimiento asociado a la droga fue bastante alto tras administrar una dosis *priming* de 5 mg/kg en los animales pre-tratados con suero fisiológico, y en menor medida también en los que recibieron durante la adolescencia MDMA y cocaína, no se alcanzó la significación estadística (fundamentalmente debido a la gran variabilidad en la respuesta), por lo tanto en estos dos grupos no se obtuvo reinstauración. Sin embargo, en los animales tratados con MDMA durante la adolescencia obtuvimos reinstauración con las dosis *primings* de 5, 2.5 y 1.25 mg/kg de MDMA. La administración de cocaína durante la adolescencia también incremento la vulnerabilidad a la reinstauración de la preferencia inducida por 10 mg/kg de

Estudio 4

MDMA, observándose reinstauraciones con las dosis de 5 y 2.5 mg/kg de MDMA. Por lo que respecta a la extinción de estas reinstauraciones, hemos de destacar que en los animales tratados con MDMA durante la adolescencia la extinción de la tercera reinstauración (1.25 mg/kg) requirió 143 sesiones para producirse. Aunque la dosis de 0.625 mg/kg no fue efectiva en la reinstauración de la preferencia, tenemos que tener en cuenta el largo tiempo transcurrido a la hora de valorar este resultado.

Cuando comparamos estos resultados con los del tercer estudio, observamos una diferencia en la reinstauración de la preferencia. En el tercer estudio, los ratones condicionados con 10 mg/kg recayeron con 5, 2.5 y 1.25 mg/kg, sin embargo en este trabajo, los animales pre-tratados con suero fisiológico no mostraron reinstauración tras recibir 5 mg/kg. Estas diferencias podemos atribuir las a la edad de los animales (adolescentes en el tercer estudio y adultos en este estudio). En numerosos estudios se ha observado diferencias en la sensibilidad a los efectos reforzantes de las drogas dependiendo de la edad de los animales, por ejemplo, aparece una disminución en los efectos reforzantes de la cocaína en los sujetos adultos (Åberg y cols., 2007). También debemos tener en cuenta el hecho de que los animales de este estudio hayan sufrido un pre-tratamiento durante la adolescencia, a diferencia de los del tercer estudio.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la exposición durante la adolescencia a la MDMA, la cocaína, o a ambas drogas, produce cambios a largo plazo en el sistema de refuerzo de estos animales de tal manera que se incrementan los efectos reforzantes de la MDMA. No se han realizado estudios en los que se evalúe la administración previa de MDMA, cocaína, u otras drogas sobre el CPL inducido por la MDMA. Los escasos trabajos realizados hasta la fecha se han centrado fundamentalmente en estudiar el efecto de la administración previa de MDMA o cocaína sobre los efectos reforzantes de este último psicoestimulante.

CPL inducido por cocaína

Por lo que respecta al CPL inducido por cocaína, nuestros resultados muestran que todos los animales condicionados con cocaína desarrollaron preferencia al lugar asociado con esta droga. Sin embargo, aquellos que recibieron la dosis más alta presentaron una preferencia significativamente mayor, independientemente del pre-tratamiento recibido. Este resultado no es sorprendente, ya que la dosis de 1.5 mg/kg de cocaína debe considerarse una dosis umbral en nuestras condiciones experimentales. En estudios previos no habíamos obtenido CPL con esta dosis de cocaína, aunque sí se observó una tendencia a incrementar el tiempo en el compartimiento asociado con esta dosis (Maldonado y cols., 2006). En ambos estudios se han empleado ratones adultos, por lo que la edad no debe ser un factor a tener en cuenta. No obstante, sí que debemos considerar que el hecho de que los animales pre-tratados con suero fisiológico también desarrollen preferencia puede ser debido a haber recibido una serie de inyecciones durante la adolescencia, que puede haber afectado al desarrollo de los animales debido al estrés de las administraciones durante un periodo tan crítico del desarrollo. El cerebro adolescente desarrolla adaptaciones morfológicas, así como cambios endocrinos y neurales durante este periodo. Para algunos adolescentes, los episodios de estrés pueden ser muy severos e impactar negativamente en el desarrollo neuronal, incluyendo procesos de maduración neuronal (Brunson y cols., 2003). Además, los ratones periadolescentes muestran niveles más altos de cortisol basal que los adultos, lo cual sugiere que el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal se encuentra fisiológicamente elevado durante la adolescencia (Laviola y cols., 2002). Está plenamente demostrado que el estrés afecta tanto la iniciación, como el mantenimiento y la recaída en el consumo de drogas de abuso en los seres humanos (Gordon, 2002). En modelos animales, la exposición a un estrés intermitente incrementa el grado de adquisición y la respuesta de la AA de psicoestimulantes, facilitando la reinstauración de la toma de droga (Piazza y Le Moal, 1998; Yap y Miczek, 2007). Estos efectos se han atribuido fundamentalmente a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Marinelli y Piazza, 2002), lo cual implica la liberación de glucocorticoides desde el cortex adrenal (Herman y cols., 2003). Como ya hemos comentado previamente, este factor también podría afectar a la vulnerabilidad de los

Estudio 4

animales ante dosis *priming* que induzcan reinstauración de la preferencia inducida por MDMA.

Aunque no hemos observado diferencias en cuanto a la adquisición del CPL inducido por cocaína, la exposición previa a MDMA durante la adolescencia retrasa la extinción de la preferencia. El periodo de extinción nos informa sobre las propiedades motivacionales de las drogas, las cuales se reflejan por la persistencia de la conducta de búsqueda de la droga en ausencia de la misma. Igualmente es una poderosa herramienta para estudiar las propiedades incentivas motivacionales de los estímulos asociados con una droga (Pulvirenti, 2003). Se considera que el CPL se ha extinguido cuando no existen diferencias entre el tiempo pasado en el compartimiento asociado con la droga en la sesión de extinción y en el Pre-C, pero si las hay con los valores del Post-C (Aguilar y cols., 2008). Nuestros resultados muestran que, en los animales que recibieron 1.5 mg/kg de cocaína, la extinción ocurrió en 3 sesiones en los pretratados con vehículo (SF-C1.5) o cocaína (C-C1.5), y sólo se necesitaron 2 en los tratados con cocaína más MDMA (MC-C1.5), persistiendo durante 4 sesiones en los pre-tratados con MDMA exclusivamente (M-C1.5). Similares resultados se observaron tras condicionar a los animales con 25 mg/kg de cocaína, todos los grupos extinguieron la preferencia en 2 sesiones, con la excepción de los que habían recibido previamente MDMA que necesitaron 16 para presentar la extinción (M-C25). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la exposición previa a la MDMA durante la adolescencia, aunque no modifica la adquisición del CPL inducido por cocaína, sí que retrasa la extinción de esta preferencia. Es decir, dificulta el establecimiento de un nuevo aprendizaje, en el cual un determinado contexto ya no ha de asociarse a los efectos de la droga. Se han realizado muy pocos estudios en los que se evalué el efecto de una pre-exposición a la MDMA sobre la extinción de la preferencia, y en aquellos en los que se estudia la vulnerabilidad a la reinstauración (por ejemplo, Achat-Mendes e Itzhak, 2003), la extinción se realiza de forma forzada y el periodo es similar para todos los grupos.

Por lo que respecta a la reinstauración de la preferencia, una vez alcanzada la extinción, en ninguno de los grupos conseguimos que la dosis *priming* de 0.75 mg/kg de cocaína

reinstaurara la preferencia tras el condicionamiento con 1.5 mg/kg de esta droga. Igualmente, no se observó efecto del pre-tratamiento en el grupo condicionado con 25 mg/kg de cocaína, observándose reinstauración con la dosis de 12.5 mg/kg en todos los grupos, pero en ningún caso con dosis *priming* inferiores. Por lo tanto, no hemos obtenido ningún efecto del pre-tratamiento en la reinstauración del CPL inducido por cocaína. Hemos de señalar que el tiempo requerido para extinguir esta reinstauración fue, al igual que había ocurrido con la extinción de la preferencia, mucho más largo en los animales pre-tratados con MDMA (9 sesiones), en comparación con las 6 y 3 requeridas por los pre-tratados con cocaína sola o con MDMA, respectivamente, o las 2 del grupo control (pre-tratado con vehículo).

Aunque se han realizado varios estudios en los cuales se evalúa el efecto de la exposición previa a la MDMA sobre el CPL inducido por cocaína, en muy pocos casos se ha realizado esta exposición durante la adolescencia. En un estudio publicado en 2003, Achat-Mendes e Itzhak evaluaron los efectos de la administración repetida durante la adolescencia de metilfenidato y de MDMA, estudiando sus efectos sobre el CPL inducido por cocaína un mes después de dicha exposición. Estos autores observaron que la exposición previa a la MDMA no afectaba al CPL inducido por 20 mg/kg de cocaína, al igual que hemos observado en nuestro trabajo. Curiosamente, los animales expuestos al metilfenidato mostraron una marcada disminución de la preferencia inducida por cocaína. La extinción se produjo en todos los grupos por igual. El resultado más importante obtenido por estos autores fue que sólo los animales expuestos al metilfenidato o la MDMA durante la adolescencia presentaron reinstauración de la preferencia ante una dosis *priming* de cocaína (5 mg/kg).

Estos resultados no coinciden con los obtenidos en nuestro trabajo, ya que no hemos observado tal incremento en la vulnerabilidad a la recaída con ninguna de las dos dosis utilizadas. Las razones de esta discrepancia pueden ser varias. En primer lugar aunque en ambos casos se han utilizado ratones expuestos a la mismas dosis de MDMA en un periodo similar de la adolescencia (alrededor del día postnatal 30), la pauta de administración es

Estudio 4

diferente, ya que en nuestro estudio, como hemos venido haciendo anteriormente, hemos utilizado un modelo que trata de imitar a los *binges* o atracones (2 dosis al día /3 días), mientras que en el trabajo de Achat-Mendes e Itzhak se realizan 7 administraciones en una semana. Los estudios realizados en nuestro tercer trabajo nos han indicado que la pauta de administración de una misma dosis de MDMA puede afectar dramáticamente los efectos neuroquímicos que produce esta droga. Además, aunque en ambos estudios hemos dejado pasar un periodo de tiempo (3-4 semanas) antes de realizar el CPL, existen algunas diferencias en cuanto al procedimiento del mismo. En el trabajo de Achat-Mendes e Itzhak, las sesiones de extinción se realizan administrando una inyección de suero fisiológico y confinando al animal en ambos compartimentos sucesivamente, por lo cual todos los grupos realizan el mismo número de sesiones de extinción y por tanto, estos autores no realizan una medición del tiempo que cada grupo necesita para extinguir espontáneamente la preferencia. Estas diferencias de procedimiento podrían explicar los discrepantes resultados obtenidos. Hemos de mencionar que la exposición previa a la MDMA si que alargó tanto el tiempo necesario para alcanzar la extinción tras el Post-C del CPL inducido por cocaína, como tras la reinstauración, lo cual apunta a un efecto de la MDMA sería comparable al descrito por estos autores. Contrariamente, nuestros resultados en el CPL inducido por MDMA si que coinciden con los de Achat-Mendes e Itzhak (2003), pues hemos obtenido un incremento en los efectos reforzantes de la MDMA, y una vulnerabilidad mayor a la reinstauración de la preferencia como hemos mencionado anteriormente.

El resto de trabajos realizados hasta la fecha muestran en general que la pre-exposición previa a la MDMA incrementa los efectos reforzantes de la cocaína, aunque también se observan resultados contrarios. Fone y cols., (2002) administraron 7.5 mg/kg de MDMA 2 veces al día durante 3 días a ratas adolescentes (PND 39-41), las cuales mostraron 26 días después (cuando ya son adultas) un ligero incremento en el CPL inducido por la cocaína. No se observó neurotoxicidad serotoninérgica ni dopaminérgica tras este tratamiento. Similares resultados han sido descritos por Horan y cols., (2000) en ratas adultas, quienes administraron 20 mg/kg de MDMA dos veces al día durante 4 días, observando 2 semanas

después que el CPL inducido por cocaína era mayor en las ratas tratadas con MDMA. Este régimen sí que indujo en animales adultos una sustancial disminución serotoninérgica (70%). Estos mismos autores han demostrado en un estudio previo, que tras un pre-tratamiento similar, una administración de MDMA induce un incremento mayor en la liberación de DA en el NAcc (Morgan y cols., 1997). Recientemente, Åberg y cols., (2007) han administrado una dosis diaria de 2 o 5 mg/kg MDMA durante 7 días a ratas adultas o adolescentes, comenzando sólo 5 días después el CPL inducido por cocaína (10 mg/kg). Las ratas adolescentes tratadas con vehículo no muestran CPL, pero si las que habían recibido MDMA. Sin embargo en las ratas adultas, el CPL inducido por la cocaína fue menor en las pre-tratadas con MDMA, no llegándose a presentar un incremento significativo del tiempo que pasan en el compartimiento asociado con la cocaína. Hay que tener en cuenta que estos animales realizan el CPL siendo todavía adolescentes, a diferencia de los de nuestro estudio, el de Fone y cols., (2002), o el de Achat-Mendes e Itzhak (2003), en los cuales los animales comienzan el CPL cuando ya son adultos. En general, los resultados obtenidos con el CPL también concuerdan con los obtenidos con la AA, que muestran que las ratas expuestas previamente a la MDMA adquieren más fácilmente la AA de la cocaína (Fletcher y cols., 2001) o son más vulnerables a la recaída en la búsqueda de la anfetamina (Morley y cols., 2004).

A diferencia de estos resultados, Cole y cols., (2003) administraron MDMA a ratas adultas (10 mg/kg en 3 inyecciones diarias), no observándose cambios 14 días después en un CPL inducido por cocaína (20 mg/kg). Estos resultados serían similares a los obtenidos en nuestro estudio. Hemos de señalar que en este estudio se observó sólo una disminución de los marcadores serotoninérgicos del 25% en el hipocampo. Un daño neuroquímico comparable al que produce nuestro régimen de tratamiento. En el segundo estudio de esta "Tesis Doctoral" hemos determinado los efectos neurobioquímicos a largo plazo de una administración similar de MDMA y/o cocaína sobre la DA y la 5-HT. Hemos observado que 3 semanas después, los animales expuestos a 10 mg/kg de MDMA presentan una disminución (no significativa) de la concentración de DA en el NAcc del 25% aproximadamente. La disminución en la concentración de 5-HT es igualmente no

Estudio 4

significativa y ronda el 20 % en el estriado, no observándose ningún déficit en el hipocampo o la corteza.

Para muchos autores, el incremento en los efectos reforzantes de la cocaína en animales expuestos a la MDMA puede deberse a las acciones que esta droga ejerce sobre el sistema serotoninérgico, alterando los efectos reforzantes de la cocaína u otras drogas y por lo tanto, su potencial de abuso (Horan y cols., 2000; Fletcher y cols., 2001). Las neuronas serotoninérgicas inervan y modulan funcionalmente el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico. En general, la 5-HT inhibe la función dopaminérgica, aunque en algunos casos puede facilitarla. Uno de los trabajos que apoya esta idea es el de Morgan y cols., (1997) quienes administraron una pre-tratamiento con MDMA a ratas adultas (2 administraciones diarias durante 4 días de 20 mg/kg de MDMA), y 2 semanas después, observaron la liberación de DA tras la inyección de 20 mg/kg de cocaína. El incremento en la liberación de este neurotransmisor fue mucho mayor en el grupo pre-tratado con MDMA. Para estos autores, los resultados se deben a la destrucción serotoninérgica que este tratamiento induce en las ratas. Por lo tanto, tras un régimen neurotóxico, los animales deberían auto-administrarse más y responder más al CPL.

Pero en muchos casos, como sería el de nuestro trabajo, los regímenes de MDMA empleados no inducen neurotoxicidad serotoninérgica ni dopaminérgica. Otra posible explicación es la formulada por Kalivas y cols., (1998), quienes proponen que la administración continuada de MDMA induce sensibilización a los efectos estimulantes de una administración aguda de MDMA o de cocaína, debido a un aumento en la liberación de DA. Estos autores han observado que la administración repetida de MDMA produce un incremento en la respuesta motora ante una dosis de MDMA 12 días después de finalizar el pre-tratamiento. Además, los animales pre-tratados con la dosis más alta de MDMA también presentaron una respuesta incrementada a la administración de cocaína. La liberación de DA tras la administración de MDMA también fue superior en los animales tratados previamente con MDMA, ya fuera con una dosis neurotóxica (20 mg/kg) o no (5 mg/kg). Estos resultados sugieren que la MDMA puede inducir sensibilización a nivel del

NAcc, por mecanismos diferentes de los dependientes de la función serotoninérgica. Cabe recordar que la administración aguda de MDMA induce una elevación dosis-dependiente de los niveles extracelulares de 5-HT y DA en el estriado y en el NAcc de la rata (Yamamoto y Spanos, 1988). La sensibilización cruzada con la cocaína nos indica que debe existir un solapamiento en las adaptaciones neurales que median la sensibilización conductual. Al igual que en el caso de la MDMA, la sensibilización a la cocaína también se asocia a un incremento en la liberación de DA en el NAcc, aunque las adaptaciones post-sinápticas parecen ser diferentes. La sensibilización inducida por cocaína incrementa la responsividad de las neuronas espinosas medias del estriado (Henry y White, 1991), mientras que la sensibilización inducida por MDMA produce una reducción (White y cols., 1996).

Al igual que hemos descrito anteriormente para la MDMA, también se han realizado estudios en los cuales tras exponer a los animales a la cocaína se evalúan posteriormente los efectos reforzantes de diferentes drogas, siendo los resultados no totalmente convergentes. En la mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha, la exposición a la cocaína, la amfetamina, o el metilfenidato, incrementan los efectos reforzantes de la cocaína o la morfina ya sea utilizando el procedimiento del CPL o la AA (Shippenberg y cols., 1998; Schenk e Izenwasser, 2002; Suto y cols., 2003; Kim y cols., 2004). Sin embargo, Schramm-Sapota y cols., (2004), administraron 20 mg/kg de cocaína diariamente durante 5 días a ratones adolescentes o adultos, realizando 4 semanas después un CPL con cocaína (2.5, 5, 10 y 20 mg/kg). A diferencia de los trabajos anteriores, estos autores no observaron diferencias debidas al pre-tratamiento. Estas divergencias pueden deberse, entre otros factores, al momento en el cual se administra la cocaína. Catlow y Kirstein (2007) han observado que en las ratas adolescentes tratadas con cocaína (20 mg/kg cada 24 h durante 10 días) durante la adolescencia, presentan una respuesta incrementada del sistema dopaminérgico cuando los animales se exponen a reforzadores naturales (sucrosa). Curiosamente si el tratamiento se realiza en ratas adultas, estas presentan unos niveles más bajos de DA en respuesta a la sucrosa. Estos resultados demuestran que la administración de cocaína produce diferentes efectos a largo plazo en función del momento del desarrollo en las ratas, diferenciando entre adolescencia y edad adulta. En esta misma línea, Straiiko y

Estudio 4

cols., (2007) han observado que ratas adultas expuestas a la MDMA no desarrollan CPL inducido por el sexo, demostrando una disminución de la liberación de DA ante reforzadores naturales.

No conocemos trabajos publicados hasta la fecha en los que se estudie el efecto de la administración conjunta de MDMA y cocaína sobre los efectos reforzantes de otras drogas de abuso, a excepción de un estudio realizado con anterioridad en nuestro laboratorio (Daza-Losada y cols., 2008a; ver anexo IV). En este trabajo, tras exponer a ratones adolescentes a una pauta de administración de MDMA y/o cocaína similar a la utilizada aquí, observamos que la exposición de los animales exclusivamente a la MDMA incrementó la vulnerabilidad a la reinstauración del CPL inducido por morfina tres semanas después (Daza-Losada y cols., 2008a). Aunque la magnitud de la preferencia inducida por 40 mg/kg de morfina no se modificó, los ratones tratados con 10 y 20 mg/kg de MDMA mostraron una reinstauración más alta de la preferencia inducida por la morfina, respondiendo a dosis *priming* más bajas que los animales no tratados. Estos resultados, unidos a los obtenidos en este estudio con el CPL inducido por cocaína o MDMA, apoyan la idea de que la exposición temprana a la MDMA, la cocaína, o a ambas drogas produce cambios a largo plazo, presumiblemente en el sistema de refuerzo cerebral que perduran hasta la edad adulta y modifican la respuesta de los animales a diferentes drogas de abuso. En general, la exposición exclusivamente a la cocaína incrementa los efectos reforzantes de la MDMA, obteniéndose CPL con dosis bajas e incrementando la vulnerabilidad a la reinstauración mediante dosis *priming*. Igualmente produce un alargamiento del tiempo necesario para extinguir la preferencia inducida por MDMA. Sin embargo, no afecta ni al CPL inducido por morfina, en el cual disminuye la vulnerabilidad a la reinstauración, ni al inducido por la misma cocaína. La exposición previa a la MDMA también incrementa los efectos reforzantes de la propia MDMA y la vulnerabilidad a la reinstauración por dosis *primings*, tanto de la MDMA como de la morfina. Aunque no produce afectación de CPL inducido por cocaína, la pre-exposición a la MDMA sí que produce un alargamiento del tiempo necesario para extinguir la preferencia inducida por esta droga. Curiosamente, la administración de ambas drogas sólo incrementó el efecto reforzante de la MDMA (se

observa CPL con la dosis de 1.5) sin incrementar la vulnerabilidad a la reinstauración, no incrementando el efecto ni de la morfina ni de la cocaína. Por lo tanto, en conjunto, la exposición a la MDMA durante la adolescencia parece ejercer efectos más importantes a largo plazo ya que potencia, de una manera o de otra, los efectos reforzantes de las tres drogas estudiadas, la cocaína, la morfina, y la propia MDMA.

En conjunto, en este estudio hemos observado que la exposición a drogas durante la adolescencia incrementa los efectos reforzantes y la vulnerabilidad a la recaída de la MDMA, pero no de la cocaína. A la hora de interpretar estos resultados, hemos de tener en cuenta el diferente mecanismo de actuación de la MDMA y la cocaína. La cocaína incrementa la concentración sináptica de DA, 5-HT y NA, uniéndose a los transportadores de estos neurotransmisores e inhibiendo su recaptación en la terminal pre-sináptica. Por otra parte, el mecanismo de actuación de la MDMA es más complejo, induciendo una liberación aguda de DA y 5-HT (Colado y cols., 2004). Además, la MDMA presenta una moderada afinidad por una serie de receptores, entre los que se incluyen los α_2 -adrenergicos, los 5-HT₂ serotoninérgicos, los M₁ muscarínicos, o los H₁ histaminérgicos, cuya activación puede subyacer a ciertos efectos de la droga (Battaglia y cols., 1988). Los datos sugieren que la 5-HT tiene un papel más prominente en los efectos psicotrópicos de la MDMA, en comparación con los de la cocaína (Itzhak y Ali, 2006). Además, la toxicidad dopaminérgica inducida por la MDMA puede verse afectada por la co-administración con cocaína. En el segundo estudio de la presente tesis hemos demostrado que la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la MDMA, está completamente ausente en los grupos tratados con MDMA más cocaína, habiéndose obtenido resultados similares con un inhibidor de la recaptación de DA (O'Shea y cols., 2001), lo cual demuestra que el sistema dopaminérgico no se afecta en los animales tratados con ambas drogas.

Está claramente demostrado que la cocaína induce modificaciones en la función del receptor dopaminérgico y en los eventos de transducción posteriores (Anderson y Pierce, 2005). La regulación a la alza de la vía de señalización del AMPc inducida por la repetida exposición a la cocaína (Nestler, 2004b), aumenta la actividad del factor transcripcional

Estudio 4

CREB (Walters y cols., 2003). El incremento en la expresión del CREB en el NAcc disminuye los efectos reforzantes de la cocaína (Carlezon y cols., 1998) y de la morfina (Barrot y cols., 2002). Este podría ser uno de los mecanismos responsables de la forma en la que la cocaína afecta la respuesta del sistema dopaminérgico. Pero además, la exposición crónica a la cocaína incrementa la expresión de los factores de transcripción en el NAcc, como el delta-fosB, los cuales incrementan la responsividad de los animales a los efectos reforzantes y locomotores de la cocaína al afectar a la expresión de genes (Kelz y cols., 1999). Además, la administración crónica de cocaína modifica la fuerza sináptica de las proyecciones glutamatérgicas en las neuronas del NAcc, lo cual también puede contribuir a la sensibilización conductual y a la adicción (Thomas y cols., 2001).

Adicionalmente, cambios en el sistema opiáceo pueden contribuir a las propiedades psicoactivas y al potencial de abuso de las drogas. En general, el tratamiento con cocaína incrementa los niveles del RNAm de la prodinorfina en el estriado (Hurd y Herkenham, 1992; Steiner y Gerfen, 1993; Smith y McGinty, 1994; Wang y McGinty, 1996) y modula la liberación de DA mediante la activación de los receptores opiáceos (Spanagel y cols., 1990a; 1990b). La naloxona bloquea en ratones la hiperlocomoción producida por la MDMA, demostrando un papel del sistema opiáceo endógeno en alguno de los efectos de la MDMA (Compan y cols., 2003). Adicionalmente, se ha demostrado que la administración de MDMA incrementa las concentraciones estriatales de neurotensina y dinorfina (Johnson y cols., 1991), confirmado posteriormente mediante estudios de hibridación *in situ* (Adams y cols., 2005). Sin embargo, otros estudios no han observado cambios en la dinorfina estriatal tras una exposición aguda a la MDMA, aunque si se detectan incrementos tras una exposición crónica en el NAcc (Di Benedetto y cols., 2006). Las propiedades estimulantes y reforzantes de la cocaína y la MDMA, se cree se deben en parte a la habilidad de esta droga para activar las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas que se proyectan desde el ATV al NAcc (Hoebel, 1985; Kelley y Delfs, 1991). Estas dos estructuras son también clave en las propiedades reforzantes de las drogas de abuso (Wise y Rompre, 1989). Los cambios producidos en el sistema opiáceo endógeno por la cocaína o la MDMA, que afectaría a las neuronas que contienen dinorfina localizadas en el sistema dopaminérgico,

modularía la actividad de las neuronas dopaminérgicas. Las diferentes alteraciones neuroquímicas inducidas por la cocaína o la MDMA en estas estructuras podrían contribuir a la desregulación de los procesos de refuerzo, incrementando la susceptibilidad a la recaída tras la exposición a alguna de estas sustancias.

Todos estos efectos que hemos descrito, producidos por la administración de cocaína y MDMA, se modularían por las particulares características del cerebro adolescente. El desarrollo neural de los adolescentes se caracteriza por una extensiva producción y posterior poda de las sinapsis (Rakic y cols., 1994). La densidad de los receptores dopaminérgicos estriatales alcanza un pico a los 40 días de edad, y después disminuye hasta alcanzar los niveles de los adultos (Andersen y cols., 2000). La expresión del DAT en el NAcc y en el estriado se incrementa con la edad, alcanzando un pico a los 60 días de edad (Coulter y cols., 1997). Debido a este incremento del DAT durante la adolescencia, la elevada recaptación disminuye los niveles basales de DA en el estriado y en el NAcc durante la adolescencia (Andersen y Gazzara, 1993). El perfil del sistema dopaminérgico adolescente, con niveles más bajos de DA, incremento en los receptores dopaminérgicos, y en los niveles de AMPc, puede verse sobre-estimulado en presencia de cocaína o MDMA. La estimulación post-sináptica persistente, hiperpolariza las neuronas GABAérgicas, y permite que se libere más DA en el espacio extracelular, lo cual puede explicar, al menos en parte, la hiperactividad observada en ratas adolescentes (Catlow y Kirstein, 2005). Durante la adolescencia, las proyecciones glutamatérgicas desde el cortex prefrontal al ATV y las áreas límbicas están en desarrollo (Lewis, 1997). Es posible que la exposición continuada a la cocaína o MDMA durante la adolescencia sobre-estime el sistema dopaminérgico produciendo más conexiones sinápticas de las aferencias glutamatérgicas al ATV. Esto podría explicar por qué se produce una respuesta más importante, por ejemplo a la sucrosa, en las ratas adolescentes pre-tratadas con cocaína (Catlow y Kirstein, 2007).

En resumen, nuestro último estudio ha demostrado que la exposición durante la adolescencia a la cocaína, la MDMA, o a ambas drogas, ejerce profundos efectos sobre el sistema de refuerzo cerebral que perduran hasta la edad adulta, afectando

Estudio 4

fundamentalmente a las propiedades reforzantes de la MDMA, y en mucha menor medida a las de la cocaína. El diferente mecanismo de actuación de ambas drogas, afectando a un número mayor de sistemas de neurotransmisión en el caso de la MDMA, podría ser el responsable de estos diferentes resultados. Este estudio incide de nuevo en la adolescencia como periodo crítico del desarrollo, durante el cual, la exposición a las drogas puede incrementar el riesgo de desarrollar dependencia a estas sustancias, y por primera vez demuestra que la exposición a la cocaína, la MDMA, o a ambas drogas, durante este periodo del desarrollo, incrementa los efectos reforzantes de la MDMA y la vulnerabilidad en la recaída de la búsqueda de esta droga. En este estudio hemos tratado de aportar un pequeña información al respecto del consumo conjunto de MDMA y cocaína, pero son necesarios muchos más trabajos para clarificar de forma más definida la interacción entre ambas drogas. Por ejemplo, administrando secuencialmente y no de forma conjunta ambas sustancias (competencia por los mismos lugares de actuación), los efectos a largo plazo pueden verse fuertemente afectados.

Discusión general



14. DISCUSIÓN GENERAL

En general, los resultados de nuestro trabajo indican que la administración de cocaína modula los efectos de la MDMA, tanto tras la administración aguda como a largo plazo. Esta modulación va ha hacerse patente en diferentes conductas, como la ansiedad, y también a nivel bioquímico en la concentración de monoaminas cerebrales.

La administración MDMA induce un incremento agudo de la actividad motora dependiente de la dosis, que se ve incrementada cuando se administra además cocaína, observándose una ampliación temporal de este efecto. En un estudio previo (Daza-Losada y cols., 2008b) hemos observado que la administración repetida de MDMA durante la adolescencia no afecta a la actividad motora cuando esta se evalúa tres semanas después, en sujetos ya adultos. Sin embargo, la exposición a la cocaína sola o junto a la MDMA si que induce un incremento a largo plazo de esta conducta, fundamentalmente porque los animales no disminuyen su actividad una vez explorado el ambiente, como si hacen los grupos controles. Es conocido el efecto motor inducido por ambas drogas (Balogh y cols., 2004; Bankson y Cunningham, 2002; Koenig y cols., 2005; Maldonado y cols., 2006), siendo la hiperactividad producida por la cocaína debida principalmente al bloqueo del DAT (Uhl y cols., 2002), mientras que la MDMA podría tener componentes dopaminérgicos y serotoninérgicos, implicando a los receptores D₁, D₂, y 5-HT₂ (Green y cols., 2003). La administración conjunta de ambas sustancias potenciaría este efecto motor, probablemente al sumarse los efectos que hemos descrito.

Los jóvenes y adultos que consumen MDMA lo hacen fundamentalmente debido a los efectos prosociales que esta droga produce (Vollenweider y cols., 1998). Sin embargo, el éxtasis también puede producir ansiedad generalizada y ataques de pánico (Whitaker-Azmitia y Aronson; 1989; McCann y Ricaurte, 1992; Solowij y cols., 1992; Vollenweider y cols., 1998). En esta misma línea, hemos observado que en nuestros ratones adolescentes la administración aguda de MDMA no produce el efecto ansiolítico esperado en el LEC ya que no se incrementa el tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos del laberinto.

Discusión General

Sin embargo este efecto si está claramente presente cuando se administra MDMA junto con cocaína, mostrando los animales un comportamiento claramente diferente al aumentar considerablemente el tiempo que pasan en los brazos abiertos del laberinto. Comparables resultados hemos obtenido al estudiar el efecto a largo plazo del consumo de MDMA y/o cocaína (Daza-Losada y cols., 2008b). Aunque la administración repetida durante la adolescencia de MDMA exclusivamente, no afecta el nivel de ansiedad de los animales cuando son adultos, si estos han recibido ambas drogas (MDMA más cocaína) se muestran como adultos más impulsivos y menos temerosos, permaneciendo más tiempo en los brazos abiertos del LEC. Este perfil conductual es similar al que produce la administración de cocaína sola durante la adolescencia, como ya habíamos observado en estudios previos (Estelles y cols., 2007).

En este trabajo hemos evaluado la ansiedad desde dos perspectivas diferentes al utilizar otro paradigma diferente, como es la prueba de interacción social. El LEC es una prueba etológicamente aversiva que evaluaría la ansiedad general, mientras que en la prueba de interacción social, se mediría más específicamente la ansiedad en presencia de un compañero co-específico. Por lo tanto, no resulta sorprendente que hayamos observado resultados diferentes en ambas pruebas. La administración aguda de MDMA presenta un efecto dependiente de la dosis, ya que disminuye la interacción social a dosis altas (20 mg/kg) pero la incrementa cuando se administran dosis bajas (5 mg/kg). La co-administración de cocaína bloquea prácticamente estos efectos, ya que bajo los efectos de ambas drogas los ratones pasan un tiempo similar a los controles interactuando con sus co-específicos, observándose sólo un decremento del tiempo medio pasado en cada contacto en el grupo que recibió la dosis más alta de MDMA y cocaína. Por tanto, a diferencia de lo que habíamos descrito en el LEC, la co-administración de ambas drogas bloquearía el efecto agudo ansiolítico-prosocial ejercido por la dosis baja de MDMA, así como también moderaría el efecto ansiógeno de abstinencia social inducido por la dosis alta. Sin embargo, tras la administración repetida de MDMA durante la adolescencia, se observa un incremento de las conductas sociales en estos animales una vez son adultos, efecto que no es contrarrestado por la cocaína. Hemos de señalar que los animales expuestos a MDMA

más cocaína durante la adolescencia, aunque presentan más contactos sociales, también incrementan la amenazas a sus co-específicos. También hay que destacar que las típicas conductas de escape y evitación que induce la cocaína fueron bloqueadas por la coadministración de MDMA. Globalmente, los resultados de la prueba de interacción social destacan que el perfil conductual inducido por la administración aguda de MDMA es modificado en gran medida cuando se consume conjuntamente con cocaína. Este efecto es más sutil cuando observamos a los animales expuestos repetidamente a ambas drogas durante la adolescencia, que aunque se muestran más sociables (al igual que los expuestos exclusivamente a la MDMA) muestran un incremento de su agresividad.

Los déficits de memoria son uno de los problemas que más frecuentemente afectan a los consumidores de éxtasis, habiéndose descrito una correlación entre estos y la intensidad de la exposición a la droga (Laws y Kokkalis, 2007). Aunque no podemos afirmar que la administración de la dosis alta de MDMA (sola o en combinación con cocaína) impida el recuerdo de la tarea de evitación pasiva, si se observa que el tiempo que tardan los animales en cruzar el día del test es más corto, lo cual quiere decir que recuerdan peor. Este efecto no se modifico por la co-administración de cocaína, atribuyéndose por tanto el deterioro observado a la administración de la dosis alta de MDMA. Alteraciones en la función serotoninérgica pueden ser las responsables de este déficit (Santucci y cols., 1996), afectando por ejemplo al funcionamiento de los receptores NMDA glutamatérgicos (Moyano y cols., 2004). Aunque no es un trabajo realizado dentro de esta tesis, hemos de mencionar que no hemos observado deterioro a largo plazo en la memoria de los animales expuestos a una o ambas drogas durante la adolescencia, al realizar la tarea de evitación pasiva en la edad adulta (datos no publicados, Daza-Losada, Trabajo de investigación). Por lo tanto, nuestros resultados apuntan a un efecto sobre la memoria dependiente de la cantidad de MDMA administrada, pero no dependiente del policonsumo.

Uno de los aspectos más destacados de la presente tesis doctoral ha sido el uso de animales adolescentes en la realización de todos los estudios. Numerosos experimentos han puesto de manifiesto que las ratas y los ratones presentan adaptaciones neuroquímicas diferentes en

Discusión General

respuesta a la MDMA, evidenciándose que las ratas adolescentes son menos vulnerables a los efectos tóxicos. Por ejemplo, la administración repetida de 7,5 mg/kg dos veces al día durante tres días o una sola dosis de 20 mg/kg de MDMA no altera significativamente las concentraciones de 5-HT (Aguirre y cols., 1998). Sin embargo, tratamientos similares en ratas adultas inducen disminuciones en la concentración de 5-HT en diferentes áreas cerebrales (O'Shea y cols., 1998). Por todo ello, ha sido necesario realizar un estudio bioquímico de los cambios en las concentraciones de monoaminas inducidos por los diferentes protocolos de administración empleados, ya que los estudios comparables pero realizados en animales adultos pueden arrojar diferentes resultados. Nuestros resultados han mostrado que tras una administración aguda, las animales tratados con MDMA más cocaína presentan un incremento en el *turnover* de DA en el estriado. Sin embargo, la administración de cocaína sola, pero especialmente junto a la MDMA, incrementa las concentraciones de 5-HT en el estriado y sobre todo en la corteza, observándose una disminución del *turnover* de este neurotransmisor en el cortex. La exposición aguda a la MDMA exclusivamente no produjo prácticamente alteraciones en ninguno de estos neurotransmisores. Sin embargo, tras exponerse repetidamente a la dosis alta de MDMA durante la adolescencia, los animales mostraron tres semanas después una disminución en la concentración de DA en el estriado, no observándose esta lesión en los tratados también con cocaína. La administración de cocaína, sola o en combinación con MDMA, indujo un incremento en los niveles de 5-HT en el estriado, mientras que disminuyó estos niveles en el hipocampo. En conjunto estos resultados muestran que sobre la neurotransmisión dopaminérgica, la co-administración de ambas drogas produce un efecto agudo mucho más potente que la observada tras la administración individual, aunque tras la exposición continua, los efectos a largo plazo son más notables en los animales expuestos solo a la MDMA. La co-administración induce un incremento en el *turnover* DA que contrasta con la ausencia de efecto observada en los tratados con MDMA o cocaína independientemente. Sin embargo, los efectos neurotóxicos a largo plazo de la exposición repetida a la MDMA son totalmente abolidos por la co-administración de MDMA más cocaína. Sobre la neurotransmisión serotoninérgica, los resultados son comparables ya que la exposición aguda o crónica a la MDMA no modifica la concentración de 5-HT, mientras que la co-

administración con cocaína incrementa las concentraciones de este neurotransmisor, especialmente en el estriado.

Los posibles mecanismos para explicar estos efectos neuroquímicos ya han sido desarrollados ampliamente en las correspondientes discusiones de los estudios 1 y 2, aunque en esta discusión general hemos querido destacar las características que, para el estudio de los efectos de la MDMA, presenta la especie elegida para desarrollar este trabajo. Es conocido y ampliamente descrito el efecto neurotóxico que produce la administración de MDMA, dependiendo el neurotransmisor afectado de la especie estudiada. Los estudios realizados en ratas y primates han mostrado un perfil de neurotoxicidad serotoninérgica, indicando los datos disponibles hasta la fecha, que también es este el neurotransmisor más afectado en los seres humanos. Resulta muy difícil realizar estudios en seres humanos que corroboren los datos obtenidos en modelos animales, en los cuales siempre hemos de tener en cuenta una serie de variables a la hora de interpretar los resultados, como son la edad de los animales, la dosis y pauta de tratamiento empleado, la vía de administración, así como la especie o incluso la cepa empleada en el estudio. Por ejemplo, diferentes cepas de ratas presentan sensibilidades diferentes a los efectos neurotóxicos de la MDMA. Se observa una elevada sensibilidad en las ratas Dark Agouti, en contraste con las mucho más resistentes Sprague Dawley, o Wistar (Colado y cols., 1993, 1995; O'Shea y cols., 1998). Por lo que respecta a la lesión observada en primates, estos parecen ser mucho más sensibles que las ratas a los efectos tóxicos serotoninérgicos de la MDMA (Ricaurte y McCann, 1992). La vía de administración de la droga también parece ser muy importante, siendo más tóxica la parental que la vía oral. Pero las diferencias más marcadas las observamos en los estudios realizados en ratones, en los que la administración de MDMA induce una lesión dopaminérgica, sin prácticamente afectación del sistema de neurotransmisión serotoninérgico. Los efectos tanto agudos como a largo plazo de la MDMA son diferentes en ratas y ratones. Por ejemplo, la administración aguda induce una gran liberación de 5-HT en ratas (Mechan y cols., 2002b), siendo menor en el caso de los ratones (O'Shea y cols., 2001). La enzima limitante de la síntesis de 5-HT, la triptófano hidroxilasa es inhibida por la MDMA en ratas, pero no en ratones (Stone y

Discusión General

cols., 1987a), lo cual puede explicar en parte la depleción serotoninérgica observada solo en ratas. En ambas especies se produce una liberación dopaminérgica, que en el caso de los ratones parece deberse a la formación de un metabolito periférico (Escobedo y cols., 2005). Debido a la mayor similitud entre ratas y primates respecto al perfil de neurotoxicidad (serotoninérgica) inducido por la MDMA, las ratas han sido con frecuencia la especie más empleada en este tipo de estudios. Sin embargo, el estudio de la neurotoxicidad de la MDMA en ratones puede ayudarnos a comprender mejor los efectos conductuales producidos por la MDMA, ya que los ratones son un ejemplo de toxicidad dopaminérgica, sin afectación serotoninérgica, a diferencia de lo observado en ratas.

Buen ejemplo de esta utilidad son las observaciones del presente trabajo, en el cual hemos visto como los animales afectados de una lesión neurotóxica dopaminérgica no mostraban cambios conductuales a largo plazo en el LEC, mientras que los animales tratados con MDMA más cocaína presentaban un incremento marcado en el tiempo pasado en los brazos abiertos del LEC sin presentar ninguna lesión neurotóxica. Igualmente la actividad motora se modificó más intensamente en los pretratados con ambas drogas. Los cambios en la conducta social tampoco parecen ser influidos por la neurotoxicidad, ya que bien tras la exposición a la MDMA o a ambas drogas, los animales se muestran más sociables. Es decir, hemos observado una falta de relación entre los cambios conductuales y la lesión neurotóxica que la exposición a las drogas produce a largo plazo. Sin embargo, en un tratamiento agudo, la mayor alteración en el sistema dopaminérgico producida por la administración conjunta sí que induce cambios conductuales más relevantes. Por lo tanto nuestros resultados apoyan aquellos observados en consumidores de éxtasis, en los cuales la lesión serotoninérgica parece autolimitarse en el tiempo, aunque las alteraciones conductuales sí que persisten (Lyvers, 2006). Adicionalmente, justificaría el porqué un elevado porcentaje de consumidores de MDMA también lo son de cocaína, pues los efectos conductuales son más potentes al consumir ambas drogas simultáneamente.

Aunque la MDMA ha sido una droga que durante mucho tiempo se ha considerado sin potencial adictivo importante, numerosos estudios en animales utilizando el CPL (por

ejemplo, Meyer y cols., 2002) o la AA (por ejemplo, Schenk y cols., 2008) han demostrado que se comporta en modelos animales de forma comparable a otras drogas con conocido potencial adictivo, es decir induce AA o preferencia y es capaz de reinstaurar estas conductas una vez extinguidas. Estudios realizados en seres humanos también avalan este hecho, al describir en muchos consumidores síntomas de abstinencia, como el *craving*, habiéndose descrito que aproximadamente un tercio de los consumidores fuertes de MDMA cumplen los criterios de dependencia descritos por el DSM-IV (von Sydow y cols., 2002). En el tercer estudio hemos comprobado que la MDMA es una droga con capacidad para inducir CPL, y por primera vez, hemos demostrado que una vez extinguida la preferencia, una dosis *priming* inferior a la utilizada en el condicionamiento, es capaz de reinstaurar esta preferencia. Estos datos nos indican que la MDMA es una droga con potencial adictivo, ya que se comporta en el CPL de forma similar a como lo hacen otros psicoestimulantes como la cocaína. También hemos observado que la expresión del CPL depende de si el condicionamiento ha producido o no una lesión DA. En los animales en los que la pauta de condicionamiento ha producido una disminución marcada de la DA (condicionamiento diario), no se presenta preferencia. Sin embargo, usando una pauta de condicionamiento alterna que no induce lesión neurotóxica, los animales presentan preferencia y reinstauran esta preferencia tras una dosis *priming*.

Aunque el potencial adictivo de la MDMA parece ser bajo, el consumo de esta droga durante la adolescencia puede afectar a las propiedades adictivas de esta, y de otras drogas, incrementando así su potencial de abuso. La mayoría de los estudios pre-clínicos se han centrado en estudiar las consecuencias a largo plazo del pre-tratamiento con MDMA sobre la subsecuente administración de cocaína, requiriéndose más información sobre el perfil interactivo de la exposición concomitante de cocaína y MDMA. Por ello, realizamos el último estudio de esta tesis doctoral en el que evaluamos el efecto de la exposición repetida a la MDMA, la cocaína, o a ambas drogas durante la adolescencia, sobre el CPL inducido por cocaína y por MDMA. La experiencia de consumo de cualquiera de estas dos drogas, ya sea separadamente o de forma conjunta incrementó las propiedades reforzantes y la vulnerabilidad a la recaída de la MDMA, no observándose prácticamente efectos sobre el

Discusión General

CPL inducido por la cocaína. No hemos detectado un efecto mayor (en cualquier caso sería en algunos aspectos menos notable) en aquellos animales que se expusieron a ambas drogas durante la adolescencia. Inesperadamente, no obtuvimos efectos sobre la cocaína, a diferencia de lo que la mayoría de estudios han observado. Una de las posibles explicaciones a esta falta de efecto es que la dosis de MDMA empleada no induce efectos neurotóxicos a largo plazo. Si hubiéramos utilizado dosis más elevadas, claramente neurotóxicas, de MDMA es posible que hubiéramos obtenido otros resultados, ya que para muchos autores es la lesión neurotóxica la responsable de este incremento de la vulnerabilidad (Horan y cols., 2000; Fletcher y cols., 2001). Sin embargo, la ausencia de lesión neurotóxica no impide que los animales muestren una respuesta más fuerte ante la propia MDMA, aunque posiblemente el mecanismo de acción de esta droga, actuando sobre un número mayor de sistemas de neurotransmisión favorezca la aparición de este efecto.

Nuestros resultados han confirmado un gran número de las hipótesis que enunciábamos al inicio de la tesis doctoral, aunque sin embargo, no han confirmado otras. Así, hemos demostrado que la administración conjunta de MDMA y cocaína produce efectos agudos más intensos y diferentes a los producidos por cualquiera de estas drogas por separado, sobre la conducta motora, y la ansiedad medida con el LEC. Sin embargo, los efectos sobre la interacción social o la memoria han sido más intensos tras administrar exclusivamente MDMA. Sin embargo, sí que hemos confirmado que la administración conjunta de MDMA y cocaína produce efectos neuroquímicos agudos sobre la DA, la 5-HT y sus metabolitos, más intensos y diferentes a los producidos por cualquiera de estas drogas por separado.

Con respecto a la administración repetida de MDMA, cocaína, o ambas drogas durante la adolescencia, los resultados han dependido de la conducta evaluada. La exposición a la MDMA ha sido la principal responsable de los cambios a largo plazo observados en la interacción social o en la neurotoxicidad dopaminérgica, mientras que los cambios en el LEC han requerido de la administración ambas drogas.

Tal y como habíamos hipotetizado, la administración repetida de la MDMA durante la adolescencia produce una disminución en la concentración de DA, sin afectación serotoninérgica. Igualmente, la coadministración con cocaína induce diferentes efectos neuroquímicos a largo plazo, no observándose lesión neurotóxica alguna tras la exposición a ambas drogas.

También hemos confirmado que la MDMA induce CPL. El desarrollo de preferencia dependerá del procedimiento de condicionamiento empleado, ya que tras un procedimiento de condicionamiento diario que induce neurotoxicidad dopaminérgica no se observa preferencia el día de Post-C. Sin embargo, tras un condicionamiento en días alternos que no induce neurotoxicidad, si se obtiene CPL en el Post-C. También se ha confirmado nuestra hipótesis inicial sobre la capacidad de la MDMA de inducir recaída, ya que el CPL puede ser reinstaurado tras la extinción de la preferencia administrando una dosis *priming* de esta misma droga.

Sin embargo, sólo confirmamos una hipótesis de las dos que se trataron de probar en el último experimento. No hemos observado que la exposición repetida durante la adolescencia a la MDMA, la cocaína, o ambas drogas incremente los efectos reforzantes o la vulnerabilidad a la recaída de la cocaína. Sin embargo, hemos observado que esta exposición si incrementa tanto los efectos reforzantes como la vulnerabilidad a la recaída de la MDMA utilizando el procedimiento de CPL.

El consumo de drogas durante la adolescencia es un hecho muy frecuente en nuestra sociedad. Gran parte de estos jóvenes consumen habitualmente dos o más drogas, como tabaco, alcohol, cannabis, drogas de síntesis o psicoestimulantes. Los estudios básicos del policonsumo de drogas son muy escasos y la presente tesis doctoral ha pretendido estudiar una parcela muy pequeña y específica de este policonsumo. Nos hemos centrado solo en dos drogas, la MDMA y la cocaína, y los estudios han evaluado la administración simultánea de las mismas, lo que conlleva una coincidencia temporal por similares dianas de actuación. Hemos observado que este policonsumo va a modificar tanto conductual

Discusión General

como bioquímicamente los efectos que estas dos sustancias ejercen separadamente. También hemos demostrado que los cambios conductuales no tienen porque ir en paralelo a las alteraciones bioquímicas inducidas por la MDMA. Son necesarios muchos más estudios, considerando otras pautas de administración no secuencial o involucrando a otras sustancias, con el fin de ir conociendo poco a poco las complicadas interacciones que se producen entre las distintas sustancias de abuso.

Conclusiones



15. CONCLUSIONES

Estudio 1: Efectos conductuales y neurotóxicos agudos

Actividad Motora

- 1- Se observó un incremento de la actividad motora 25 minutos después de recibir 10 o 20 mg/kg de MDMA. Similares resultados se observaron en cualquiera de los grupos tratados con cocaína, sola o junto a cualquiera de las dosis de MDMA empleadas.
- 2- Todos los grupos que recibieron cocaína presentaron un incremento de la actividad motora en comparación con los que sólo fueron tratados con MDMA, que perduró 6 horas tras la administración.
- 3- La administración de la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg), sola o en combinación con cocaína, indujo el mayor incremento de la actividad motora.

LEC

- 4- Los animales que recibieron cocaína en combinación con la MDMA pasaron más tiempo en los brazos abiertos del LEC y presentaron igualmente un incremento en el porcentaje de tiempo pasado en estos brazos.
- 5- El porcentaje de entradas en los brazos abiertos del LEC fue más alto en los animales tratados con la dosis más alta de MDMA más cocaína.
- 6- Se observó un incremento en el número de entradas totales del LEC sólo en el grupo que recibió las dosis intermedia de MDMA (10 mg/kg) sola, o en combinación con cocaína.

Conclusiones

Interacción Social

- 7- Los animales tratados con la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg) presentaron una disminución del tiempo dedicado a la Investigación Social y del tiempo medio de cada encuentro (Unidad de Investigación Social), sin embargo los que recibieron la dosis de 5 mg/kg de esta misma droga presentaron resultados opuestos, mostrando un incremento tanto del tiempo empleado en contactos sociales como en la duración media de cada encuentro.
- 8- Todos los animales que recibieron cocaína presentaron un incremento en las conductas de Escape/Evitación.

Evitación Pasiva

- 9- Aunque todos los grupos tardaron más tiempo en cruzar al compartimiento oscuro en el test de retención de la evitación pasiva, en comparación con el test de adquisición, aquellos que recibieron la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg) sola o combinada con cocaína, lo hicieron significativamente antes que el resto de los grupos.

Concentración de monoaminas

- 10- Se constató un incremento en la tasa de recambio de DA (*turnover*) en el estriado en los grupos tratados con MDMA más cocaína.
- 11- La concentración de 5-HT se incrementó en el estriado y la corteza de los grupos tratados con cocaína.
- 12- La tasa de recambio de 5-HT disminuyó en el estriado y la corteza de los grupos que recibieron cocaína.

Estudio 2: Efectos conductuales y neurotóxicos a largo plazo

Interacción Social

- 1- La administración de cocaína, sola o junto a MDMA indujo una disminución del tiempo dedicado por los animales a la exploración no social.
- 2- La administración únicamente de cocaína incrementó el tiempo dedicado a la conducta de exploración desde una distancia.
- 3- La administración de MDMA incrementó el tiempo dedicado por los ratones a la interacción social, así como el tiempo medio de cada encuentro (unidad de investigación social), no modificando la cocaína este efecto.
- 4- Sólo los animales tratados con cocaína, sola o en combinación con la MDMA, presentaron conductas de amenaza.
- 5- La administración de cocaína sola indujo la aparición de conductas de evitación y huida.

Temperatura rectal

- 6- Se detectó un incremento de la temperatura en los animales tras la primera administración de la dosis alta de MDMA (20 mg/kg). Este incremento, aunque en menor medida, también se observó tras la tercera y quinta administración.
- 7- Se detectó una disminución de la temperatura en los animales tratados con cocaína y la dosis más baja de MDMA (5 mg/kg) tras la primera, segunda y tercera administración.

Conclusiones

Concentración de monoaminas

- 8- Los animales tratados únicamente con 20 mg/kg de MDMA mostraron tres semanas después una disminución en la concentración de DA en el estriado.
- 9- La administración de MDMA (sola o en combinación con cocaína) incrementó los niveles de DOPAC en el estriado.
- 10- La concentración de HVA en el estriado se incrementó en los animales tratados con MDMA más cocaína.
- 11- La administración de cocaína, sola o en combinación con MDMA, indujo un incremento en los niveles de 5-HT en el estriado, mientras que disminuyó estos niveles en el hipocampo.
- 12- Los animales tratados con MDMA más cocaína presentaron un incremento de los niveles de 5-HIAA.
- 13- Tras la administración de la dosis más alta de MDMA (20 mg/kg) se detectó una disminución de la concentración de 5-HIAA en el hipocampo.

Estudio 3: Efecto reforzante y reinstauración de la preferencia inducida por MDMA en el CPL

- 1- La MDMA es una sustancia con efectos reforzantes capaz de inducir CPL.
- 2- La MDMA es capaz de reinstaurar la preferencia una vez que esta se ha extinguido.
- 3- El CPL inducido por la MDMA depende de la pauta de condicionamiento utilizada. Si esta pauta induce una lesión dopaminérgica (condicionamiento cada 24 h) no se obtiene preferencia el día del Post-C. Sin embargo, si la pauta no

afecta a la concentración de DA (condicionamiento en días alternos) todas las dosis de MDMA estudiadas inducen preferencia.

- 4- Utilizando un protocolo de CPL con condicionamientos en días consecutivos, una vez extinguida la preferencia (observada a la 48 h de finalizar en proceso de condicionamiento) no se puede inducir reinstauración inducida por dosis *priming*.
- 5- Utilizando un protocolo de CPL con condicionamientos en días alternos, una vez extinguida la preferencia, una dosis *priming* similar o inferior a la mitad de la dosis utilizada en el condicionamiento, es capaz de inducir la reinstauración de la preferencia.

Estudio 4: Efectos de la exposición a la MDMA, la cocaína, o a ambas drogas durante la adolescencia sobre el CPL inducido por la MDMA y la cocaína

CPL inducido por la MDMA

- 1- La exposición durante la adolescencia a la MDMA, la cocaína, o a ambas drogas incrementa el efecto reforzante de la MDMA cuando los animales ya son adultos.
- 2- El tiempo necesario para extinguir la preferencia al lugar asociado con cualquiera de las dosis empleadas de MDMA, es mucho más largo en los animales que han recibido cocaína durante la adolescencia.
- 3- La exposición a la MDMA o a la cocaína (pero no ambas drogas conjuntamente) durante la adolescencia incrementa la vulnerabilidad a la reinstauración de la preferencia inducida por 10 mg/kg de MDMA.
- 4- La extinción de la preferencia tras la reinstauración es mucho más larga en los animales expuestos a la MDMA durante la adolescencia.

Conclusiones

CPL inducido por cocaína

- 5- La pre-exposición a la MDMA, la cocaína, o a ambas drogas durante la adolescencia no afecta al CPL inducido por cualquiera de las dosis de cocaína empleadas.
- 6- El tiempo necesario para extinguir la preferencia en los animales condicionados con cualquiera de las dosis de cocaína fue sustancialmente más largo en los animales tratados con MDMA durante la adolescencia.
- 7- Aunque tampoco se observa un efecto por el pre-tratamiento recibido durante la adolescencia, al estudiar la vulnerabilidad a la reinstauración de la preferencia, en el grupo condicionado con 25 mg/kg, el tiempo necesario para extinguir la preferencia tras la reinstauración con la dosis *priming* de 12,5 mg/kg, es mucho más largo en los animales pretratados con MDMA durante la adolescencia.

15.1. Conclusión general

Como se ha indicado al inicio del presente Trabajo, los consumidores de MDMA y de cocaína describen con frecuencia diferentes problemas de comportamiento, sobre todo si el consumo de estas sustancias se realiza durante la adolescencia, un periodo de una gran vulnerabilidad biológica a las propiedades adictivas de las drogas en general y de los psicoestimulantes en particular.

Las hipótesis descritas en la presente Tesis Doctoral planteaban la posibilidad de que el consumo combinado de la MDMA y la cocaína podría provocar alteraciones comportamentales y/o neuroquímicas más intensas que las que podrían producir ambas drogas por separado, sobre todo teniendo en cuenta el periodo en el que se iban a administrar. Además apuntábamos la posibilidad de que la administración combinada (MDMA y cocaína) produjese cambios a largo plazo, en la edad adulta, lo cual también nos podría confirmar que este periodo es crítico en la vulnerabilidad en la adicción a las drogas. Hay que indicar que en general los resultados que hemos obtenido en los diversos estudios realizados nos confirman esta hipótesis inicial.

Los efectos psicoestimulantes de los animales que han recibido ambas drogas (MDMA y cocaína) son más potentes que la administración por separado, y además presentan un claro efecto ansiolítico que no se observa cuando se administran cualquiera de estas drogas por separado. Es posible que, tras la exposición conjunta de estas dos drogas se haya producido una liberación masiva de DA, dando lugar a una eliminación inmediata de este neurotransmisor a través de la formación de DOPAC. En contraste, el aumento de la concentración de 5-HT y un decremento en la formación del 5-HIAA reflejan quizás una interacción entre los efectos de ambas drogas, resultando en un aumento de la liberación de 5-HT junto con una inhibición de su metabolismo, resultando por tanto un efecto activador de la conducta junto con un efecto ansiolítico.

Conclusiones

Igualmente la exposición conjunta de ambas sustancias durante la adolescencia induce alteraciones de conducta y neuroquímicas que perduran en la edad adulta. La cocaína disminuye la respuesta hipertérmica inducida por la MDMA e igualmente bloquea los efectos a largo plazo, que sobre la interacción social (incremento), induce la administración de MDMA. La administración de cocaína previene la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por dosis altas de MDMA. Este efecto bioquímico podría ser el responsable, al menos parcialmente, del diferente perfil conductual observado en los animales que reciben ambas droga. Por lo tanto, la administración conjunta de estas drogas va a producir cambios conductuales y bioquímicos a largo plazo diferentes a aquellos observados tras la administración individual.

Hemos podido observar como la MDMA es capaz de reinstaurar el CPL tras un periodo de extinción, estando estos procesos (expresión, extinción y reinstauración) modulados por la neurotoxicidad dopaminérgica, tal y como habíamos sugerido en nuestras hipótesis iniciales. Por último también hemos podido apreciar como la experiencia previa de MDMA y de cocaína afecta a los procesos implicados en el CPL inducido por la MDMA. Hemos observado que la experiencia previa de ambas drogas (durante la adolescencia) incrementa los efectos reforzantes de la MDMA en la edad adulta, sin embargo solo hemos podido apreciar una mayor vulnerabilidad a la recaída tras la exposición previa a estas drogas por separado.

En general los resultados obtenidos nos pueden ayudar a comprender mejor la neurobiología del consumo de diferentes drogas y más concretamente de la MDMA y de la cocaína. Además la edad y el poliabuso, es una aproximación experimental determinante, para entender mejor los cambios comportamentales y los sustratos neurobiológicos que podrían subyacer en el proceso y desarrollo de la adicción a las drogas.

A N E X O S



ANEXO I



Acute behavioural and neurotoxic effects of MDMA plus cocaine in adolescent mice

M. Daza-Losada^a, M. Rodríguez-Arias^a, C. Maldonado^a, M.A. Aguilar^a, C. Guerri^b, J. Miñarro^{a,*}^a Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad de Valencia, Valencia, 46100, Spain^b Department of Cellular Pathology, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Avda. Autopista del Saler, 16, 46013-Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2008

Received in revised form 23 July 2008

Accepted 23 July 2008

Available online 27 July 2008

Keywords:

Elevated plus maze

Social behaviour

Dopamine

Serotonin

Mice

MDMA

Cocaine

ABSTRACT

The poly-drug pattern is the most common among those observed in MDMA users, with cocaine being a frequently associated drug. This study evaluates the acute effects of MDMA (5, 10 and 20 mg/kg), alone or in combination with cocaine (25 mg/kg), on motor activity, anxiety (elevated plus maze and social interaction test), memory and brain monoamines in adolescent mice. Both drugs, administered alone or concurrently, produced hyperactivity and a decrease in social contacts. However, an anxiolytic effect, studied by means of the elevated plus maze and expressed as an increase in the time spent on the open arms, was observed only in those animals treated with cocaine and MDMA. The passive avoidance task was affected only with the highest MDMA dose (20 mg/kg). Mice treated with MDMA did not present significant changes in brain monoamines, while those receiving MDMA and cocaine showed a decrease in DA in the striatum, which was accompanied by an increase in the serotonin concentration in the striatum and cortex 30 min after acute administration. In conclusion, the combined use of MDMA and cocaine produces a predominance of serotonin over DA, which is associated with an anxiolytic profile, defensive behaviours and fewer social contacts.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

MDMA (3,4-methylene-dioxy-methamphetamine), commonly known as ecstasy, is an illicit recreational drug consumed by many teenagers and young adults. Ecstasy users are more likely to take other drugs than non-users [62]. In particular, cocaine is reported as being used by 43.8% of MDMA users [73,78]. Ecstasy poly-drug users report significantly pronounced problems, such as anxiety, obsessive-compulsive behaviour, psychoticism, somatisation, deficits in memory updating and impairment of social and emotional judgment processes [42,56,58].

Although many studies have been carried out with rodents regarding the behavioural and neurochemical effects of MDMA use, very few have evaluated the effects of MDMA-poly-drug use. While preclinical studies have focused on the long-term consequences of MDMA pre-treatment on subsequent cocaine administration [12,31], hardly any have examined the interactive profile of concomitant exposure to MDMA and cocaine. Only recently have the effects of concurrent administration of MDMA and cocaine on CPP in adult rats been evaluated [19]. In this study, both drugs induced CPP when administered alone. Co-administration, on the other hand, produced an antagonism, except when higher doses were employed. These results highlight that the neurochemical and behavioural effects of MDMA and cocaine when consumed separately are dramatically altered when taken together.

The adolescent phase is associated with an increased risk of drug abuse and drug-related problems [16], since it is a unique ontogenetic period during which the brain continues to be plastic, thanks to the neuroanatomical, neurochemical and neurophysiological processes that characterise it. Similarly, periadolescent rodents present a characteristic behavioural profile and are highly sensitive to the administration of psychostimulant agents [34,69,71,72]. Thus, these animals are considered a useful model for the study of the risk factors associated with vulnerability to behavioural disorders in human adolescents [34].

The aim of the present work was to evaluate the acute effect of administration of MDMA plus cocaine on a variety of behavioural parameters, and to observe the neurochemical changes caused by the combined consumption of these drugs in different brain structures. The acute effects of MDMA, cocaine or both drugs on spontaneous motor activity, the elevated plus maze, a social interaction test and the passive avoidance task were evaluated in adolescent mice. Similarly, the concentration of brain monoamines in the striatum, cortex and hippocampus was determined 30 min after drug administration.

2. Methods

2.1. Subjects

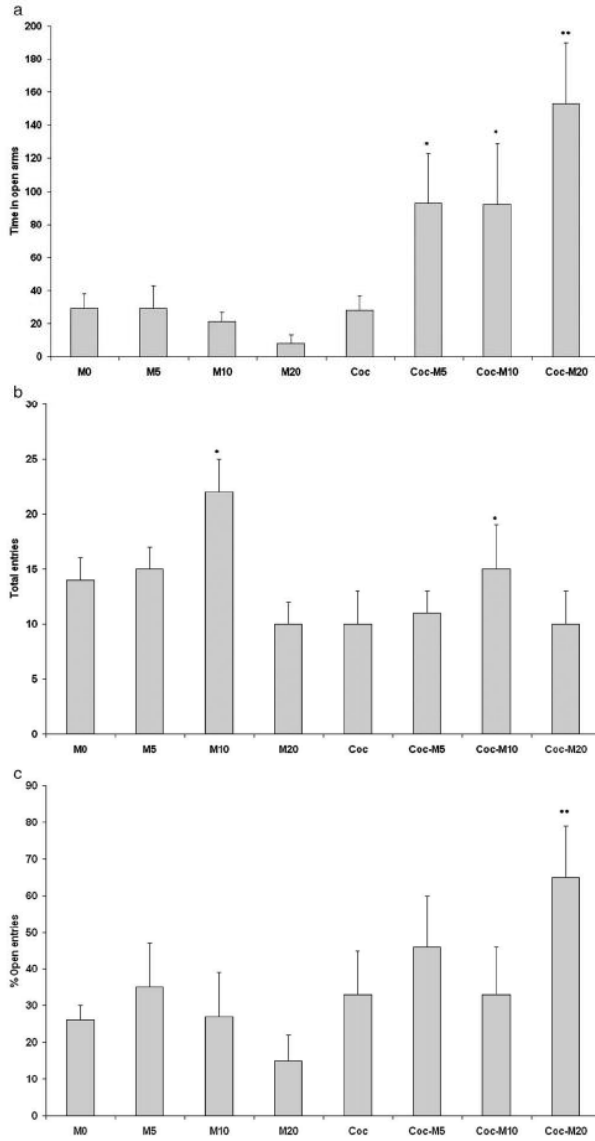
A total of 397 male mice of the OF1 strain (Charles River, Barcelona, Spain) were employed in the study: 315 as experimental subjects and the remainder as standard opponents. The mice were 21 days old on arrival at the laboratory, and were all housed under standard conditions in groups of four (cage size 28×28×14.5 cm), at a constant temperature (21±2 °C), with a reversed light schedule (white lights on

* Corresponding author. Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad de Valencia, Avda. Blasco Ibañeta 21, 46100, Valencia, Spain. Tel.: +34 96 386 4020; fax: +34 96 386 4668.
E-mail address: jose.minarro@uv.es (J. Miñarro).

ANEXO I

50

M. Daza-Losada et al. / Neurotoxicology and Teratology 31 (2009) 49–59



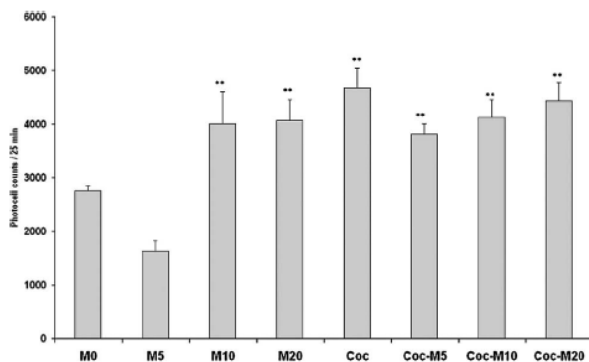


Fig. 2. Means (\pm S.E.M.) of locomotor activity 25 min after drug administration for adolescent mice treated with saline M0 ($n=8$); 5, 10 or 20 mg/kg of MDMA, M5 ($n=10$), M10 ($n=8$) or M20 ($n=8$); 25 mg/kg of cocaine, Coc ($n=8$); or 25 mg/kg of cocaine plus one of the MDMA doses, Coc-M5 ($n=8$), Coc-M10 ($n=8$) or Coc-M20 ($n=8$). ** $p<0.01$ differences with respect to M0 and M5.

19:30–07:30 h), and food and water available ad libitum (except during the behavioural test). All procedures involving the mice and their care complied with national, regional and local laws and regulations, and with European Community Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

2.2. Drug treatment and experimental design

Animals were injected i.p. with volumes of 0.01 ml/g cocaine chlorhydrate (Laboratorios Alcaliber S. A. Madrid) and MDMA (\pm 3,4-methylenedioxyamphetamine hydrochloride, Laboratorios Sigma–Aldrich, Spain). Control groups were injected with physiological saline (NaCl 0.9%), which was also used for dissolving the drugs. For the combined groups, cocaine and MDMA were administered in two separate injections.

On postnatal day (PD) 28, following a period of adaptation to the laboratory (7 days), adolescent animals were injected with saline (M0), 5, 10 or 20 mg/kg of MDMA (M5, M10 or M20), 25 mg/kg of cocaine (Coc) or 25 mg/kg of cocaine plus one of the MDMA doses (Coc-M5, Coc-M10 or Coc-M20). The behavioural test began 25 min later, except for that of locomotor activity, which was measured immediately after drug administration. A further set of animals was used for the determination of brain monoamines. Drug doses were chosen on the basis of studies previously performed with the same strain of mice. All three MDMA doses induced conditioned place preference [18] and affected several measures of anxiety [50,51]. The dose of cocaine altered social behaviour and induced long-lasting effects after exposure during gestation or adolescence [22–24].

2.3. Procedure and apparatus

2.3.1. Elevated plus maze

The EPM consisted of two open arms ($30\times 5\times 0.25$ cm) and two enclosed arms ($30\times 5\times 15$ cm). The junction of the four arms formed a central platform (5×5 cm). The floor of the maze was made of black Plexiglas, and the walls of the enclosed arms of clear Plexiglas. The open

arms had a small edge (0.25 cm) to provide additional grip for the animals. The entire apparatus was elevated 45 cm above floor level. In order to facilitate adaptation, mice were transported to the dimly illuminated laboratory 1 h prior to testing. At the beginning of each trial, subjects were placed on the central platform so that they were facing an open arm, and were allowed to explore for 5 min. The maze was thoroughly cleaned with a damp cloth after each trial. The behaviour displayed by the mice was videorecorded and later analyzed by a 'blind' observer using a computerized method. The measurements recorded during the test period were frequency of entries and time and percentage of time spent in each section of the apparatus (open arms, closed arms, central platform). An arm was considered to have been visited when the animal placed all four paws on it. Number of open arm entries, time spent in open arms and percentage of open arm entries are generally used to characterise the anxiolytic effects of drugs [57,61].

2.3.2. Spontaneous motor activity

Spontaneous locomotor activity was automatically measured by an actimeter (Cibertec S.A., Spain) consisting of eight cages ($33\times 15\times 13$ cm), each with eight infrared lights located in a frame around the cage. Beams were placed 2 cm apart, and were positioned on the horizontal axis at a height just above the bottom of the cage (body level of mice). The different frames were separated from each other by 4 cm and, since they were opaque, prevented animals from seeing conspecifics. Spontaneous motor activity was recorded for 6 h, beginning immediately after administration of the drug.

2.3.3. Social interaction test

This test consisted of confronting an experimental animal and a standard opponent in a neutral cage ($61\times 30.5\times 36$ cm) for 10 min following 1 min of adaptation prior to the encounter. Standard opponents were rendered temporarily anosmic by intranasal lavage with a 4% zinc sulfate solution 1 day before testing [67]. This kind of mouse induces an attack reaction in its opponent but does not outwardly provoke or defend itself, since it cannot perceive a pheromone that is present in the urine of the experimental animals and functions

Fig. 1. Effects of acute MDMA and cocaine administration on adolescent mice in the EPM. Animals were divided into the following groups according to treatment: saline M0 ($n=10$); 5, 10 or 20 mg/kg of MDMA, M5 ($n=14$), M10 ($n=10$) or M20 ($n=10$); 25 mg/kg of cocaine, Coc ($n=10$); or 25 mg/kg of cocaine plus one of the MDMA doses, Coc-M5 ($n=12$), Coc-M10 ($n=10$) or Coc-M20 ($n=11$). Data are presented as mean values \pm S.E.M. For the figure a) (Time in open arms) * $p<0.05$; ** $p<0.001$ differences with the rest of the groups. For the figure b) (Total entries) * $p<0.05$ differences with respect M20 and Coc-M20. For the figure c) (% of Open entries) ** $p<0.01$ differences with respect M20.

ANEXO I

as a cue for eliciting aggressive behaviour in mice with a normal sense of smell [11,49]. Behaviour was videotaped under white illumination. The videotapes were analyzed using a custom-developed programme [12] that facilitates estimation of times allocated to different broad functional categories of behaviour – non-social exploration, social investigation, threat, attack and avoidance/flee – each of which is characterised by a series of different postures and elements. A more detailed description can be found in Rodríguez-Arias et al. [63].

2.3.4. Passive avoidance test

For the passive avoidance test, a step-through inhibitory avoidance apparatus for mice (Ugo Basile, Comerio-Varese, Italy) was employed.

This cage is made of Perspex sheets and divided into two compartments (15 cm × 9.5 cm × 16.5 cm each one). The safe compartment is white and illuminated by a light fixture (10 W) fastened to the cage lid, whereas the “shock” compartment is dark and made of black Perspex panels. The two compartments are divided by an automatically operated sliding door at floor level. The floor is made of 48 stainless steel bars with a diameter of 0.7 mm and situated 8 mm apart.

Passive avoidance tests were carried out essentially following the procedure described in Aguilar et al. [3]. On the day of training, each mouse was placed in the illuminated compartment facing away from the dark compartment. After a 60 s period of habituation, the door leading to the dark compartment was opened. When the animal had

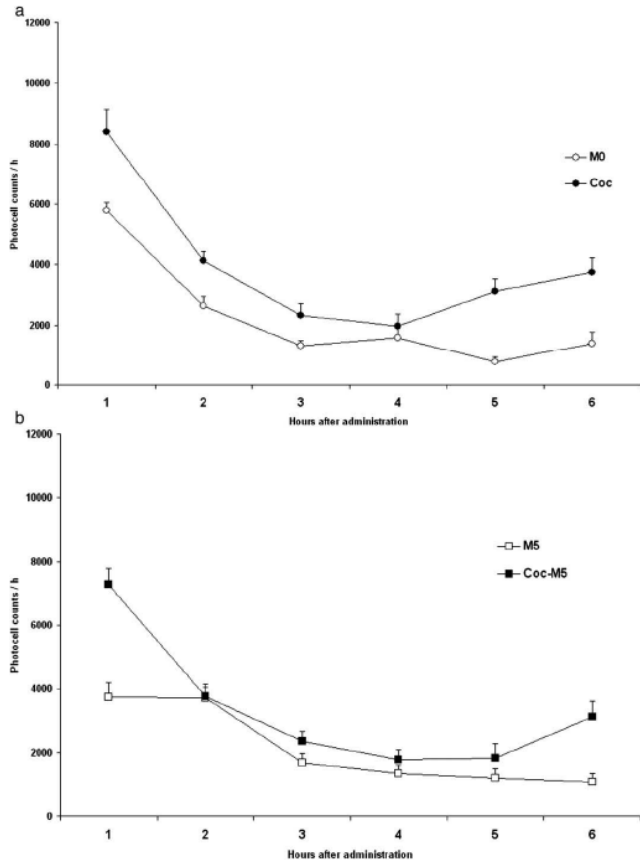


Fig. 3. Means (\pm S.E.M.) of locomotor activity over 6 h for adolescent mice treated with: a) saline M0 (n=8) or 25 mg/kg of cocaine, Coc (n=8); b) 5 mg/kg of MDMA alone, M5 (n=10) or plus 25 mg/kg of cocaine Coc-M5 (n=8); c) 10 mg/kg of MDMA alone M10 (n=8) or plus 25 mg/kg of cocaine Coc-M10 (n=8); d) 20 mg/kg of MDMA alone M20 (n=8) or plus 25 mg/kg of cocaine Coc-M20 (n=8).

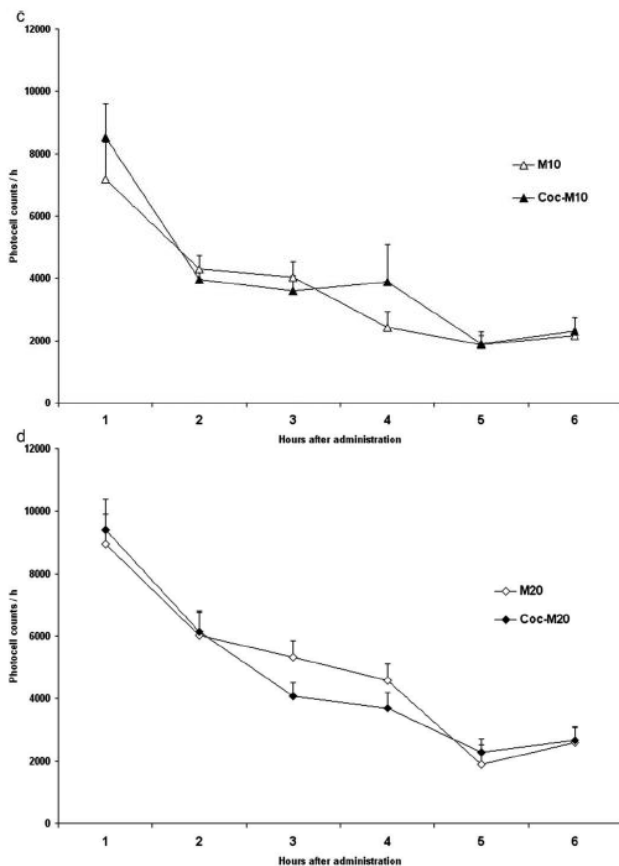


Fig. 3 (continued).

placed all four paws in the dark compartment a footshock (0.5 mA, 3 s) was delivered and the animal was immediately removed from the apparatus and returned to its home cage. The time taken to enter the dark compartment (step-through latency) was recorded. Retention was tested 24 h later following the same procedure but without the shock. The maximum step-through latency was 300 s.

2.3.5. Analysis of biogenic amines

Twenty five minutes after the acute injection mice were sacrificed by cervical fracture and a procedure similar to that described in Daza-Losada et al. [18] was followed. Within 2 min, the brains were removed and placed on an ice-cold plate. The striatum, cortex (including frontal cortex) and hippocampus were removed [28], frozen on dry ice and

stored at -80°C . The tissue was thawed, weighed and then homogenized in 200 μl of perchloric acid (0.1 N) using ultrasounds. The homogenate was centrifuged at 14,000 rpm for 30 min. The supernatant was divided into aliquots for the analysis of biogenic amines. Dopamine (DA), dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) were analyzed in a high performance liquid chromatograph (Agilent 1100 series HPLC). Samples were applied to a column (5 μm , 12.5 cm, 4.6 cm; Agilent Zorbax High Pressure Cartridge Guard-column). An isocratic mobile phase consisting of 0.10 M chloroacetic acid, 0.70 mM EDTA and 1.0 mM sodium octylsulphate (pH 3.25) in 14% methanol was passed through the column at a constant flow of 1 ml/min. The column was maintained at 21°C . Analytes were oxidized

on a glassy carbon electrode maintained at 300 mV (450 mV for HVA detection) against a Ag/AgCl reference electrode (BAS). The complete separation of biogenic amines was achieved in 25 min. Data were collected and analyzed using the Merck-Hitachi software package (Model D-7000). Levels of 5-HT and 5-HIAA were analyzed in the striatum, cortex and hippocampus. In addition, levels of DA, DOPAC and HVA were analyzed in the striatum.

2.4. Statistical analyses

Data relating to social interaction, the elevated plus maze and monoamines in each of the brain structures studied were analyzed by two-way ANOVA (treatment with cocaine × dose of MDMA). The first between variable – treatment with cocaine – had two levels: saline (M0, M5, M10 and M20) and cocaine (Coc, Coc-M5, Coc-M10 and Coc-M20). The second between variable – dose of MDMA employed – had four levels: 0 (M0 and Coc), 5 (M5 and Coc-M5), 10 (M10 and Coc-M10) and 20 mg/kg (M20 and Coc-M20). Motor activity and the passive avoidance test were analyzed by three-way ANOVA, with the two between variables mentioned above and one within variable (recording time: six levels for motor activity and two levels for passive avoidance). Further comparisons were performed using Newman–Keuls post-hoc tests or simple effects. All results are expressed as mean ± S.E.M.

3. Results

3.1. Plus maze

EPM data (Fig. 1) revealed that more time was spent in the open arms by animals treated with cocaine and MDMA (Coc-M5, Coc-M10 and Coc-M20) than those in the other groups ($p < 0.05$ for Coc-M5 and Coc-M10 and $p < 0.001$ for Coc-M20). The percentage of open entries [$F(3,72) = 2.597$; $p < 0.05$] was highest in the group treated with cocaine and the highest MDMA dose (Coc-M20) ($p < 0.05$). The number of total entries [$F(3,78) = 2.948$; $p < 0.03$] was higher in mice treated with 10 mg/kg of MDMA, either alone (M10) or with cocaine (Coc-M10), than in those receiving the highest dose ($p < 0.05$).

3.2. Motor activity

The ANOVA performed on motor activity 25 min after drug administration (Fig. 2) revealed that the groups treated with 10 and 20 mg/kg of MDMA and those receiving cocaine alone or plus any of the MDMA doses presented higher motor activity than those treated with only saline or 5 mg/kg of MDMA ($p < 0.01$).

The ANOVA performed over the 6 h following drug administration (Fig. 3) revealed that, when considered as a whole [$F(1,50) = 8.686$; $p < 0.004$], the four groups treated with cocaine exhibited greater activity than those treated only with MDMA ($p < 0.01$). On the other hand, mice receiving 20 mg/kg of MDMA alone (M20) or with cocaine (Coc-M20) [$F(3,50) = 12.022$; $p < 0.0001$] displayed greater activity than the rest of the groups ($p < 0.05$ with respect to M10 and Coc-M10 and $p < 0.01$ for the rest).

In general, all animals were more active during the first 2 h of recording [$F(5,250) = 122.254$; $p < 0.0001$], but mice treated with cocaine [$F(5,250) = 3.811$; $p < 0.002$], alone or with MDMA, were more active during the first ($p < 0.004$), fifth ($p < 0.01$) and sixth ($p < 0.002$) hours of recording. However, in the groups receiving the highest MDMA dose (M20 and Coc-M20), a greater increase in activity was induced in the first 4 h ($p < 0.01$).

3.3. Social interaction test

The data for the different types of behaviour evaluated in the social interaction test are presented in Table 1. Less time was spent in Social Investigation by mice receiving the highest MDMA dose (M20 and Coc-M20) than those administered with the other MDMA doses or only with cocaine, but only the M20 group showed a significant difference with respect to its saline control group (M0) ($p < 0.05$). Conversely, mice in the M5 group spent more time engaged in this behaviour than animals in the other MDMA-treated groups ($p < 0.01$ with respect to M20 and $p < 0.05$ with respect to M0 and M10). Similar results were obtained analyzing the mean time spent in each contact (Unit of Social Investigation), which was lower among animals receiving the highest MDMA dose (M20 and Coc-M20) ($p < 0.05$) but higher among those receiving 5 mg/kg (M5) ($p < 0.01$).

Values for Explore from a Distance were higher in all the cocaine-treated animals ($p < 0.01$), and in those treated with 10 mg/kg of MDMA (M10) ($p < 0.01$). Non-Social Exploration, a behaviour heavily influenced by motor activity, was undermined in all mice injected with 5 (M5 and Coc-M5) and 10 mg/kg (M10 and Coc-M10) of MDMA ($p < 0.05$). Avoidance/Flee behaviours were more pronounced in the four groups of animals treated with cocaine ($p < 0.05$), but no specific group effect was obtained.

3.4. Passive avoidance

Results from the passive avoidance tests are represented in Fig. 4. The ANOVA revealed that, although all groups presented longer step-through latencies in the test session than in the training session ($p < 0.01$), those treated with 20 mg/kg of MDMA (M20 and Coc-M20) took less time to enter the dark compartment than the rest of the groups ($p < 0.01$). There were a number of animals that did not cross to the dark compartment during the training session after receiving the treatment and were, therefore, not used for the test 24 h later: M0, 0 mice; M5, 2 mice; M10, 4 mice; M20, 4 mice; Coc, 0 mice; Coc-M5, 2 mice; Coc-M10, 5 mice; and Coc-M20, 5 mice.

3.5. Monoamine concentration

Data regarding brain monoamine concentrations are presented in Table 2. The DA levels in the striatum [$F(1,74) = 6.234$; $p < 0.01$] were lower in the cocaine-treated groups when considered as a whole than in those receiving only MDMA ($p < 0.05$). Conversely, DOPAC concentration [$F(3,72) = 17.007$; $p < 0.0001$] was higher in the Coc-M5, Coc-M10 and Coc-M20 groups ($p < 0.01$). In addition, the highest MDMA dose, when administered alone (M20), led to a significantly lower

Table 1
Means of accumulated times (in seconds) with S.E.M. allocated to different categories of spontaneous behaviour from the social interaction test in adolescent mice divided into the following groups: saline M0 (n=10); 5, 10 or 20 mg/kg of MDMA, M5 (n=10), M10 (n=10) or M20 (n=10); 25 mg/kg of cocaine, Coc (n=10); or 25 mg/kg of cocaine plus one of the MDMA doses, Coc-M5 (n=10), Coc-M10 (n=10) or Coc-M20 (n=12)

	M0	M5	M10	M20	Coc	Coc-M5	Coc-M10	Coc-M20
Non-social exploration	460±14	366±39	421±32	506±12	487±10	448±24	374±45	509±19
Explore from a distance	18±2	25±7	52±14**	56±92	44±7**	64±10**	89±23**	50±9**
Social investigation	98±15	198±43*	77±28	12±2*	50±6	65±24	60±19	35±15
Unit of social investigation	4.4±0.8	10±21**	3.5±1	0.8±0.2*	3.7±0.4	3.4±0.7	3.5±0.91	1.8±0.5*
Avoidance/flee	0.8±0.6	0.1±0.1	2.3±2	1.6±1.1	1.8±0.8	5±1.8	3.4±0.9	2±1

Differences from controls (M0) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

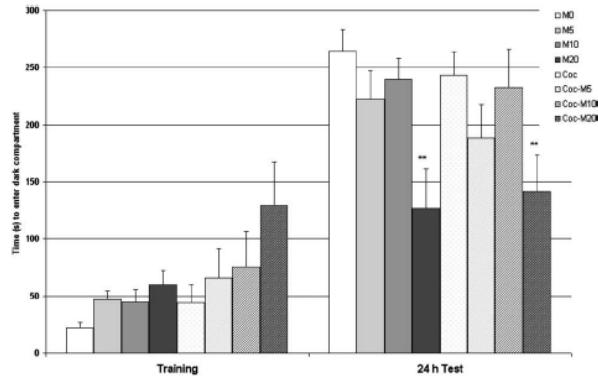


Fig. 4. Effects of acute MDMA and cocaine administration on the time taken by adolescent mice to enter the dark compartment in the training and test sessions (24h after training) of the passive avoidance test. Mice were treated with saline M0 (n=10), 5, 10 or 20 mg/kg of MDMA, M5 (n=10), M10 (n=10) or M20 (n=10), 25 mg/kg of cocaine, Coc (n=10), or 25 mg/kg of cocaine plus one of the MDMA doses, Coc-M5 (n=12), Coc-M10 (n=10) or Coc-M20 (n=11). Data are presented as mean values \pm S.E.M. Differences from the other groups in the test session ***p*<0.01.

DOPAC concentration than that observed in the groups receiving lower doses of MDMA (*p*<0.5 with respect to M10 and *p*<0.01 with respect to M0 and M5). As a whole, the concentration of HVA [*F*(1,70)=4.308; *p*<0.04] was also higher in the groups treated with cocaine (*p*<0.05). In accordance with the results previously mentioned, dopamine turnover (DOPAC/DA) [*F*(3,72)=7.487; *p*<0.0002] was greater in the groups treated with cocaine plus MDMA (*p*<0.05 for Coc-M5 and Coc-M20 and *p*<0.01 for Coc-M10). HVA/DA turnover was also higher [*F*(1,74)=7.036; *p*<0.009] in all the cocaine-treated groups (*p*<0.01).

In general, serotonin concentration in the striatum [*F*(1,70)=11.159; *p*<0.001] was higher in the groups treated with cocaine (*p*<0.01). Comparable results were observed in the cortex [*F*(1,57)=229.857; *p*<0.0001], with higher serotonin levels being detected only in the groups treated with cocaine plus MDMA (*p*<0.01). In the striatum, a decrease in the concentration of 5-HIAA [*F*(1,72)=5.625; *p*<0.02]

was observed collectively in the groups treated with cocaine (*p*<0.05), and was accompanied by a lower serotonin turnover (5-HIAA/5-HT) [*F*(1,70)=12.267; *p*<0.0008] in these groups (*p*<0.01). Likewise, the concentration of 5-HIAA in the cortex [*F*(1,63)=44.018; *p*<0.0001] was lower after treatment with cocaine (*p*<0.01), and was accompanied by a lower serotonin turnover [*F*(3,64)=6.288; *p*<0.0008] only in the case of the cocaine plus MDMA-treated groups (*p*<0.01).

No changes were observed in the concentration of serotonin or its metabolite in the hippocampus.

4. Discussion

This study attempts to throw further light on the behavioural and neurochemical effects of MDMA and cocaine co-administration through the use of a mouse model. The results reveal that the

Table 2

Effects of acute MDMA and cocaine administration on the concentrations of brain monoamines (ng/mg tissue) in the striatum, frontal cortex and hippocampus of adolescent mice divided into the following groups: saline M0 (n=10); 5, 10 or 20 mg/kg of MDMA, M5 (n=10), M10 (n=10) or M20 (n=10); 25 mg/kg of cocaine, Coc (n=10); or 25 mg/kg of cocaine plus one of the MDMA doses, Coc-M5 (n=10), Coc-M10 (n=11) or Coc-M20 (n=11)

	M0	M5	M10	M20	Coc	Coc-M5	Coc-M10	Coc-M20
Striatum								
DA	8072±630	9573±930	8764±455	8061±362	8522±574	7352±598	7597±516	7086±505
DOPAC	1390±125	1409±80	1272±64	1002±21**	1541±90	1844±96**	2298±33**	2129±120**
HVA	301±32	286±21	416±59	392±12	454±31	308±32	423±36	405±26
DOPAC/DA	0.190±0.03	0.155±0.01	0.149±0.01	0.126±0.006	0.182±0.004	0.270±0.03*	0.235±0.03**	0.235±0.03*
HVA/DA	0.039±0.001	0.031±0.001	0.048±0.001	0.049±0.001	0.053±0.001	0.041±0.001	0.058±0.01	0.062±0.01
5-HT	379±59	378±65	390±14	376±39	440±20	426±29	468±18	541±28
5-HIAA	465±112	526±31	435±21	423±7	461±24	432±40	423±15	376±12
5-HIAA/5-HT	1.40±0.17	1.4±0.3	1.121±0.06	1.316±0.23	1.070±0.08	1.001±0.05	0.916±0.05	0.785±0.06
Cortex								
5-HT	140±13	131±11	131±10	144±9	119±10	210±13**	444±17**	452±29**
5-HIAA	78±10	67±4	72±4	71±7	51±4	36±4	43±4	48±7
5-HIAA/5-HT	0.573±0.07	0.542±0.05	0.567±0.04	0.498±0.04	0.466±0.05	0.154±0.01**	0.099±0.01**	0.114±0.01**
Hippocampus								
5-HT	288±41	203±12	258±7	242±7	226±7	225±9	243±6	266±38
5-HIAA	131±36	94±6	103±5	121±9	122±1	105±5	97±3	75±4
5-HIAA/5-HT	0.519±0.13	0.467±0.02	0.404±0.02	0.499±0.03	0.530±0.01	0.478±0.03	0.404±0.02	0.318±0.03

Data are presented as mean values \pm S.E.M. Differences from their respective controls **p*<0.05; ***p*<0.01.

behavioural and neurochemical effects of MDMA are affected when cocaine is co-administered. In adolescent mice, only the highest MDMA dose induced behavioural effects, with a reduction in social contacts, an increase in motor activity and an impairment of the passive avoidance task. However, animals treated with cocaine and MDMA presented a marked anxiolytic profile in the EPM, displaying an evident social withdrawal in the social interaction test, an increase in avoidance and flee behaviours, and long-lasting hyperactivity. Although MDMA alone did not exert an effect on brain monoamines, co-administration of the two drugs slightly reduced DA concentration in the striatum and produced increases of DOPAC and HVA, all of which reflected an increase in DA turnover. Converse results were obtained in the case of serotonin, which increased in the striatum and cortex with a parallel decrease in 5-HIAA in the same structures, indicating a decrease in serotonin turnover.

Although numerous studies have indicated that MDMA causes anxiety problems in drug users (for review see [8]), our results reveal that MDMA alone does not exert a strong effect on the level of anxiety in adolescent mice. A tendency towards an anxiogenic action was observed only with the highest dose of MDMA (20 mg/kg), which produced a decrease in the time spent in the open arms of the maze. The few studies performed in the EPM with mice have shown that acute MDMA administration induces anxiogenic or anxiolytic effects, depending on the dose employed. Navarro et al. [51] observed an anxiogenic effect with an intermediate dose of the drug (8 mg/kg), while they found no action with higher (15 mg/kg) or lower (1 mg/kg) doses. On the other hand, Lin and co-workers [35] obtained a paradoxical dose-dependent response. At low doses (4 mg/kg), an anxiogenic action with hyperactivity was observed, while higher doses (20 mg/kg) induced anxiolysis. Anxiogenic- or anxiolytic-like effects of MDMA in the EPM have been also observed in rats [9,30,54]. All these studies have been performed in adult animals and, although adolescent mice do not exhibit a particular behaviour in the EPM [29], an altered sensitivity to the administration of psychostimulant agents has been described at this age [1,34,66]. Adolescent animals seem to be more "protected" from adverse psychostimulant-related properties [34], and the small changes observed in our study (a slight anxiogenic effect with the highest dose) concur with this theory.

All the available studies agree that acute cocaine administration induces an anxiogenic effect in adult mice and rats [20,79], while in the present study cocaine did not affect the behaviours studied in the EPM. Adolescent rats have proved less susceptible to cocaine-conditioned taste aversion [66], thereby sustaining the notion that the aversive effects of drugs of abuse are diminished during adolescence. On the contrary, when MDMA and cocaine were administered together, a powerful anxiolytic effect was observed. Mice treated with both drugs spent more time in the open arms and presented a higher percentage of entries and time spent in the open arms. The number of total entries increased only in the groups treated with the intermediate dose of MDMA (M10 and Coc-M10), suggesting that the motor effect is not the main cause of the anxiolytic response observed after concomitant administration of the two drugs.

Although MDMA appears to increase human social contacts and induces a strong desire for company and conversation [76], it can also induce generalised anxiety and panic attacks [40,68,76,77]. After a single exposure to the highest dose of MDMA, substantially fewer social contacts and a decrease in the mean time of each contact was observed in the mice; effects that were not entirely counteracted by cocaine co-administration. However, the lowest MDMA dose induced contrary results, increasing the time spent and the mean time of each encounter, an effect that cocaine blocked. Although the anxiogenic effect after acute MDMA administration has been repeatedly described in adult mice [51,39], an anxiolytic, prosocial effect has been observed in rats [44,45]. On the other hand, and in accordance with previous studies in adult mice, cocaine exhibited an anxiogenic profile in the social interaction test [22,45]. Co-administration of both drugs induced

what was essentially a cocaine-like behavioural profile, with reduction in social contacts, longer periods of time spent exploring from a distance, lower mean time employed in each encounter, and an increase in avoidance and flee behaviours, which are effects commonly observed in adult mice that have received cocaine [22,24,36].

Our results show that MDMA and cocaine co-administration induces an anxiolytic profile in the EPM but an anxiogenic effect in the social interaction test. We have previously reported similar results when studying the long-lasting consequences of cocaine administration [24]. Mice exposed to cocaine during adolescence showed a decrease in social contacts but spent more time in the open arms of the EPM when they were observed 2 weeks later. These procedures evaluate anxiety from different perspectives, during an ethological aversive task which measures general anxiety (EPM), or in the presence of a conspecific partner (social interaction test). With respect to MDMA, former studies have suggested that this drug exerts a dual effect on anxiety that varies depending on the dose, species and method employed [9,17,35,39,44,45,50,51]. The present study suggests that concurrent MDMA and cocaine administration creates a bimodal behavioural profile that confirms that MDMA is capable of activating both the excitatory and inhibitory neural mechanisms that control anxiety [35].

The increase in spontaneous motor activity produced by MDMA and cocaine in adult [4,5,38] and adolescent rodents [33] is corroborated by the present results. The hyperactivity induced by cocaine is due principally to its blockade of DAT (for review see [75]), while that of MDMA may have dopaminergic and serotonergic components, involving D1, D2 and 5-HT2 receptors (for review see [25]). Motor activity measured 25 min after drug administration showed that all the groups, except for those treated with saline and 5 mg/kg of MDMA, presented an increase in motor activity at the moment of the behavioural test. However, no corresponding increases were observed in the number of total entries or the time employed in non-social exploration, both of which are typical measures of motor activity in the EPM and social interaction test, respectively. We have previously reported this lack of concordance when evaluating long-lasting effects in animals receiving daily doses of cocaine; the spontaneous motor activity of these animals 2 weeks after treatment was greater, but no increase was observed in the number of total entries in the EPM or in the time spent in non-social exploration [24]. In these tests, motor activity is measured in various circumstances – a stressful situation (EPM), a conspecific confrontation (social interaction), or a new arena (spontaneous motor activity) – which makes it difficult to compare the results obtained. On the other hand, the specific effects that we have observed in the EPM and the social interaction test after co-administration of both drugs are not attributable purely to higher motor activity, which was also observed in the groups treated with MDMA alone. An exception can be made for the specific anxiolytic effect in the social interaction test, produced by the lowest MDMA dose when administered alone, since this was the only group in which hyperactivity was not induced.

Memory deficits are reported in "ecstasy" users, and have been correlated with the extent of "ecstasy" exposure [10,43,34,55]. Acute administration of MDMA before the acquisition trial of a passive avoidance learning task was reported to impair retention 24 h later [6,47]. However, there are contradictory results that suggest that rats are not affected in any way by repeated MDMA administration [41], prenatal exposure [70], or treatment with a neurotoxic MDMA regimen [74]. In all our animals, the step-through latency to enter the dark compartment was significantly longer in the 24 h test, showing that they recalled the training session. However, treatment with the higher dose of MDMA (20 mg/kg), alone or plus cocaine, produced a much lower measure, suggesting that administration of the drug prior to a training session impairs memory or conditioned learning of the animals. Indeed, co-treatment with the highest MDMA dose and cocaine impaired the training performance. It can be argued

that impairment of the training session affected the results obtained 24 h later; however, these mice, although taking longer to cross to the dark compartment, were exposed to the same aversive stimuli as the rest of the animals. Thus, the cause of this impairment cannot be attributed to cocaine administration, but rather to the elevated dose of MDMA administered. MDMA-induced serotonin depletion seems not to be necessary for the impairment of performance in different learning and memory tasks [48,60,64], with the deleterious effect of MDMA having been attributed to an excessive release of 5-HT [6,65]. Acute MDMA treatment may contribute to an impaired learning retention, thereby inducing several changes in early molecular mechanisms (such as a reduction in the synaptic membrane expression of the NMDA receptor subunits NR1 and NR2B, and of CaMKII in the rat hippocampus), which, in turn, account for the consolidation of aversive memory [47].

Thirty minutes after the acute administration of MDMA no alteration was observed in monoamines or their metabolites in any of the brain structures studied. The only exception was the decrease in the concentration of striatal DOPAC observed in animals receiving the highest dose of MDMA. In previous reports, a modest decrease in 5-HT and DA has been observed in mice 3 h after treatment with moderate and high doses of MDMA [21,37,53]. Given that numerous studies have demonstrated that MDMA promotes the release of striatal DA and 5-HT in several brain regions (for review see [26,52]), these acute neurotoxic effects may be evidence that MDMA induces an enhanced release of DA and, in the case of serotonin, an increased release, reduced reuptake and inhibition of tryptophan hydroxylase. The discrepancies between our results and those of other studies could be due to the fact that our measurements were recorded earlier (30 min after drug administration), and because the doses employed were lower than those used in the aforementioned reports. The age of the animals may also be of relevance; all the previous studies were performed in adult animals, and it has been confirmed that younger mice are less sensitive to the neurotoxic effects of MDMA [59].

After being treated with cocaine and MDMA, a slight decrease in DA concentration and an increase in DOPAC and HVA levels in the striatum were recorded, representing an increase in DA turnover in these animals. Converse results for serotonin and its metabolite were observed in the striatum and cortex, with a decrease in serotonin turnover in the cocaine plus MDMA-treated mice. Although MDMA and cocaine act on the same neurotransmitter systems, the mechanisms by which they do it are different, as are the effects obtained. Cocaine increases levels of synaptic dopamine, serotonin and norepinephrine by binding to the transporters of these neurotransmitters and inhibiting their reuptake into presynaptic terminals. On the other hand, the complex mechanism of action of MDMA produces an acute release of both serotonin and dopamine from nerve terminals (review in [15]), and is more potent in inhibiting serotonin and norepinephrine than dopamine transporters, while cocaine blocks these three monoamine transporters at similar concentrations [27]. In addition, MDMA displays a moderate affinity for a broad variety of receptors, including $\alpha 2$ -adrenergic, 5-HT₂ serotonergic, M1 muscarinic and H1 histaminergic receptors, whose activation could underlie certain effects of the drug [7]. Evidence suggests that serotonin plays a more prominent role in the psychotropic effects of MDMA than in those of cocaine [32]. When both drugs are administered together, cocaine would appear to block MDMA entry into the nerve terminals, thereby inhibiting MDMA-mediated monoamine release, which would seem to mainly affect serotonin. On the other hand, the reuptake-blocking effects of these compounds might be an extra aspect of these circumstances, making DA more available to the synapse, which could be responsible for the increase in dopaminergic turnover. This DA/serotonergic balance, observed only in the groups treated with both drugs, could be in part responsible for the anxiolytic effect observed in the EPM, and only when cocaine and MDMA are administered together.

A recent study has reported that concurrent administration of MDMA and cocaine resulted in the antagonism of both drugs, which was reversed at higher doses [19]. Cocaine suppressed moderate MDMA-induced CPP, although the lack of CPP induced by a higher MDMA dose was reverted by cocaine. Based on the inverse relation between serotonin and DA activity (in general, decreases in serotonin neurotransmission produce an increase of DA function), the authors suggested that cocaine undermined MDMA-mediated serotonin release more than MDMA-mediated DA release, thereby increasing the overall reward. Our results endorse this hypothesis, since we have observed an increase in DA turnover and lower levels of serotonin turnover in the striatum and cortex. These findings may reflect an increase in DA availability in conjunction with the release of serotonin in small amounts or at a slower rate, leading to a decrease in its turnover.

A differential long-term vulnerability to the behavioural and neurotoxic effects of MDMA as a function of the developmental stage of exposure has been described [46]. Studies that have administered MDMA to adolescent animals have indicated the existence of long-lasting adaptations that affect the response of animals to cocaine [1,2,13,14]. Although such studies are of unquestionable value, no knowledge about the concurrent administration of MDMA and cocaine in adolescent animals exists. The elevated frequency of the combined use of the two drugs in human adolescent users demands an evaluation of their interaction. The present study demonstrates that the combined use of MDMA and cocaine produces a specific neurochemical and behavioural profile different to that observed when each drug is administered alone. In agreement with previous reports, aversive effects after MDMA or/and cocaine administration were diminished in adolescent animals, which could help to understand why adolescence is a period of particular vulnerability to the development of drug abuse.

Conflict of interest statements for authors

The authors state that there are no conflicts of interest in this work.

Acknowledgements

We wish to thank Mr. Brian Normanly for his editing of the manuscript. This work was supported by the following grants: Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud "Carlos III" (FIS), RETICS, Red de Trastornos Adictivos (RD06/01/0016), Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Investigación and FEDER (SEJ2005-00316/PSIC) (Spain), Generalitat Valenciana, Agenda Valenciana de Salud, Dirección General de Drogodependencias (FEPAD).

References

- [1] M. Åberg, D. Wade, E. Wall, S. Isenwasser, Effect of MDMA (ecstasy) on activity and cocaine conditioned place preference in adult and adolescent rats, *Neurotoxicol. Teratol.* 29 (2007) 37–46.
- [2] C. Achat-Mendes, K.L. Anderson, Y. Itzhak, Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood, *Neuropharmacology*, 45 (2003) 106–115.
- [3] M.A. Aguilar, J. Mifarro, V. Felipe, Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats, *Exp. Neurol.* 181 (2000) 704–713.
- [4] B. Balogh, E. Molnar, K. Jakus, L. Quate, H.J. Olverman, P.A. Kelly, S. Kantor, G. Bagdy, Effects of a single dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on circadian patterns, motor activity and sleep in drug-naïve rats and rats previously exposed to MDMA, *Psychopharmacology* 173 (2004) 296–309.
- [5] M.G. Bannison, K.A. Cunningham, Pharmacological studies of the acute effects of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine on locomotor activity: role of 5-HT (1B/1D) and 5-HT(2) receptors, *Neuropharmacology* 26 (2002) 40–52.
- [6] M. Barrionuevo, N. Aguirre, J.D. Del Río, B. Lashera, Serotonergic deficits and impaired passive-avoidance learning in rats by MDEA: a comparison with MDMA, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65 (2000) 233–240.
- [7] G. Battaglia, S.V. Yeh, E.B. De Souza, MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 29 (1988) 269–274.

- [8] CA. Baylen, H. Rosenberg, A review of the acute subjective effects of MDMA/ Ecstasy, *Addiction* 101 (2006) 953–947.
- [9] SK. Bhattacharya, A. Bhattacharya, S. Ghosal, Anxiogenic activity of methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy): an experimental study, *Biol. Amine* 14 (1998) 217–237.
- [10] K.I. Bolla, U.D. McCann, G.A. Ricaurte, Memory impairment in abstinent MDMA ("Ecstasy") users, *Neurology* 51 (1998) 1532–1537.
- [11] P.F. Brain, D. Benton, G. Childs, S. Parmington, The effect of the type of opponent in test of murine aggression, *Behav. Process* (1981) 319–327.
- [12] P.F. Brain, K.H. McAllister, S.V. Walsley, Drug effects on social behaviours, in: A.A. Boulton, G.B. Baker, A.J. Greenshaw (Eds.), *Methods in Ethopharmacology*, Psychopharmacology, The Humana Press Inc., Clifton NJ, 1989, pp. 687–739.
- [13] E.J. Bull, P.H. Hutson, K.C. Fone, Reduced social interaction following 3,4-methylenedioxymethamphetamine is not associated with enhanced 5-HT_{2C} receptor responsivity, *Neuropharmacology* 44 (2003) 439–448.
- [14] E.J. Bull, P.H. Hutson, K.C. Fone, Decreased social behaviour following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is accompanied by changes in 5-HT_{2A} receptor responsivity, *Neuropharmacology* 46 (2004) 202–210.
- [15] M.I. Colado, E. O'Shea, A.R. Green, Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function, *Psychopharmacology* 173 (2004) 249–263.
- [16] B.E. Compas, B.R. Hinden, C.A. Gerhardt, Adolescent development: pathways and processes of risk and resilience, *Ann. Rev. Psychol.* 46 (1995) 265–293.
- [17] J.L. Cornish, Z. Shaheen, M.R. Thompson, S. Wong, K.C. Morley, G.E. Hunt, L.S. McGregor, Heat increases 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration and social effects in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 482 (2003) 339–341.
- [18] M. Daza-Losada, B. Ribeiro Do Couto, C. Manzanedo, M.A. Aguilar, M. Rodríguez-Arias, J. Miñarro, Rewarding effects and reinstatement of MDMA-induced CPP in adolescent mice, *Neuropsychopharmacology* 32 (2007) 1750–1759.
- [19] A.J. Diller, A. Rocha, A.L. Cardon, R. Valles, P.J. Wellman, J.R. Nairon, The effects of concurrent administration of α -3,4-methylenedioxyamphetamine and cocaine on conditioned place preference in the adult male rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 88 (2007) 165–170.
- [20] E. Erhardt, L.C. Zibetti, J.M. Godinho, B. Bacchieri, H.M. Barros, Behavioral changes induced by cocaine in mice are modified by a hyperlipidic diet or recombinant leptin, *Br. J. Med. Biol. Res.* 39 (2006) 1625–1635.
- [21] I. Escobedo, E. O'Shea, L. Oria, V. Sanchez, M. Segura, R. de la Torre, M. Farre, A.R. Green, M.I. Colado, A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice, *Br. J. Pharmacol.* 144 (2005) 231–241.
- [22] J. Estelles, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar, J. Miñarro, Social behavioural profile of cocaine in isolated and grouped male mice, *Drug Alcohol Depend.* 76 (2004) 115–123.
- [23] J. Estelles, M. Rodríguez-Arias, C. Maldonado, M.A. Aguilar, J. Miñarro, Prenatal cocaine exposure alters spontaneous and cocaine-induced motor and social behaviors, *Neurotoxicol. Teratol.* 27 (2005) 449–457.
- [24] J. Estelles, J. Ullch, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar, J. Miñarro, Cocaine exposure during adolescence affects anxiety in adult mice, *Brain Res. Bull.* 71 (2007) 393–403.
- [25] A.R. Green, A.O. Mehan, J.M. Elliott, E. O'Shea, M.I. Colado, The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"), *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 493–508.
- [26] G.A. Gadeley, B.K. Yamamoto, Actions of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on cerebral dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90 (2008) 198–207.
- [27] D.D. Han, H.H. Gu, Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs, *BMC Pharmacol.* 3 (2006) 6/6.
- [28] T.G. Heffner, J.A. Hartman, L.S. Seiden, A rapid method for the regional dissection of the rat brain, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (1980) 453–456.
- [29] K. Heffner, A. Holmes, Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57Bl/6j mice, *Behav. Brain Res.* 176 (2007) 210–215.
- [30] V.J. Ho, C.R. Pawlak, L. Guo, R.K. Schwart, Acute and long-term consequences of single MDMA administration in relation to individual anxiety levels in the rat, *Behav. Brain Res.* 149 (2004) 135–144.
- [31] B. Horan, E.L. Gardner, C.R. Ashby Jr., Enhancement of conditioned place preference response to cocaine in rats following subchronic administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), *Synapse* 35 (2000) 160–162.
- [32] Y. Izbicki, S.F. Ali, Role of nitric oxide system in behavioral and neurotoxic effects of amphetamine analogs, *Pharmacol. Ther.* 109 (2006) 246–262.
- [33] J. Koening, C. Lazarus, H. Jelitsch, S. Ben Hamida, C. Riegert, C. Kelche, B.C. Jones, J.C. Cassel, MDMA (ecstasy) effects in pubescent rats: males are more sensitive than females, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 81 (2005) 635–644.
- [34] G. Laviola, W. Adriani, M.L. Terranova, G. Gerra, Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23 (1999) 993–1010.
- [35] H.Q. Lin, P.M. Burden, M.J. Christie, G.A. Johnston, The anxiogenic-like and anxiolytic-like effects of MDMA on mice in the elevated plus-maze: a comparison with amphetamine, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62 (1999) 403–408.
- [36] J. Ullch, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar, J. Miñarro, Role of dopamine and glutamate receptors in cocaine-induced social effects in isolated and grouped male OF1 mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82 (2005) 478–487.
- [37] B.J. Logan, R. Lavery, W.D. Sanderson, Y.B. Yee, Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethamphetamine) neurotoxicity, *Eur. J. Pharmacol.* 152 (1988) 227–234.
- [38] C. Maldonado, M. Rodríguez-Arias, A. Castilla, M.A. Aguilar, J. Miñarro, Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice, *Behav. Pharmacol.* 17 (2006) 119–131.
- [39] E. Maldonado, J.F. Navarro, MDMA ("ecstasy") exhibits an anxiogenic-like activity in social encounters between male mice, *Pharmacol. Res.* 44 (2001) 27–31.
- [40] U.D. McCann, G.A. Ricaurte, MDMA ("ecstasy") and panic disorder: induction by a single dose, *Biol. Psychiatry* 32 (1992) 950–953.
- [41] M.G. McNamara, J.P. Kelly, B.E. Leonard, Some behavioural and neurochemical aspects of subacute (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine administration in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52 (1995) 479–484.
- [42] C. Montgomery, J.E. Fisk, R. Newcombe, P.N. Murphy, The differential effects of ecstasy/polydrug use on executive components: shifting, inhibition, updating and access to semantic memory, *Psychopharmacology* 182 (2005) 262–276.
- [43] M.J. Morgan, Memory deficits associated with recreational use of "ecstasy", *Psychopharmacology* 141 (1999) 30–36.
- [44] K.C. Morley, L.S. McGregor, (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") increases social interaction in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 408 (2000) 41–49.
- [45] K.C. Morley, J.C. Arnold, L.S. McGregor, Serotonin (1A) receptor involvement in acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) facilitation of social interaction in the rat, *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29 (2005) 648–657.
- [46] S. Morley-Fletcher, M. Bianchi, G. Gerra, G. Laviola, Acute and carryover effects in mice of MDMA ("ecstasy") administration during periadolescence, *Eur. J. Pharmacol.* 448 (2002) 31–38.
- [47] S. Moyano, D. Frechilla, J. Del Río, NMDA receptor subunit and CaMKII changes in rat hippocampus induced by acute MDMA treatment: a mechanism for learning impairment, *Psychopharmacology* 173 (2004) 337–345.
- [48] S. Moyano, J. Del Río, D. Frechilla, Acute and chronic effects of MDMA on molecular mechanisms implicated in memory formation in rat hippocampus: surface expression of CaMKII and NMDA receptor subunits, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82 (2005) 189–199.
- [49] R.A. Mugford, N.W. Novell, Pheromones and their effect on aggression in mice, *Nature* 226 (1970) 967–968.
- [50] J.F. Navarro, A. Rivera, E. Maldonado, M. Casas, A. de la Calle, Anxiogenic-like activity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in the social interaction test is accompanied by an increase of c-fos expression in mice amygdala, *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28 (2004) 249–254.
- [51] J.F. Navarro, E. Maldonado, Acute and subchronic effects of MDMA ("ecstasy") on anxiety in male mice tested in the elevated plus-maze, *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 26 (2002) 1151–1154.
- [52] J.P. O'Callaghan, D.B. Miller, Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57Bl/6j mouse, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994) 741–751.
- [53] E. O'Shea, B. Esteban, J. Camarero, A.R. Green, M.I. Colado, Effect of GBR 12099 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ("ecstasy") on the 5-HT_{2A} dopamine concentrations in mouse brain, *Neuropharmacology* 40 (2001) 65–74.
- [54] J. Maleniczek, M. Votava, V. Bubnikova, J. Horacek, Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats, *Physiol. Behav.* 86 (2005) 546–553.
- [55] A.C. Parrott, A. Lees, N.J. Garnham, M. Jones, K. Wesnes, Cognitive performance in recreational users of MDMA or "ecstasy": evidence for memory deficits, *J. Psychopharmacol.* 12 (1998) 79–83.
- [56] A.C. Parrott, R.M. Milani, R. Farrar, J.D. Turner, Recreational ecstasy/MDMA in the social interaction test from the UK and Italy: psychiatric symptoms and psychobiological problems, *Psychopharmacology* 159 (2001) 77–82.
- [57] S. Pellow, S.E. File, Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 (1986) 525–529.
- [58] J.L. Reay, C. Hamilton, D.O. Kennedy, A.R. Schley, MDMA polydrug users show process-specific central executive impairments coupled with impaired social and emotional judgement processes, *J. Psychopharmacol.* 20 (2006) 385–388.
- [59] M.E. Reveren, T.J. Monks, C.L. Duvauchelle, Age-dependent (+)MDMA-mediated neurotoxicity in mice, *Neurotoxicology* 26 (2005) 1031–1040.
- [60] G.A. Ricaurte, A.L. Markowska, G. I. Wenk, G. Hatzidimitriou, J. Wlos, D.S. Olton, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, serotonin and memory, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266 (1993) 1097–1105.
- [61] R.J. Rodgers, M.G. Cutler, J.E. Jackson, Behavioural effects in mice of subchronic chloridazepoxide, maprotiline and fluvoxamine. II. The elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57 (1997) 127–136.
- [62] J. Rodgers, Cognitive performance amongst recreational users of "ecstasy", *Psychopharmacology* 151 (2000) 19–24.
- [63] M. Rodríguez-Arias, J. Miñarro, M.A. Aguilar, J. Pinazo, V.M. Simon, Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice, *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 8 (1998) 95–103.
- [64] R. Rogério, R.N. Takahashi, Antimanic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43 (1992) 631–633.
- [65] A.C. Santucci, P.J. Knott, V. Haroutunian, Excessive serotonin release, not depletion, leads to memory impairments in rats, *Eur. J. Pharmacol.* 295 (1996) 7–17.
- [66] N.L. Schramm-Sapota, R.W. Morris, C.M. Kuhn, Adolescent rats are protected from the conditioned aversive properties of cocaine and lithium chloride, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84 (2006) 344–352.
- [67] R. Smoother, P.F. Brain, M.S. Berry, M. Haug, Alcohol and social behaviour in group-housed female mice, *Physiol. Behav.* 37 (1986) 689–694.
- [68] N. Solowij, W. Hall, N. Lee, Recreational MDMA use in Sydney: a profile of 'Ecstasy' users and their experiences with the drug, *Br. J. Addict.* 87 (1992) 1161–1172.
- [69] L.P. Spear, The adolescent brain and age-related behavioral manifestations, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24 (2000) 417–463.

ANEXO I

- [70] V.E. St Omer, S.F. Ali, R.R. Holson, H.M. Duhart, F.M. Scalzo, W. Sikker Jr., Behavioral and neurochemical effects of prenatal methylendioxyamphetamine (MDMA) exposure in rats, *Neurotoxicol. Teratol.* 13 (1991) 13–20.
- [71] M.L. Terranova, G. Laviola, E. Alleva, Ontogeny of amicable social behavior in the mouse: gender differences and ongoing isolation outcomes, *Dev. Psychobiol.* 26 (1993) 467–481.
- [72] M.L. Terranova, G. Laviola, L. de Acetis, E. Alleva, A description of the ontogeny of mouse agonistic behaviour, *J. Comp. Psychol.* 112 (1998) 3–12.
- [73] The National Survey on Drug Use and Health, United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2005), *World drug report, vol. 1: Analysis*, Vienna: UNODC, 2004.
- [74] J. Timár, S. Gyarmati, A. Szabó, S. Fürst, Behavioural changes in rats treated with a neurotoxic dose regimen of dextrorotatory amphetamine derivatives, *Behav. Pharmacol.* 14 (2003) 199–206.
- [75] J.R. Uhl, E.S. Hall, L. Sara, Cocaine, reward, movement and monoamine transporters, *Mol. Psychiatry* 7 (2002) 21–26.
- [76] F.X. Vollenweider, A. Gamma, M. Liechti, T. Huber, Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naïve healthy volunteers, *Neuropsychopharmacology* 19 (1998) 241–251.
- [77] P.M. Whitaker-Azmitia, T.A. Aronson, "Ecstasy" (MDMA)-induced panic, *Am. J. Psychiatry* 146 (1989) 119.
- [78] E.D. Wish, D.B. Fitzelle, K.E. O'Grady, M.H. Hsu, A.M. Arria, Evidence for significant polydrug use among ecstasy-using college students, *J. Am. Coll. Health* 55 (2006) 99–104.
- [79] X.M. Yang, A.L. Gorman, A.J. Dunn, N.E. Goeders, Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41 (1992) 643–650.

ANEXO II



Behavioural and neurotoxic long-lasting effects of MDMA plus cocaine in adolescent mice

M. Daza-Losada, M. Rodríguez-Arias, C. Maldonado, M.A. Aguilar, J. Miñarro*

Unidad de Investigación Psicología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de Valencia, Avda. Blasco Ibáñez 21, 46010, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 December 2007
Received in revised form 23 May 2008
Accepted 5 June 2008
Available online 12 June 2008

Keywords:

Elevated plus maze
Locomotor activity
Social behaviour
Dopamine
Serotonin
MDMA
Cocaine
(Mouse)

ABSTRACT

The poly-drug pattern is the most common among MDMA users, with cocaine being a frequently associated drug. The aim of the present work was to evaluate the behavioural and neurotoxic long-term effects of exposure during adolescence to MDMA alone or plus cocaine. Mice of 28 to 30 days of age received a treatment of two daily injections of an identical dose of MDMA (5, 10 or 20 mg/kg), alone or plus cocaine (25 mg/kg), for 3 days (6 administrations). Three weeks after receiving MDMA, an increase in the time dedicated by the animals to social contacts with their conspecifics was observed, whilst their behaviour in the elevated plus maze showed no differences from that of non-treated mice. After being exposed to MDMA plus cocaine, mice spent more time in social contacts during the interaction test, as well as exhibiting an anxiolytic profile in the elevated plus maze, with an increase in the time and number of entries in the open arms. The activity of mice treated with cocaine alone or plus MDMA remained constant; the decrease observed among the rest of the animals after the second hour was absent in their case. The level of dopamine in the striatum was diminished in mice treated with 20 mg/kg of MDMA, but this neurotransmitter was not affected in animals exposed to the same dose plus cocaine. The present results highlight pronounced alterations in the behaviour of adult mice after exposure to MDMA and cocaine during adolescence, and demonstrate that these long-term effects can occur without the dopaminergic system becoming affected.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

MDMA (3,4-methylene-dioxy-methamphetamine), commonly known as ecstasy, is used as an illicit recreational drug by many teenagers and young adults. Ecstasy users are more likely to take other drugs than non-users (Rodgers, 2000). For example, cocaine is reported as being consumed by 43.8% of MDMA users (The National Survey on Drug Use and Health, 2004; Wish et al., 2006). Ecstasy poly-drug users report significantly pronounced problems, such as anxiety, obsessive-compulsive behaviour, psychoticism, somatisation, deficits in memory updating, and impairment of social and emotional judgment processes (Parratt et al., 2001; Montgomery et al., 2005; Reay et al., 2006).

There are many studies that have evaluated the behavioural and neurochemical effects of MDMA use in rodents, but there are very few that have assessed the effects of MDMA-poly-drug use. Although cocaine is one of the drugs most commonly consumed with MDMA, no previous studies have been carried out in order to examine this poly-drug pattern. On the other hand, although the majority of MDMA users cease taking the drug spontaneously in their twenties (von

Sydow et al., 2002), most of the studies conducted with animal models to date have employed adult subjects (Morley-Fletcher et al., 2002). The adolescent phase is associated with an increased risk of drug abuse and drug-related problems (Compas et al., 1995), since it is a unique ontogenetic period during which the brain continues to be plastic, due to the neuroanatomical, neurochemical and neurophysiological processes that characterise it. Periadolescent rodents present a distinctive behavioural profile, similar to that found in human adolescents, and characterised by high rates of social interaction, playful activities and novelty-seeking, increased locomotor activity and an impairment in learning tests that requires a particular attention to the environment (Spear, 2000; Laviola et al., 2003). Moreover, young rats and mice are highly sensitive to the administration of psychostimulant agents (Terranova et al., 1993, 1998; Laviola et al., 1999; Spear, 2000). Thus, these animals have been proposed as a useful model for the study of risk factors associated with vulnerability to behavioural disorders in human adolescents (Laviola et al., 1999).

Subsequent long-term response to MDMA exposure, including a reduced hormonal response to drug challenge and a combination of depressive pattern, dysphoria, high levels of aggressiveness and elevated scores of novelty-seeking behaviour have been observed in human adolescent MDMA users weeks after discontinuation of intake (Gerra et al., 1998). These long-term effects have also been described in mice and rats exposed to MDMA during adolescence, among which

* Corresponding author. Tel.: +34 96 386 4020; fax: +34 96 386 4668.
E-mail address: jose.minarro@uv.es (J. Miñarro).

changes in social behaviour (Fone et al., 2002; Morley-Fletcher et al., 2002), motor activity (Balogh et al., 2004) and anxiety levels (Mechan et al., 2002; Ho et al., 2004; Faria et al., 2006; Clemens et al., 2007) have been detected. As we have previously reported, adolescent cocaine administration also induces long-term effects in mice, which are expressed through increased flee and avoidance behaviour and a decrease in social contacts (Estelles et al., 2006). Furthermore, it should be taken into consideration that human MDMA and cocaine consumers commonly adhere to a binge pattern, which has been associated with a higher occurrence of stimulant-induced psychosis and addiction (Gawin, 1991; Segal and Kuczenski, 1997).

The first aim of the present study was to investigate if cocaine combination affects the long-term consequences of MDMA adolescent exposure on anxiety in adulthood. Anxiety levels, measured using the elevated plus maze and social interaction test, were studied 3 weeks after administration of the drugs. Spontaneous motor activity was also recorded. It is well-known that MDMA induces a neurotoxic effect, which in the case of mice affects mainly the dopaminergic terminals (Logan et al., 1988; Lavery and Logan 1990; Miller and O'Callaghan, 1994; Colado et al., 2001; O'Shea et al., 2001; Saadat et al., 2006). As a second objective of the study, we attempted to clarify whether or not the behavioural changes induced by drug exposure during adolescence are related with the neurotoxic damage that is observed as a result of this exposure. To do this, we determined the brain concentration of dopamine and serotonin and their metabolites on the striatum, hippocampus and cortex of the animals 3 weeks after being exposed to MDMA alone or plus cocaine.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

A total of 408 male mice of the OF1 strain (Charles River, Barcelona, Spain) were used as subjects in this study: 304 as experimental animals and the remainder as standard opponents, which constituted the anomic subjects in the social interaction test. Mice were 21 days old on arrival at the laboratory, and were all housed under standard conditions in groups of four (cage size 28×28×14.5 cm), at a constant temperature (21±2 °C), with a reversed light schedule (white lights on 19:30–07:30 h), and food and water available *ad libitum* (except during the behavioural test). All procedures involving the mice and their care complied with national, regional and national regulations, and with European Community Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

2.2. Drug treatment and experimental design

Cocaine hydrochloride (Laboratorios Alcaliber S. A. Madrid, Spain) and MDMA (±3,4-methylene-dioxy-metamphetamine hydrochloride, Laboratorios Sigma-Aldrich, Spain) were used in a volume of 0.01 ml/g for this experiment, both when the drugs were administered alone and simultaneously. Control groups were injected with physiological saline (NaCl 0.9%), which was also used to dissolve the drugs.

After a 7 day period of adaptation to the laboratory, adolescent mice were administered a treatment consisting of two daily injections (at 8 am and 8 pm) of an identical dose of MDMA (5, 10 and 20 mg/kg), alone or plus cocaine (25 mg/kg), for 3 days (6 administrations), from postnatal day 28 to 30 being. Animals were divided into the following groups: M0 (n=12–15), M5 (n=9–16), M10 (n=12–16), M20 (n=10–17), Cocaine (n=12), Cocaine-M5 (n=12), Cocaine-M10 (n=12) and Cocaine-M20 (n=12). The cocaine doses were based on previous studies performed with the same strain of mice (Estelles et al., 2005; Ribeiro Do Couto et al., 2005; Luch et al., 2005).

Three weeks after pre-treatment (postnatal day 51), a set of experimental mice performed the elevated plus maze test, and their spontaneous motor activity was measured for 6 h with an actimeter. A

further set of animals was employed for the social interaction test and another set for determining brain monoamine concentrations during the same period. Body weight was recorded throughout the procedure. Some mice from each behavioural group were selected in order to measure their rectal temperature after each of the injections (n=5 for M0, M5, M10, Cocaine-M5 and Cocaine-M20; n=6 for M20; n=12 for Cocaine and Cocaine-M10).

2.3. Procedure and apparatus

2.3.1. Elevated plus maze

The elevated plus maze consisted of two open arms (30×5×0.25 cm) and two enclosed arms (30×5×15 cm). The junction of the four arms formed a central platform (5×5 cm). The floor of the maze was made of black Plexiglas and the walls of the enclosed arms of clear Plexiglas. The open arms had a small edge (0.25 cm) to provide additional grip for the animals. The entire apparatus was elevated 45 cm above floor level. In order to facilitate adaptation, mice were transported to the dimly illuminated laboratory 1 h prior to testing. At the beginning of each trial, subjects were placed on the central platform so that they were facing an open arm, and were allowed to explore for 5 min. The maze was thoroughly cleaned with a damp cloth after each trial. The mice's behaviour was video recorded and later analyzed by a 'blind' observer using a computerized method. The measurements recorded during the test period were frequency of entries and the time and percentage of time spent in each section of the apparatus (open arms, closed arms, central platform). An arm was considered to have been visited when the animal placed all four paws on it. The numbers of open arm entries, time spent in open arms and percentage of open arm entries are generally used to characterise the anxiolytic effects of drugs (Pellow and File, 1986; Rodgers et al., 1997).

2.3.2. Spontaneous motor activity

An actimeter (CIBERTEC S.A. Spain) composed of eight cages (33×15×13 cm), each with eight infrared lights located in a frame around the cage, was used to automatically measure spontaneous locomotor activity. Beams were 2 cm apart, and were positioned on the horizontal axis, at a height just above the bottom of the cage (body level of mice). The different frames were separated from each other by 4 cm, and since they were opaque, prevented animals from seeing other conspecifics.

2.3.3. Social interaction test

An experimental animal was confronted with a standard opponent in a neutral cage (61×30.5×36 cm) for 10 min, after a 1 min-period of adaptation. One day before testing, standard opponents were rendered temporarily anomic by intranasal lavage with a 4% zinc sulfate solution (Smoothy et al., 1986). This kind of mouse induces an attack reaction in its opponent but does not outwardly provoke or defend itself, since it cannot perceive a pheromone that is present in the urine of the experimental animals and which functions as a cue for eliciting aggressive behaviour in mice with a normal sense of smell (Brain et al., 1981; Mugford and Nowell, 1970). Behaviour was videotaped under white illumination. The videotapes were analyzed by an observer blind to the treatment using a custom-developed programme (Brain et al., 1989) that facilitates estimation of times allocated to different broad functional categories of behaviour – non-social exploration, social investigation, threat, attack and avoidance/flee – each of which is characterised by a series of different postures and elements. A more detailed description can be found in Rodríguez-Arias et al. (1998).

2.3.4. Analysis of biogenic amines

A separate group of animals underwent the same treatment schedule as that of the behavioural studies, and 3 weeks after the last injection of the binge mice were sacrificed by cervical dislocation. The procedure for the neurochemical study was similar to that described in Daza-Losada et al. (2007). Within 2 min, brains were removed and

placed on an ice-cold plate. The striatum, cortex and hippocampus were removed, frozen on dry ice and stored at -80°C . Tissue was thawed, weighed and then homogenized in 200 μl of perchloric acid (0.1 N) using ultrasounds. The homogenate was centrifuged for 30 min at 14,000 rpm. The supernatant was divided into aliquots for the analysis of biogenic amines. Dopamine, dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), serotonin and 5-hidroxyindole acetic acid (5-HIAA) were analyzed in a high performance liquid chromatograph (Agilent 1100 series HPLC). Samples were applied to a column (0.5 μm , 12.5 cm, 4.6 cm; Agilent Zorbax High Pressure Cartidge Guard-column). An isocratic mobile phase consisting of 0.10 M chloroacetic acid, 0.70 mM EDTA and 1.0 mM sodium octylsulphate (pH 3.25) in 14% methanol was passed through the column at a constant flow of 1 ml/min. The column was maintained at 21°C . Analytes were oxidized on a glassy carbon electrode maintained at 300 mV against a Ag/AgCl reference electrode (BAS). The complete separation of biogenic amines was achieved in 25 min. Data were collected and analyzed using the Merck-Hitachi software package (Model D-7000). Levels of serotonin and 5-HIAA were analyzed in the striatum, cortex and hippocampus. In addition, levels of dopamine, DOPAC and HVA were analyzed in the striatum.

2.3.5. Measurement of rectal temperature

Temperature was measured 30 min after each drug administration using a Technomed Europe thermometer (Medical Diagnosis Accessories, Netherlands) and a lubricated rectal probe (YSI-400 series). Each mouse was lightly restrained by hand for approximately 10 s whilst the probe was inserted into its rectum and a steady reading obtained.

2.4. Statistical analyses

Data for the plus maze, social interaction test and monoamines in each of the brain structures studied were analyzed by two way ANOVA

(treatment \times dose), employing two between variables: treatment with cocaine (with two levels, saline or cocaine) and dose of MDMA employed (with four levels: 0, 5, 10 and 20 mg/kg). Motor activity was analyzed by three way ANOVA, with the two between variables mentioned above and one within variable (recording time: six levels). Further comparisons were performed using Newman-Keuls post-hoc tests or simple effects. All results are expressed as mean \pm S.E.M.

Statistical analysis of the measurements of temperature and body weight was performed by three-way ANOVA (treatment \times dose \times time) with two between variables – treatment with cocaine, with two levels (saline or cocaine), and dose of MDMA employed, with four levels (0, 5, 10 and 20 mg/kg) – and one within variable – time, with 6 levels for each of the drug injections in the case of temperature, and 5 levels (postnatal day 21, 28, 29, 30 and 51) for body weight.

3. Results

3.1. Plus-maze

As can be observed in Fig. 1, animals treated with cocaine and MDMA spent more percentage of time [$F(1,101)=9.372$; $P<0.002$] in the open arms than those treated only with MDMA ($P<0.01$). Similar results were found with respect to the percentage [$F(1,101)=22.912$; $P<0.0001$] of open entries ($P<0.01$).

On the other hand, mice treated with cocaine (alone or plus MDMA) spent less percentage of time [$F(1,101)=34.823$; $P<0.0001$] in the closed arms of the plus maze ($P<0.01$) than those treated only with MDMA. A decrease in the percentage of closed entries [$F(1,101)=24.685$; $P<0.0001$] was also observed in mice treated with both drugs ($P<0.01$).

Although the time spent in the central area did not differ among the groups, the percentage of time spent in this part of the plus maze [$F(3,101)=3.003$; $P<0.03$] was greater in animals that had not been treated with MDMA (groups MD and Cocaine) than in those receiving

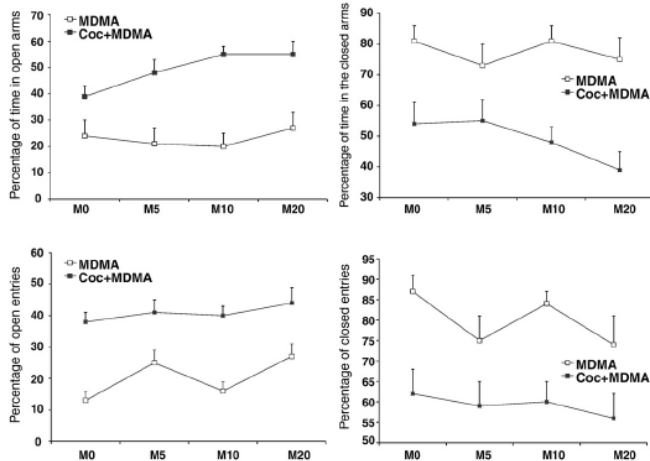


Fig. 1. Long-term effects of MDMA and cocaine administration in adolescent mice on performance in the elevated plus maze. Long-term effects on % of time in open and closed arms and % of open and closed entries in the elevated plus maze of administration of MDMA (5, 10 and 20 mg/kg) alone or plus cocaine (25 mg/kg) over 3 days (6 administrations). Data are presented as mean values \pm S.E.M.

ANEXO II

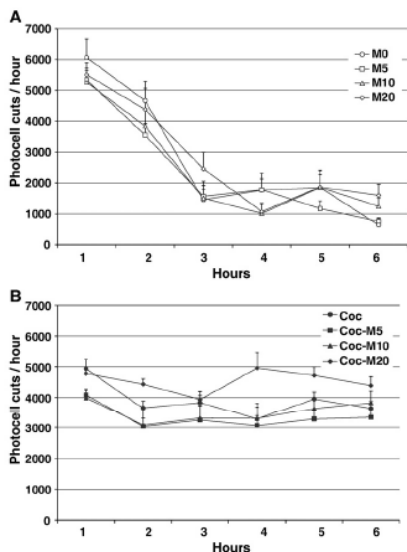


Fig. 2. Means (\pm S.E.M.) during a 6 hour period of locomotor activity in photocell cuts from adolescent mice treated with MDMA alone (A) or MDMA plus cocaine (B).

5 or 10 mg/kg of MDMA ($P < 0.05$). Finally, the number of total entries [$F(1,101) = 4.937$; $P < 0.02$] was greater among animals treated with cocaine plus MDMA ($P < 0.05$) than in the rest of the groups.

3.2. Motor activity

The ANOVA, performed on the measurement of spontaneous motor activity (Fig. 2), revealed that the groups treated with cocaine plus MDMA [$F(1,50) = 17.114$; $P < 0.0001$] exhibited higher activity than the rest of the groups ($P < 0.01$). Although all animals were more active [$F(5,250) = 32.554$; $P < 0.0001$] during the first and the second hour than during the subsequent 4 h ($P < 0.01$), mice treated with cocaine plus MDMA [$F(5,250) = 22.402$; $P < 0.0001$] were more active during the third, fourth, fifth and sixth hours ($P < 0.01$).

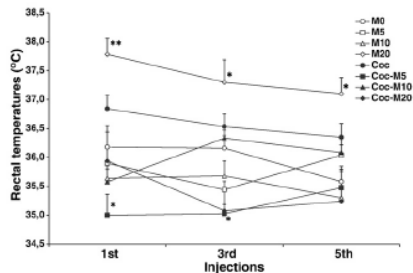


Fig. 3. Effect of MDMA and cocaine on rectal temperature 30 min after the administration of an injection of MDMA (5, 10 and 20 mg/kg), alone or plus cocaine (25 mg/kg). The mean basal temperature was 36.4 ± 0.1 °C. Data are presented as mean values \pm S.E.M. Differences with respect to mice treated with saline * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

3.3. Social interaction test

The data of the behaviours evaluated in the social interaction test are presented in Table 1. Animals treated with cocaine plus any of the MDMA doses [$F(1,85) = 7.960$; $P < 0.0060$] spent less time engaged in Non-social Exploration than those treated only with MDMA (Newman-Keuls test $P < 0.01$).

Explore from a Distance was more pronounced [$F(3,86) = 3.984$; $P < 0.0104$] in cocaine-treated animals than in the rest of the groups ($P < 0.05$).

Time spent by the animals in Social Investigation was increased by prior treatment with MDMA [$F(3,86) = 6.760$; $P < 0.0004$], and cocaine did not alter this effect (Newman-Keuls test $P < 0.01$). The Unit of Social Investigation (mean time spent in each encounter) gave similar results [$F(3,84) = 4.470$; $P < 0.0058$], as it was higher in animals treated with MDMA (Newman-Keuls test $P < 0.01$ with respect to M0 or Cocaine groups). Additionally, there was a greater increase in this parameter among mice treated with MDMA plus cocaine [$F(1,84) = 10.664$; $P < 0.0016$] (Newman-Keuls test $P < 0.01$).

Only the mice exposed to cocaine [$F(1,88) = 4.012$; $P < 0.0483$] showed Threat behaviour ($P < 0.05$). Equally, Avoidance and Flee behaviours were observed only in animals treated with cocaine alone [$F(3,88) = 5.430$; $P < 0.0018$], in which a significant increase was noted in comparison with that of the other groups (Newman-Keuls test $P < 0.01$).

3.4. Effect of MDMA binge administration on rectal temperature

A rise in rectal temperature (Fig. 3) after the first dose of MDMA (20 mg/kg) [$F(15,230) = 2.517$; $P < 0.0018$] was observed with respect to that of the rest of the groups ($P < 0.01$). This response was also

Table 1

Times allocated to different categories of spontaneous behaviour during the social interaction test in adult mice treated during adolescence with MDMA and cocaine

	M0	M5	M10	M20	Coc	Coc-M5	Coc-M10	Coc-M20
Body care	18±2	12±1	18±2	21±3	18±2	18±3	17±3	19±3
Digging	47±6	48±7	39±5	34±3	40±7	30±6	25±4	33±5
Non-social exploration	473±5	443±9	442±13	464±12	424±17	437±15	416±18	427±12
Explore from a distance	10±1	15±1	14±2	10±2	26±2 ^a	16±4	16±2	18±2
Social investigation	51±7	84±9 ^b	89±8 ^b	70±6 ^b	52±7	101±12 ^b	102±14 ^b	90±11 ^b
Unit of social investigation	3.1±0.3	3.6±0.3 ^b	3.6±0.2 ^b	3.7±0.3 ^b	3.2±0.1	5.0±0.2 ^b	4.3±0.4 ^b	4.8±0.4 ^b
Threat	0±0	1±0.5	1±0.5	0±0.1	27±14 ^a	2±1 ^a	20±12 ^a	7±3 ^a
Attack	0±0	0±0	0.5±0.4	0±0	7±5	0±0	3±1	2±0.5
Avoidance/Flee	0±0	0±0	0±0	0±0	4±1 ^b	0±0	0±0.2	0±0.1

Means of accumulated times (s) with \pm S.E.M. allocated to different categories of spontaneous behaviour in adult mice treated during adolescence with two injections a day of an identical dose of MDMA (5, 10 and 20 mg/kg), alone or plus cocaine (25 mg/kg), over 3 days (6 administrations). Differences from respective control (M0 or Cocaine) ^a $P < 0.01$; ^b $P < 0.05$.

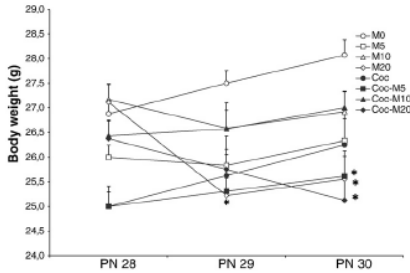


Fig. 4. Effect of MDMA and cocaine on body weight on each of the 3 days in which mice received MDMA (5, 10 and 20 mg/kg), alone or plus cocaine (25 mg/kg). Data are presented as mean values \pm S.E.M. Differences with respect to mice treated with saline (M0) * P <0.05.

manifested after the third and fifth injections, although to a lesser degree (P <0.05 with respect to saline in the fifth administration). Conversely, a drop in temperature was detected with respect to controls in animals treated with cocaine and the lowest MDMA dose (5 mg/kg) after the first, second and third administration (P <0.05).

3.5. Body weight

The weight of all the animals increased [$F(4,308)=3008$; P <0.0001] over the experimental procedure. The weight of mice treated with 20 mg/kg of MDMA (Fig. 4) was lower than that of their controls [$F(12,308)=2.075$; P <0.0184] on the second and third day of the drug administration, (P <0.05). On the third day of the binge, mice receiving cocaine plus 5 or 20 mg/kg of MDMA also showed a decreased body weight (P <0.05).

3.6. Monoamine concentration

3.6.1. Dopamine and its metabolites

Data related to the results of brain monoamine are presented in Table 2. The concentration of dopamine in the striatum was lower [$F(1,75)=27.101$; P <0.0001] in mice treated only with MDMA than in those also receiving cocaine (P <0.01). Animals treated with the highest MDMA dose alone (M20) [$F(3,75)=5.340$; P <0.0022] presented a significant decrease in dopamine with respect to those receiving only saline (M0) (P <0.01).

DOPAC concentrations were higher in animals receiving MDMA [$F(3,78)=10.193$; P <0.0001] than in those treated with saline or co-

caine alone (P <0.01). In particular, mice treated with MDMA plus cocaine presented higher levels of DOPAC [$F(3,44)=21.770$; P <0.0001] than those receiving only cocaine (P <0.05 for Cocaine-M10 and P <0.01 for the rest).

Mice treated with MDMA (5, 10 or 20 mg/kg) plus cocaine presented higher levels of HVA [$F(3,44)=56.407$; P <0.0001] than those receiving only cocaine (P <0.01).

3.6.2. Serotonin and 5-HIAA

Animals treated with cocaine showed higher levels of serotonin concentration in the striatum [$F(1,76)=17.777$; P <0.0001] than those treated only with MDMA (P <0.01). However, serotonin levels in the hippocampus were lower [$F(1,80)=20.139$; P <0.0001] in mice treated with cocaine plus any of the MDMA doses (P <0.01). The concentration of serotonin in the cortex was lower [$F(3,77)=2.958$; P <0.03] in mice treated with 20 mg/kg of MDMA plus cocaine than in those receiving only this dose of MDMA (P <0.01).

Animals receiving MDMA plus cocaine (Cocaine-M5, Cocaine-M10 and Cocaine-M20 groups) presented higher levels of 5-HIAA in the striatum [$F(3,44)=11.510$; P <0.0001] than those receiving only cocaine (P <0.01). In the hippocampus, animals receiving the highest MDMA dose (M20) presented a decrease in their levels of this metabolite [$F(3,43)=5.494$; P <0.003] with respect to those observed in the rest of the groups treated with MDMA (P <0.01). The concentration of 5-HIAA in the cortex was lower [$F(1,76)=11.824$; P <0.001] in animals treated with MDMA plus cocaine (P <0.01).

4. Discussion

The long-term behavioural and neurotoxic effects of MDMA in adolescent animals have not been explored in depth and to our knowledge, no previous studies have been carried out in order to evaluate the action that cocaine consumption has on these effects. The present work demonstrates that, in adolescent mice, the two drugs induce different long-term behavioural and neurochemical effects, and that a distinctive profile emerges after MDMA and cocaine are consumed together.

Adolescent MDMA exposure did not produce important changes in adult animals in the elevated plus maze, contrasting radically with the pronounced behavioural changes observed in the mice treated with cocaine, alone or plus MDMA, which presented an clear anxiolytic profile. The long-term effects of MDMA administration have not been studied in mice until now, and the results reported after acute administration have been shown to be dependent on the dose employed. Acute or subchronic administration of low doses of MDMA (1 to 8 mg/kg) elicits anxiogenic-like behaviour, although no action, or even an anxiolytic effect, is observed following administration of higher doses (20 mg/kg) (Lin et al., 1999; Navarro and Maldonado, 2002). There are a few studies in which MDMA has been administered

Table 2 Long-term effects on the concentration of brain monoamines in the striatum, cortex and hippocampus of administration of MDMA and cocaine in adolescent mice

	M0	M5	M10	M20	Coc	Coc-M5	Coc-M10	Coc-M20
Striatum								
DA	10,765 \pm 1403	7852 \pm 1102	7376 \pm 871	5499 \pm 840 ^b	10,055 \pm 295	13,022 \pm 1418	10,784 \pm 1420	12,536 \pm 711
DOPAC	1996 \pm 186	1598 \pm 251	2496 \pm 445	1992 \pm 422	1232 \pm 134	3307 \pm 462 ^a	1965 \pm 136 ^a	3080 \pm 223 ^b
HVA	168 \pm 14	198 \pm 52	105 \pm 12	89 \pm 11	94 \pm 3	213 \pm 25 ^b	203 \pm 12 ^b	261 \pm 17 ^b
5-HT	484 \pm 44	351 \pm 61	363 \pm 27	364 \pm 24	467 \pm 81	484 \pm 57	467 \pm 33	477 \pm 66
5-HIAA	318 \pm 49	291 \pm 43	277 \pm 55	284 \pm 63	233 \pm 33	464 \pm 76 ^a	413 \pm 35 ^a	567 \pm 70 ^b
Cortex								
5-HT	217 \pm 10	192 \pm 18	257 \pm 18	265 \pm 12	251 \pm 19	201 \pm 13	236 \pm 28	185 \pm 23
5-HIAA	159 \pm 17	196 \pm 22	250 \pm 19	239 \pm 10	127 \pm 14	185 \pm 53	132 \pm 37	142 \pm 24
Hippocampus								
5-HT	364 \pm 43	316 \pm 25	350 \pm 67	313 \pm 64	217 \pm 20	185 \pm 21	262 \pm 31	232 \pm 22
5-HIAA	230 \pm 19	189 \pm 14	232 \pm 57	83 \pm 15 ^b	92 \pm 7	116 \pm 10	119 \pm 21	142 \pm 24

All animals received two injections a day of an identical dose of MDMA (5, 10 and 20 mg/kg), alone or plus cocaine (25 mg/kg), over 3 days (6 administrations). Data are presented as mean values \pm S.E.M. Differences from respective control (M0 or Cocaine) ^a P <0.01; ^b P <0.05.

to adolescent rats, and findings have not been concordant. Following chronic treatment throughout adolescence with 10 mg/kg of MDMA, 5 days after the last administration, an anxiolytic effect was observed, with an increase in time spent in the open arms (Piper and Meyer, 2004). However, after a similar treatment, no alterations were evident in performance in the plus maze 10 days later (Piper et al., 2005). Recently, Faria et al. (2006) reported an increased anxiety-like behaviour (decreased number of entries in the open arms) 10 days after adolescent rats were exposed to three administrations of 10 mg/kg of MDMA. Most of the studies evaluating the long-term effects of MDMA administration on anxiety have been performed with adult rats, in which increases (Gurtman et al., 2002; Walker et al., 2007), reductions (Mechan et al., 2002), and no changes (Sumnall et al., 2004; Ho et al., 2004; Cassel et al., 2005) have once more been observed in the animals' levels of anxiety. These disparate results may be explained firstly by the use of different species (rats versus mice), in which the interaction of MDMA with monoaminergic systems has been shown to differ (Easton and Marsden, 2006), secondly by variations in the treatment schedules (doses and number of exposures) employed, and thirdly by the different time lapses between the final drug administration and execution of the behavioural test.

Cocaine induces a well-known anxiogenic effect in the elevated plus maze after acute injection (Rogerio and Takahashi, 1992a,b; Yang et al., 1992), chronic treatment (Hayase et al., 2005) and following a withdrawal period (Paine et al., 2002; Hayase et al., 2005). However, aversion is less pronounced in the black/white box test after chronic cocaine treatment (Costall et al., 1989). Recently, we have reported that adolescent mice that have undergone a cocaine binge (nine doses) exhibit less anxiety in adulthood than those treated at the same age with saline (Estelles et al., 2007). The present results reconfirm these data and extend them, since we found that the anxiolytic effect was not affected by MDMA co-administration.

In the social interaction test, an increase in the time dedicated to social behaviour was observed in adult mice exposed to MDMA during adolescence; an effect that was not altered by concurrent cocaine consumption. Our results are in concordance with those of Morley-Fletcher et al. (2002), who described an increase in social contact in mice treated with a comparable pattern of MDMA administration in early adolescence (postnatal day 28). However, these findings contrast with others that suggest that the acute effects of MDMA induce a marked decrease of social contacts in mice (Navarro and Maldonado, 1999; Maldonado and Navarro, 2001; Navarro et al., 2004). The long-term changes in social interaction after MDMA exposure during adolescence has been studied mainly in rats, with the most regular finding being a decrease in the time animals spend engaged in these behaviours (Fone et al., 2002; Bull et al., 2003, 2004; Clemens et al., 2005, 2007). In addition to the use of other species of laboratory animal in these studies, another important variation with our procedure is that they exposed both groups of test animals to the drug during adolescence. In our protocol, the behaviour of the experimental mouse is never affected by that of the opponent (non-treated). Another important difference is that, in the aforementioned works, under the term "social behaviour", the authors included aggressive, avoidance, passive and exploratory behaviours, which are analyzed separately in our study.

Accordingly with previous observations, experience of cocaine during adolescence is not sufficient to alter the later social behaviour of mice (Estelles et al., 2006). The present results build on these previous findings, showing that cocaine does not alter the pro-social action of MDMA. However, we found that cocaine induced an increase in aggression. There are no concordant results regarding the effects of cocaine on aggressive behaviour in humans (Dhossche, 1999; Moeller et al., 1997), or in animals (Estelles et al., 2004; Miczek, 1979; Miczek and O'Donnell, 1978). Although we have previously reported that cocaine administration during adolescence does not increase aggression in adulthood (Estelles et al., 2006), the pattern of drug injection employed in that study differed from that used here. On the other

hand, an increase of aggression has been reported in hamsters treated during adolescence with a low dose of cocaine (Harrison et al., 2000). Moreover, mice exposed prenatally to cocaine showed a weaker response to the anti-aggressive actions of morphine and exhibited threat behaviours after receiving a low dose of cocaine in adulthood (Estelles et al., 2005, 2006). A consistent behavioural tendency in our studies with cocaine is the more pronounced avoidance and flee behaviours exhibited by the mice (Estelles et al., 2004), which were also observed in the present study. MDMA counteracts this increase, as mice exposed to cocaine plus MDMA do not display this kind of behaviour. In conclusion, exposure to MDMA during adolescence provokes an increase in the time that adult animals spend in social interactions with conspecifics; an effect that is not influenced by cocaine co-administration. Experience with cocaine during this phase increases the time that animals spend in the open arms of the plus maze, leading to an anxiolytic-like profile that is unaffected by MDMA co-administration. Consequently, animals exposed to both drugs during adolescence present a different behavioural profile in adulthood, exhibiting less anxiety and more social behaviour.

Our results are in accordance with most previously published data showing that pre-exposure to MDMA, either in adolescent or in adult mice or rats, induces a subsequent increase in activity (Marston et al., 1999; Morley-Fletcher et al., 2002; Timár et al., 2003). Equally, it has previously been reported that prenatal or adolescent exposure to cocaine increases spontaneous motor activity in adult mice (Estelles et al., 2005; Estelles et al., 2007). This general increase observed in mice treated with cocaine is mainly due to the maintenance of activity between the third and sixth hour. These animals do not adapt to the novel environment in which measurement takes place in the same way that controls or MDMA-treated animals do. This effect is not counteracted by co-administration of MDMA, as even the mice treated with cocaine and the highest MDMA dose (20 mg/kg) showed greater increases. These results are confirmed by the increased number of total entries of the animals of these groups in the plus maze. However, no increases in Non-social Exploration (a behaviour strongly affected by the motor activity of animals) were observed during the social interaction test. In fact, slight decreases were detected in animals treated with cocaine and MDMA.

It is worth mentioning that hardly any dose-response effects were obtained with the MDMA doses employed. This lack of sensitive response could be due to the range of doses employed, which were fully effective and chosen in order to study long-term effects.

It is well-known that MDMA is neurotoxic for dopaminergic terminals in the mouse brain (Logan et al., 1988; Laverty and Logan 1990; Miller and O'Callaghan, 1994; Colado et al., 2001; O'Shea et al., 2001; Saadat et al., 2006), which our results confirm to be the case for adolescent mice too. We found no changes in the serotonin content after MDMA administration, which is in accordance with most previous reports (Battaglia et al., 1988; O'Callaghan and Miller, 1994; Colado et al., 2001; O'Shea et al., 2001; Escobedo et al., 2005; Saadat et al., 2006) except for that of Achat-Mendes et al. (2005), who did detect a depletion of serotonin. In all of these studies, MDMA was administered to adult mice, which have proven to be more sensitive to the neurotoxic damage induced by MDMA, in addition to presenting a more intense hyperthermic response (Reveron et al., 2005).

Nevertheless, no neurotoxic damage to either dopamine or serotonin was observed after treating the mice with cocaine plus MDMA. In accordance with our results, another study reported that pre-treatment with the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 prevented long-term loss in the striatal serotonergic concentration (O'Shea et al., 2001). This lack of neurotoxicity could have several explanations. Firstly, the effect of cocaine plus MDMA on rectal temperature is completely different to that of MDMA alone. In our treatment schedule, only those mice receiving 20 mg/kg of MDMA presented an increase in their temperature, and no changes were observed when cocaine was combined with any of the MDMA doses. Most of the

evidence suggests that merely preventing MDMA-induced hyperthermia is enough to produce significant neuroprotection (Colado et al., 2001). A second possibility is that cocaine interferes with the dopamine uptake system by inhibiting the entry of MDMA into the nerve terminal. Despite the fact that the present paper supports the role of a rise in temperature as an important element in MDMA-induced neurotoxicity, this phenomenon appears to involve more than MDMA metabolites, including dopamine deamination and/or autooxidation (Sprague and Nichols, 2005). By affecting one or several of these processes, cocaine is capable of blocking dopamine neurodegeneration in the mouse brain.

Our results demonstrate that the behavioural and neurochemical effects of exposure to MDMA, alone or plus cocaine, are not related. MDMA induces a well-known dopaminergic neurotoxic lesion in mice, which exhibit a pro-social behaviour during the social interaction test. On the other hand, when MDMA is co-administered with cocaine, no dopaminergic lesion is detected, and these animals, besides displaying pro-social behaviour, exhibit an anxiolytic profile in the plus maze. These findings lead us to suggest that the long-term social effects of MDMA are independent of the dopaminergic lesion it produces. Our results highlight that exposure to MDMA plus cocaine during adolescence induces more complex behavioural changes in adulthood without exerting any neurochemical effects. Thus, the decrease in dopaminergic activity observed in MDMA-treated mice does not seem to be related with the behavioural outcome observed. In this way, there must be a cause other than neurotoxic damage for the behavioural changes observed in the animals.

The findings obtained in the present study may help to explain the consequences of the combined use of cocaine and MDMA by poly-drug users, and confirm adolescence to be a period during which the effects of psychoactive drugs induce long-term effects. Our results highlight pronounced alterations in the behaviour of adult mice after exposure to MDMA and cocaine during adolescence, and demonstrate that these long-term effects can occur without the dopaminergic system being affected.

Acknowledgements

We wish to thank Mr. Brian Normanly for his editing of the manuscript. This work was supported by the following grants: Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud "Carlos III" (FIS), RETICS, Red de Trastornos Adictivos (RD06/001/0016), Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Investigación and FEDER (SEJ2005-00316/PSIC) (Spain), Generalitat Valenciana, Agencia Valenciana de Salud, Dirección General de Drogodependencias (FEPAD).

References

Achat-Mendes, C., Ali, S.F., Itzhak, Y., 2005. Differential effects of amphetamines-induced neurotoxicity on appetitive and aversive Pavlovian conditioning in mice. *Neuropsychopharmacology* 30, 1128–1137.

Balogh, B., Molnar, E., Jakus, R., Quate, L., Olverman, H.J., Kelly, P.A., Kantor, S., Bagdy, G., 2004. Effects of a single dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on circadian patterns, motor activity and sleep in drug-naïve rats and rats previously exposed to MDMA. *Psychopharmacology* 173, 296–309.

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

Brain, P.F., Benton, D., Childs, G., Parmigiani, S., 1981. The effect of the type of opponent in test of murine aggression. *Behav. Processes* 6, 319–327.

Brain, P.F., McAllister, K.H., Walmsley, S.V., 1989. Drug effects on social behaviors. In: Boulton, A.A., Bake, G.B., Greenshaw, A.J. (Eds.), *Methods in Ethnopharmacology*. Psychopharmacology (series: Neuromethods, vol 13). The Humana Press Inc, NJ, Clifton, NJ, pp. 687–739.

Bull, E.J., Hutson, P.H., Fone, K.C., 2003. Reduced social interaction following 3,4-methylenedioxymethamphetamine is not associated with enhanced 5-HT2C receptor responsiveness. *Neuropsychopharmacology* 44, 439–448.

Bull, E.J., Hutson, P.H., Fone, K.C., 2004. Decreased social behaviour following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is accompanied by changes in 5-HT2A receptor responsiveness. *Neuropsychopharmacology* 46, 202–210.

Casael, J.C., Riepert, C., Rutz, S., Koenig, J., Rothmaier, K., Cosquer, B., Lazarus, C., Birmelmer, A., Jeltsch, H., Jones, B.C., Jackisch, R., 2005. Ethanol, 3,4-methylene-

dioxymethamphetamine (ecstasy) and their combination: long-term behavioral, neurochemical and neuropharmacological effects in the rat. *Neuropsychopharmacology* 30, 1870–1882.

Clemens, K.J., Cornish, J.L., Li, K.M., Hunt, G.E., McGregor, I.S., 2005. MDMA (‘Ecstasy’) and methamphetamine combined: order of administration influences hyperthermic and long-term adverse effects in female rats. *Neuropsychopharmacology* 45, 195–207.

Clemens, K.J., Cornish, J.L., Hunt, G.E., McGregor, I.S., 2007. Repeated weekly exposure to MDMA, methamphetamine or their combination: long-term behavioural and neurochemical effects in rats. *Drug Alcohol Depend.* 86, 183–190.

Colado, M.I., Camarero, J., Mechan, A.O., Sanchez, V., Esteban, B., Elliott, J.M., Green, A.R., 2001. A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ‘ecstasy’) on dopamine neurons in mouse brain. *Br. J. Pharmacol.* 134, 1711–1723.

Compas, B.E., Hinden, B.R., Gerhardt, C.A., 1995. Adolescent development: pathways and processes of risk and resilience. *Annu. Rev. Psychol.* 46, 265–293.

Costall, B., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Onaivi, E.S., 1989. The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33, 197–203.

Daza-Losada, M., Ribeiro Do Couto, B., Manzanedo, C., Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M., Millarro, J., 2007. Rewarding effects and reinstatement of MDMA-induced CPP in adolescent mice. *Neuropsychopharmacology* 32, 1750–1759.

Dhossche, D.M., 1999. Aggression and recent substance abuse: absence of association in psychiatric emergency room patients. *Compr. Psychiatry* 40, 343–346.

Easton, N., Marsden, C.A., 2006. Ecstasy: are animal data consistent between species and can they translate to humans? *J. Psychopharmacol.* 20, 194–210.

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

Estelles, J., Rodríguez-Arias, M., Aguilar, M.A., Minarro, J., 2004. Social behavioural profile of cocaine in isolated and grouped male mice. *Drug Alcohol Depend.* 76, 115–123.

Estelles, J., Rodríguez-Arias, M., Maldonado, C., Aguilar, M.A., Minarro, J., 2005. Prenatal cocaine exposure alters spontaneous and cocaine-induced motor and social behaviors. *Neurotoxicol. Teratol.* 27, 449–457.

Estelles, J., Lluich, J., Rodríguez-Arias, M., Aguilar, M.A., Millarro, J., 2006. Cocaine exposure during adolescence affects anxiety in adult mice. *Brain Res. Bull.* 71, 393–403.

Estelles, J., Lluich, J., Rodríguez-Arias, M., Aguilar, M.A., Minarro, J., 2007. Cocaine exposure during adolescence affects anxiety in adult mice. *Brain Res. Bull.* 71, 393–403.

Faria, R., Magalhães, A., Monteiro, P.R., Gomes-Da-Silva, J., Amelia Tavares, M., Summaville, T., 2006. MDMA in adolescent male rats: decreased serotonin in the amygdala and behavioral effects in the elevated plus-maze test. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1074, 643–649.

Fone, K.C., Beckett, S.R., Topham, I.A., Swettenham, J., Ball, M., Maddocks, L., 2002. Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity. *Psychopharmacology* 159, 437–444.

Gawin, H.H., 1991. Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* 251, 1580–1586.

Gerra, G., Zaimovic, A., Guastro, G., Maestri, D., Monica, C., Sartori, R., Cacavari, R., Delagnore, R., 1998. Serotonergic function after (+)-3,4-methylene-dioxymethamphetamine (‘Ecstasy’) in humans. *Int. Clin. Psychopharmacol.* 13, 1–9.

Gurtman, C.G., Morley, K.C., Li, K.M., Hunt, G.E., McGregor, I.S., 2002. Increased anxiety in rats after 3,4-methylenedioxymethamphetamine: association with serotonin depletion. *Eur. J. Pharmacol.* 446, 89–96.

Harrison, R.J., Connor, D.E., Nowak, C., Melloni Jr, R.H., 2000. Chronic low-dose cocaine treatment during adolescence facilitates aggression in hamsters. *Physiol. Behav.* 69, 555–562.

Hayase, T., Yamamoto, Y., Yamamoto, K., 2005. Persistent anxiogenic effects of a single or repeated doses of cocaine and methamphetamine: interactions with endogenous cannabinoid receptor ligands. *Behav. Pharmacol.* 16, 395–404.

Ho, Y.J., Pawlak, C.R., Guo, L., Schwarting, R.K., 2004. Acute and long-term consequences of single MDMA administration in relation to individual anxiety levels in the rat. *Behav. Brain Res.* 149, 135–144.

Lavery, R., Logan, B.J., 1990. Protection by MK 801 and other drugs of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats and mice. *Eur. J. Pharmacol.* 183, 451–452.

Laviola, G., Adriani, W., Terranova, M.L., Gerra, G., 1999. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 993–1010.

Laviola, G., Macià, S., Morley-Fletcher, S., Adriani, W., 2003. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 19–31.

Lin, H.Q., Burden, P.M., Christie, M.J., Johnston, G.A., 1999. The anxiogenic-like and anxiolytic-like effects of MDMA on mice in the elevated plus-maze: a comparison with amphetamine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 62, 403–408.

Lluich, J., Rodríguez-Arias, M., Aguilar, M.A., Minarro, J., 2005. Role of dopamine and glutamate receptors in cocaine-induced social effects in isolated and grouped male OF1 mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82, 478–487.

Logan, B.J., Lavery, R., Sanderson, W.D., Yee, Y.B., 1988. Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethamphetamine) neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 152, 227–234.

Maldonado, E., Navarro, J.F., 2001. MDMA (‘ecstasy’) exhibits an anxiogenic-like activity in social encounters between male mice. *Pharmacol. Res.* 44, 27–31.

Marston, H.M., Reid, M.E., Lawrence, J.A., Olverman, H.J., Butler, S.P., 1999. Behavioural analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat. *Psychopharmacology* 144, 67–76.

Mechan, A.O., Moran, P.M., Elliott, M., Young, A.J., Joseph, M.H., Green, R., 2002. 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* 159, 167–175.

Miczek, K.A., 1979. A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of *D*-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology* 60, 253–259.

Miczek, K.A., O'Donnell, J.M., 1978. Intruder-evoked aggression in isolated and non-isolated mice: effects of psychomotor stimulants and *L*-Dopa. *Psychopharmacology* 57, 47–55.

Miller, D.B., O'Callaghan, J.P., 1994. Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 752–760.

Moeller, F.C., Dougherty, D.M., Rustin, T., Swann, A.C., Allen, T.J., Shah, N., Cherek, D.R., 1997. Antisocial personality disorder and aggression in recently abstinent cocaine dependent subjects. *Drug Alcohol Depend.* 44, 175–182.

Montgomery, C., Fisk, J.E., Newcombe, R., Murphy, P.N., 2005. The differential effects of ecstasy/polydrug use on executive functions: shifting, inhibition, updating and access to semantic memory. *Psychopharmacology* 182, 262–276.

Morley-Fletcher, S., Bianchi, M., Gerra, G., Laviola, G., 2002. Acute and carryover effects in mice of MDMA ("ecstasy") administration during periadolescence. *Eur. J. Pharmacol.* 448, 31–38.

Mugford, R.A., Nowell, N.W., 1970. Pheromones and their effect on aggression in mice. *Nature* 226, 967–968.

Navarro, J.F., Maldonado, E., 1999. Behavioral profile of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in agonistic encounters between male mice. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 23, 327–334.

Navarro, J.F., Maldonado, E., 2002. Acute and subchronic effects of MDMA ("ecstasy") on anxiety in male mice tested in the elevated plus-maze. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 26, 1151–1154.

Navarro, J.F., Rivera, A., Maldonado, E., Casas, M., de la Calle, A., 2004. Anxiogenic-like activity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in the social interaction test is accompanied by an increase of *c-fos* expression in mice amygdala. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28, 249–254.

O'Callaghan, J.P., Miller, D.B., 1994. Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 741–751.

O'Shea, E., Esteban, B., Camarero, J., Green, A.R., Colado, M.L., 2001. Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ("ecstasy") on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacology*, 40, 65–74.

Paine, T.A., Jackman, S.L., Olmstead, M.C., 2002. Cocaine-induced anxiety: alleviation by diazepam, but not buspirone, dimethylhydriate or diphenhydramine. *Behav. Pharmacol.* 13, 511–523.

Parrott, A.C., Milani, R.M., Parmar, R., Turner, J.D., 2001. Recreational ecstasy/MDMA and other drug users from the UK and Italy: psychiatric symptoms and psychological problems. *Psychopharmacology* 159, 77–82.

Pellow, S., File, S.E., 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 525–529.

Piper, B.J., Meyer, J.S., 2004. Memory deficit and reduced anxiety in young adult rats given repeated intermittent MDMA treatment during the periadolescent period. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 79, 723–731.

Piper, B.J., Fraiman, J.B., Meyer, J.S., 2005. Repeated MDMA ("Ecstasy") exposure in adolescent male rats alters temperature regulation, spontaneous motor activity, attention, and serotonin transporter binding. *Dev. Psychobiol.* 47, 145–157.

Reay, J.K., Hamilton, C., Kennedy, D.O., Scholey, A.B., 2006. MDMA polydrug users show process-specific central executive impairments coupled with impaired social and emotional judgement processes. *J. Psychopharmacol.* 20, 385–388.

Reveron, M.E., Monks, T.J., Duvachelle, C.L., 2005. Age-dependent (+)MDMA-mediated neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 26, 1031–1040.

Ribeiro Do Couto, B., Aguilar, M.A., Rodríguez-Arias, M., Minarro, J., 2005. Cross-reinstatement by cocaine and amphetamine of morphine-induced place preference in mice. *Behav. Pharmacol.* 16, 253–259.

Rodgers, J., 2000. Cognitive performance amongst recreational users of "ecstasy". *Psychopharmacology* 151, 19–24.

Rodgers, R.J., Cutler, M.G., Jackson, J.E., 1997. Behavioural effects in mice of subchronic chlorthalidoxepoxide, maprotiline and fluvoxamine. II. The elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 127–136.

Rodríguez-Arias, M., Minarro, J., Aguilar, M.A., Pinazo, J., Simon, V.M., 1998. Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *Eur. Neuro-psychopharmacol.* 8, 95–103.

Rogério, R., Takahashi, R.N., 1992a. Anxiogenic action of acute but not repeated cocaine administration in handling-habituated mice in the plus-maze test. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25, 713–716.

Rogério, R., Takahashi, R.N., 1992b. Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 43, 631–633.

Saadat, K.S., Elliott, J.M., Colado, M.L., Green, A.R., 2006. The acute and long-term neurotoxic effects of MDMA on marble burying behaviour in mice. *J. Psychopharmacol.* 20, 264–271.

Segal, D.S., Kuczenski, R., 1997. An escalating dose "binge" model of amphetamine psychosis: behavioral and neurochemical characteristics. *J. Neurosci.* 17, 2551–2566.

Smoothy, R., Brain, P.F., Berry, M.S., Haug, M., 1986. Alcohol and social behaviour in group-housed female mice. *Physiol. Behav.* 37, 689–694.

Spear, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417–463.

Sprague, J.E., Nichols, D.E., 2005. Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): beyond metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 59–60.

Sumnall, H.R., O'Shea, E., Marsden, C.A., Cole, J.C., 2004. The effects of MDMA pretreatment on the behavioural effects of other drugs of abuse in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77, 805–814.

Terranova, M.L., Laviola, G., Alleve, E., 1993. Ontogeny of amicable social behavior in the mouse: gender differences and ongoing isolation outcomes. *Dev. Psychobiol.* 26, 467–481.

Terranova, M.L., Laviola, G., de Acetis, L., Alleve, E., 1998. A description of the ontogeny of mouse agonistic behavior. *J. Comp. Psychol.* 112, 3–12.

The National Survey on Drug Use and Health, 2004. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) (2005). World drug report, vol. 1. Analysis. Vienna: UNODC.

Timar, J., Gyarmati, S., Szabo, A., Furst, S., 2003. Behavioural changes in rats treated with a neurotoxic dose regimen of dextrorotatory amphetamine derivatives. *Behav. Pharmacol.* 14, 100–106.

von Sydow, K., Lieb, R., Pfister, H., Hoffer, M., Wittchen, H.U., 2002. Use, abuse and dependence of ecstasy and related drugs in adolescents and young adults—a transient phenomenon? Results from a longitudinal community study. *Drug Alcohol Depend.* 66, 147–159.

Walker, Q.D., Williams, C.N., Jotwani, R.P., Waller, S.T., Francis, R., Kuhn, C.M., 2007. Sex differences in the neurochemical and functional effects of MDMA in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology* 189, 435–445.

Wish, E.D., Fitzelle, D.B., O'Grady, K.E., Hsu, M.H., Arria, A.M., 2006. Evidence for significant polydrug use among ecstasy-using college students. *J. Am. Coll. Health* 55, 99–104.

Yang, X.M., Gorman, A.L., Dunn, A.J., Goeders, N.E., 1992. Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41, 643–650.

ANEXO III



Rewarding Effects and Reinstatement of MDMA-Induced CPP in Adolescent Mice

Manuel Daza-Losada¹, Bruno Ribeiro Do Couto¹, Carmen Manzanedo², Maria A Aguilar¹,
 Marta Rodríguez-Arias¹ and Jose Miñarro^{1*}

¹Facultad de Psicología, Departamento de Psicobiología, Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Universitat de València, Valencia, Spain; ²Departamento de Anatomía Humana y Psicobiología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, Murcia, Spain

Although the rewarding effects of 3,4-methylenedioxy-metamphetamine (MDMA) have been demonstrated in self-administration and conditioned place preference (CPP) procedures, its addictive potential (ie, the vulnerability to relapse, measured by its ability to induce reinstatement of an extinguished response), remains poorly understood. In this study, the effects of MDMA (5, 10, and 20 mg/kg) on the acquisition, extinction and reinstatement of CPP were evaluated in mice, using two different protocols during acquisition of CPP. In the first experiment, animals were trained using a two-session/day schedule (MDMA and saline for 1 consecutive days), whereas in the second experiment they were trained using an alternating day schedule (MDMA and saline each 48 h). After extinction, the ability of drug priming to reinstate CPP was evaluated. In Experiment 1, MDMA did not significantly increase the time spent in the drug-paired compartment during the post-conditioning (Post-C) test, although the preference was evident a week afterwards, lasting between 2 and 21 weeks. No reinstatement was observed after MDMA priming. In Experiment 2, all doses produced CPP in Post-C, which lasted between 1 and 4 weeks. MDMA induces reinstatement at doses up to 4 times lower than those used in conditioning. The analyses of brain monoamines revealed that the daily schedule of treatment induces a non-dose-dependent decrease in dopamine and serotonin (5-HT) in the striatum, whereas the alternating schedule produces a dose-dependent decrease of 5-HT in the cortex. These results demonstrate that MDMA produces long-lasting rewarding effects and reinstatement after extinction, suggesting the susceptibility of this drug to induce addiction.

Neuropsychopharmacology (2007) 32, 1750–1759; doi:10.1038/sj.npp.1301309; published online 14 February 2007

Keywords: MDMA; conditioned place preference; reinstatement; mice; dopamine; serotonin

INTRODUCTION

The illicit drug MDMA (3,4-methylenedioxy-metamphetamine), known on the street as 'Ecstasy', is a substituted amphetamine with euphoric and 'entactogenic' properties, including pleasant feelings, such as reduced anxiety, increased readiness to communicate, and lowered defensiveness (Nichols, 1986). Acute effects also include hyperactivity, mental perspicacity and reduced fatigue. These properties are probably the reason for the increasing use of MDMA in the last 15 years, especially in adolescent and young-adult populations during 'raves' or night parties, it currently being one of the most popular drugs of abuse in Europe (Cole and Sumnall, 2003).

MDMA induces the presynaptic release of dopamine (DA) and serotonin (5-HT) in rats (Gough *et al.*, 1991; Hiramatsu

and Cho, 1990; Kankaanpaa *et al.*, 1998; Koch and Galloway, 1997; Schmidt *et al.*, 1987; Yamamoto and Spanos, 1988) and raises extracellular DA and 5-HT in the nucleus accumbens (Nacc) (Kankaanpaa *et al.*, 1998; O'Shea *et al.*, 2005; White *et al.*, 1994), increasing preferentially DA transmission in the shell compared to the core of Nacc (Cadoni *et al.*, 2005). MDMA also produces a stimulatory effect on the release of acetylcholine in the rat prefrontal cortex, striatum, and dorsal hippocampus (Acquas *et al.*, 2001; Nair and Gudelsky, 2006). After the initial increase in synaptic levels of 5-HT, long-term depletions of this neurotransmitter and decreased 5-HT transporter binding have been frequently reported in rats (Boot *et al.*, 2002; McGregor *et al.*, 2003; Ricaurte *et al.*, 1985). Repeated MDMA administration also induces a sustained loss in DA, but not in 5-HT, in the mouse striatum (Colado *et al.*, 2004; Escobedo *et al.*, 2005; Stone *et al.*, 1987).

Studies with experimental animals have provided evidence of the rewarding effects of MDMA in the self-administration procedure. Primates (Beardsley *et al.*, 1986; Fantegrossi *et al.*, 2002, 2004; Lamb and Griffiths, 1987; Lile *et al.*, 2005), rats (Braida and Sala, 2002; Braida *et al.*, 2005; Cornish *et al.*, 2003; Daniela *et al.*, 2004; Schenk *et al.*, 2003),

*Correspondence: Dr J Miñarro, Facultad de Psicología, Departamento de Psicobiología, Universitat de València, Avda. Blasco Ibáñez, 21, 46101 Valencia, Spain. Tel: +34 96 386 40 20. Fax: +34 96 386 46 68. E-mail: jose.minarro@uv.es
 Received 10 August 2006; revised 31 October 2006; accepted 14 November 2006

and mice (Trigo *et al.*, 2006) learn to perform an operant response to obtain an infusion of MDMA, which suggests the addictive potential of this drug.

The conditioned place preference (CPP) paradigm is a relatively simple model that has been used to assess the affective or appetitive properties of drugs. This procedure is based on the fact that the pairing of neutral distinctive environmental stimuli with a drug (primary reward) results in an acquired preference for those specific stimuli (secondary or conditioned reward). The administration of MDMA produces CPP in rats (Bilsky and Reid, 1991; Bilsky *et al.*, 1990, 1991, 1998; Braida *et al.*, 2005; Cole *et al.*, 2003; Herzig *et al.*, 2005; Marona-Lewicka *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 2002; Schechter, 1991) and mice (Robledo *et al.*, 2004a, b; Salzman *et al.*, 2003).

As commented previously, the rewarding effects of MDMA have been repeatedly demonstrated (for a review, see Cole and Sumnall, 2003), however, the addictive potential of this drug remains poorly understood. Drug addiction can be considered as a chronic disorder characterized by relapse. Craving is a subjective feeling experienced by human drug addicts, which motivates them to seek the drug and can produce relapse (O'Brien, 1997). In laboratory animals, it is very difficult to evaluate craving but it is possible to measure relapse directly if after the acquisition and subsequent extinction of a particular behavioral response (eg. pressing a lever to obtain a drug injection) the animal reinitiates this response, often referred to as reinstatement (Carroll and Comer, 1996). This recovery of the learned response seems to reflect the re-induction of craving, leading to drug seeking following a period of extinction of drug use. The paradigm of CPP has been used recently to study the relapse phenomenon in animals. In this procedure, animals are first trained to acquire a CPP, which afterwards is extinguished by exposing the subjects to the previously drug-paired compartment in the absence of the drug. It has been observed that the same stimuli that reinstate self-administration are capable of inducing the reinstatement of CPP. The most important environmental events that may lead to reinstatement are re-exposure to the drug itself, presentation of drug-associated stimuli or cues and exposure to a stressful event (Maldonado *et al.*, 2006; Ribeiro Do Couto *et al.*, 2005a, b; Ribeiro Do Couto *et al.*, 2006; for a review, see Shalev *et al.*, 2002; Shaham *et al.*, 2003; Weiss, 2005).

The present study is the first to consider the long-term effects of MDMA on the extinction and reinstatement of CPP in adolescent mice. Taking into account the influence that the schedule used in the place conditioning procedure could have on the acquisition of CPP, we performed two separate experiments using two different protocols during acquisition of place conditioning. In the first experiment, animals were trained using a two-session/day schedule during acquisition (MDMA and saline were administered the same day for 4 consecutive days) during the conditioning phase of CPP, whereas in the second experiment they were trained using an alternating day schedule (four injections of MDMA and saline administered each 48 h). There was no other difference in experimental procedures. After the acquisition of MDMA-induced CPP, all animals underwent extinction sessions until the CPP was extinguished and, afterwards, the reinstating effects of the re-exposure to MDMA were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

A total of 200 male mice of the OF1 strain, 21 days of age, acquired commercially from Charles River (Barcelona, Spain) were used. They were housed in groups of four in plastic cages (25 × 25 × 14.5 cm) 5 days before experiments under the following conditions: constant temperature (21 ± 2°C), a reversed light schedule (white lights on: 19.30–07.30 h), and food and water available *ad libitum*, except during behavioral tests. Animals were handled for 2 days before the pre-conditioning (Pre-C) phase to reduce their stress levels in response to experimental manipulations. Procedures involving mice and their care were conducted in conformity with national, regional and local laws and regulations, which are in accordance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

Apparatus

For place conditioning, eight identical Plexiglas boxes with two equal size compartments (30.7 cm length × 31.5 cm width × 34.5 cm height) separated by a gray central area (13.8 cm, length × 31.5 cm, width × 34.5 cm height) were used. The compartments have different colored walls (black vs white) and also distinct floor textures (fine grid in the black compartment and wide grid in the white one). Four infrared light beams in each compartment of the box and six in the central area allowed the recording of the position of the animal and its crossings from one compartment to the other. The equipment was controlled by two IBM PC computers using MONPRE 2Z software (CIBERTEC, SA, Spain).

Drugs

Animals were injected i.p. with 5, 10, or 20 mg/kg of MDMA (±3,4-methylenedioxymetamphetamine hydrochloride, Laboratorios Sigma-Aldrich, Spain), in a volume of 0.01 ml/g. Control groups were injected with physiological saline (NaCl 0.9%), also used to dissolve the drugs.

Procedure of CPP

Acquisition. The place conditioning, consisting of three phases, was carried out during the dark cycle following a procedure unbiased in terms of initial spontaneous preference (for more details see Manzanedo *et al.*, 2001). During the first phase or pre-conditioning (Pre-C) mice were given access to both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) each day for 3 days. On day 3, the time spent by the animal in each compartment was recorded for 900 s. A total of 25 animals showing strong unconditioned aversion (<33% of the session time) or preference (>67%) for any compartment were discarded. In each group, half the animals received the drug or vehicle in one compartment and the other half in the other compartment. After assigning the compartments, an ANOVA showed that there were no significant differences between time spent in the drug-paired and the vehicle-paired compartments during

the Pre-C phase. In the second phase (conditioning), animals were conditioned with MDMA or saline through four pairings with the respective compartment. In Experiment 1, animals received two pairings each day: animals conditioned with MDMA received an injection of physiological saline before being confined to the vehicle-paired compartment for 30 min, and after an interval of 4 h, received MDMA immediately before confinement in the drug-paired compartment for 30 min; control animals received an injection of physiological saline before being confined for 30 min to first one compartment and then 30 min to the other, there being an interval of 4 h between each confinement (days 4–7, PN days 30–33). In Experiment 2, mice received only one pairing each day: animals conditioned with MDMA received an injection of MDMA immediately before confinement in the drug-paired compartment for 30 min on days 4, 6, 8, and 10 (PN days 30, 32, 34, and 36) and received physiological saline before being confined to the vehicle-paired compartment for 30 min on days 5, 7, 9, and 11; control animals received an injection of physiological saline before being confined for 30 min to first one compartment on days 4, 6, 8, and 10 and then 30 min to the other on days 5, 7, 9, and 11. The central area was never used during conditioning and was blocked by guillotine doors. During the third phase or post-conditioning (Post-C), on day 8 (Experiment 1) or 12 (Experiment 2), the guillotine doors separating the two compartments were removed and the time spent by the untreated mice in each compartment was recorded during 900 s of observation (Post-C tests were performed between 1000 and 1400 hours). The difference in seconds between the time spent in the drug-paired compartment in the Post-C test and that spent in the Pre-C test is a measure of the degree of conditioning induced by the drug. If this difference is positive then the drug has induced a preference for the drug-paired compartment, whereas the opposite indicates the induction of an aversion.

Extinction: Control and MDMA-conditioned groups underwent a weekly extinction session which consisted of the placement of animals in the apparatus (without guillotine doors separating the compartments) for 15 min until the time spent in the drug-paired compartment for each group conditioned with MDMA was similar to those of Pre-C. Thus, in each group, all the animals received the same number of extinction sessions, independently of their individual scores, as the criterion of extinction was a lack of significant differences with respect to Pre-C values. Saline-conditioned groups only performed one extinction session to confirm the lack of CPP. The extinction of CPP was always confirmed in a subsequent session performed 48 h after the last extinction session. A weekly extinction was chosen on the basis of a previous study that used this schedule to evaluate drug-priming reinstatement of D-methamphetamine CPP (Li et al, 2002).

Reinstatement: The effects of a priming dose of MDMA were evaluated 48 h after the confirmation of extinction. The tests of reinstatement (performed between 1000 and 1400 hours) were the same as for Post-C (free ambulation for 15 min) except that animals were tested 15 min after the administration of the respective dose of MDMA.

Analysis of biogenic amines: Eight separate groups of animals received the same schedules of treatment as in the first and second experiment, that is, four daily consecutive injections (daily schedule of treatment) or four injections on alternating days (intermittent schedule) of saline, 5, 10, or 20 mg/kg of MDMA. At the corresponding time of test, 24 (daily schedule) or 48 (intermittent schedule) h after the last injection, mice were killed by cervical fracture. Within 2 min their brains were removed and placed on an ice-cold plate. The striatum, cortex, and hippocampus were dissected out, frozen on dry ice and stored at -80°C . The tissue was thawed, weighed and then, homogenized in 200 μl of perchloric acid (0.1 N) using ultrasounds. The homogenate was centrifuged at 14 000 r.p.m. for 30 min. The supernatant was divided into aliquots for the analysis of biogenic amines. DA, dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), homovanilic acid (HVA), 5-HT, and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) were analyzed in a high performance liquid chromatograph (Agilent 1100 series HPLC). Samples were applied to a column (0.5 μm , 12.5 cm, 4.6 cm; Agilent Zorbax High Pressure Cartridge Guard-column). An isocratic mobile phase consisting of 0.10 M chloroacetic acid, 0.70 mM EDTA, 1.0 mM sodium octylsulfate (pH 3.25) in 14% methanol was passed through the column at a constant flow of 1 ml/min. The column was maintained at 21°C . Analytes were oxidized on a glassy carbon electrode maintained at 300 mV (450 mV for HVA detection) against a Ag/AgCl reference electrode (BAS). The complete separation of biogenic amines was achieved in 25 min. Data were collected and analyzed using the Merck-Hitachi software package (Model D-7000). Levels of 5-HT and 5-HIAA were analyzed in striatum, cortex and hippocampus. Moreover, levels of DA, DOPAC, and HVA were analyzed in striatum.

Statistical analysis: To evaluate the acquisition of CPP in both experiments, data of the time spent in the drug-paired compartment were analyzed with a mixed ANOVA with a between subjects variable 'MDMA dose' with four levels (SAL, MDMA 5, 10, and 20), and a within subjects variable 'Days' with two levels (Pre-C and Post-C). Newman-Keuls tests were used to make *post hoc* comparisons. With the data of Post-C, a separate one-way ANOVA with a between factor (MDMA dose) was performed when the variable MDMA Dose resulted significant on Post-C day. During extinction and reinstatement tests, differences in time spent in the drug-paired compartment between Pre-C and each extinction session or reinstatement test were analyzed with a Student's *t*-test. Each monoamine or metabolite in each of the brain structures studied was analyzed using a two-way ANOVA with two between variables 'Schedule of Treatment' with two levels (Daily and Alternating) and 'MDMA Dose' with four levels (SAL, MDMA 5, 10 and 20).

RESULTS

Experiment 1

Effects of MDMA on acquisition, extinction and reinstatement of place preference using a two-session/day schedule during acquisition of place conditioning. The results obtained in Experiment 1 are represented in Figure 1.

Acquisition

The ANOVA revealed a significant effect of the variable Days ($F(1,36) = 4.830$; $P < 0.0345$). The variable MDMA Dose ($F(3,36) = 0.736$; $P < 0.5376$) and the Interaction MDMA dose \times days ($F(3,36) = 1.224$; $P < 0.315$) were not significant.

Extinction

Animals treated with saline did not present CPP on Post-C days and nor did they exhibit CPP in the first extinction session. Conversely, although animals conditioned with 5 mg/kg of MDMA did not present CPP in Post-C, they exhibited a clear CPP when tested in the first extinction session performed a week after Post-C ($P < 0.001$, significant difference with respect to Pre-C) and this CPP lasted 1 week more ($P < 0.01$). Similarly, in the first extinction session animals conditioned with 10 and 20 mg/kg showed CPP, which lasted for twelve weeks ($P < 0.05$) and 21 weeks more ($P < 0.05$), respectively.

Reinstatement

The dose of 2.5 mg/kg of MDMA did not produce reinstatement in animals conditioned with saline. In animals conditioned with 5, 10, or 20 mg/kg of MDMA, after confirmation of extinction, an injection with half of the dose used for conditioning (2.5, 5 or 10 mg/kg, respectively) also failed to produce reinstatement.

Experiment 2

Effects of MDMA on acquisition, extinction and reinstatement of place preference using an alternating day schedule during acquisition of place conditioning. The results obtained in Experiment 2 are represented in Figure 2.

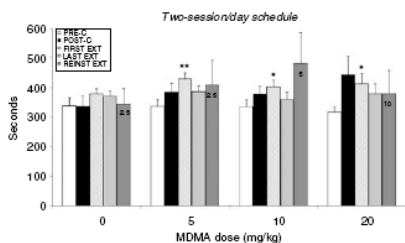


Figure 1 Acquisition, extinction and reinstatement of MDMA-induced CPP using a two-session/day schedule during the conditioning phase in four groups of animals ($n = 10$): 0, animals receiving saline in both compartments; 5, 10, and 20, animals receiving 5, 10, or 20 mg/kg of MDMA in the drug-paired compartment. The bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (white bars), after conditioning sessions (black bars), in the first extinction session (dashed bars), in the last extinction session (light gray bars) and in the reinstatement test (dark gray bars). Each reinstatement bar contains the dose of MDMA (mg/kg) used as priming. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, significant difference in the time spent in Pre-C vs Post-C sessions or reinstatement tests.

Acquisition

The ANOVA revealed a significant effect of the variables MDMA dose ($F(3,53) = 2.837$; $P < 0.0467$) and days ($F(1,53) = 44.581$; $P < 0.0001$) and the Interaction MDMA dose \times days ($F(3,53) = 8.021$; $P < 0.0002$). Simple effects of the interaction indicated that the effects of MDMA Dose was significant only in Post-C ($P < 0.001$) and the effects of days was significant in the groups receiving each dose of MDMA ($P < 0.001$). A separate ANOVA performed with the data of Post-C revealed a significant effect of MDMA dose ($F(3,53) = 8.378$; $P < 0.0001$). *Post hoc* comparison demonstrated that animals treated with MDMA spent more time in the drug-paired compartment in comparison to animals receiving saline ($P < 0.01$).

Extinction

Animals treated with saline did not present CPP on Post-C days and nor in the first extinction session. Conversely, those treated with 5 or 20 mg/kg of MDMA showed CPP through four extinction sessions ($P < 0.05$), it disappearing in the fifth session (lack of significant differences with Pre-C). Animals treated with 10 mg/kg of MDMA presented CPP only in the first extinction session ($P < 0.05$) but not in the second.

Reinstatement

The dose of 10 mg/kg of MDMA did not produce the reinstatement of CPP in animals conditioned with saline. In those conditioned with 5 mg/kg of MDMA, after confirmation of extinction, the dose of 2.5 mg/kg of MDMA produced

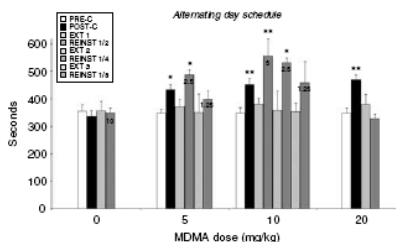


Figure 2 Acquisition, extinction and reinstatement of MDMA-induced CPP using an alternating day schedule during the conditioning phase in four groups of animals: 0, animals receiving saline in both compartments ($n = 14$); 5, 10, and 20, animals receiving 5, 10, or 20 mg/kg of MDMA in the drug-paired compartment ($n = 14, 13, 14$, respectively). The bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning sessions (white bars), after conditioning sessions (black bars), in the last extinction session (light gray bars) and in the reinstatement test (dark gray bars) after a priming injection of MDMA at half of the dose used to induce CPP (1/2). In those groups which presented reinstatement of CPP, after a new extinction, the priming effects of a dose corresponding to a quarter (1/4) and an eighth (1/8) of the dose used to induce CPP. Each reinstatement bar contains the dose of MDMA (mg/kg) used as priming. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, significant difference in the time spent in Pre-C vs Post-C sessions or reinstatement tests.

reinstatement ($P < 0.05$), which lasted 1 week ($P < 0.05$). After confirmation of a new extinction, the dose of 1.25 mg/kg of MDMA did not produce reinstatement (approximately eight weeks after Post-C). In animals conditioned with 10 mg/kg of MDMA, after confirmation of extinction, the dose of 5 mg/kg of MDMA produced the reinstatement of CPP ($P < 0.01$), which lasted one week ($P < 0.05$). After confirmation of a new extinction, the dose of 2.5 mg/kg of MDMA again produced reinstatement ($P < 0.05$), approximately eight weeks after Post-C. After confirmation of a new extinction, the dose of 1.25 mg/kg of MDMA did not produce reinstatement (approximately seven weeks after Post-C). In animals conditioned with 20 mg/kg of MDMA, after confirmation of extinction, 10 mg/kg of MDMA did not produce the reinstatement of CPP, approximately five weeks after Post-C.

Analysis of Biogenic Amines

The results obtained are represented in Figures 3–6.

Cortex

A decrease in the amount of 5-HT was obtained in mice treated with the low dose of MDMA with the daily regimen and after received 10 or 20 mg/kg of MDMA with an alternating schedule. Irrespective of the regimen employed, after receiving 10 mg/kg of MDMA the amount of 5-HIAA was higher than in the other groups. Conversely, after receiving the highest dose of MDMA with an alternating regimen, the level of this metabolite was lower (Figure 3).

Hippocampus

Irrespective of the schedule employed, mice treated with the higher doses of MDMA presented a decrease in 5-HT and 5-HIAA. In addition, the low dose decreased this metabolite only with the alternating schedule (Figure 4).

Striatum

5-HT was lower in animals treated with the daily regimen, there not being a significant decrease in those receiving MDMA on alternate days. The low and intermediate doses of MDMA decreased the amount of 5-HIAA (Figure 5). Administration of 5 or 10 mg/kg of MDMA decreased DA concentration in the mice treated with the daily regimen, as there were no differences between groups on the alternating regimen. The DOPAC level was higher in the animals treated with 10 or 20 mg/kg of MDMA with the daily regimen. Administration of MDMA decreased HVA concentration in comparison with the other two groups, except for the higher dose administered with the daily schedule (Figure 6).

DISCUSSION

The results obtained show that daily and alternating schedules of MDMA administration produced different behavioral and neurochemical effects. The main findings are that two different schedules of MDMA treatment yield different effects on CPP (as assessed by acquisition,

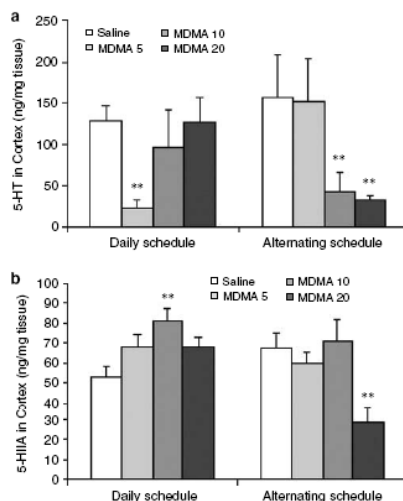


Figure 3 Effects of MDMA (5, 10, or 20 mg/kg) on the concentrations of 5-HT (a) and 5-HIAA (b) in the cortex following daily or alternating schedule of administration. In the daily schedule, animals received four injections of the MDMA dose on 4 consecutive days and the levels of biogen amines were tested 24 h after the last injection. In the alternating schedule, animals received four injections of the MDMA dose each 48 h through 8 days and amine levels were evaluated 48 h after the last injection. ** $P < 0.01$, significant difference with respect to saline group.

extinction and reinstatement) and that the MDMA priming produces a reinstatement of MDMA-induced CPP. Overall, our results confirm the rewarding effects of MDMA and demonstrate that this drug can produce long-term effects which influence the vulnerability of the animals to relapse after withdrawal.

MDMA-Induced Reinstatement of CPP

The most important and original results observed in the present study are the long-term effects of MDMA on reward processes, as the reinstating effects of MDMA exposure after extinction have not been evaluated previously. Here, using the place conditioning paradigm, we observed that re-exposure to MDMA after extinction of CPP reinstates its conditioned rewarding effects. The reinstatement of previously extinguished CPP is observed with half of the dose used during conditioning in animals which demonstrated CPP after the low and medium dose (priming of 2.5 and 5 mg/kg of MDMA, respectively). Moreover, the animals conditioned with the medium dose of MDMA (10 mg/kg) also present reinstatement after the re-exposure to a quarter of the dose previously used during conditioning (2.5 mg/kg) after a new extinction of reinstatement induced by 5 mg/kg. Conversely, animals which received the high dose of MDMA

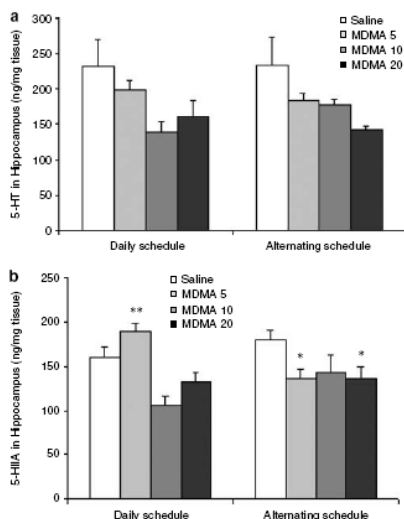


Figure 4 Effects of MDMA (5, 10, or 20 mg/kg) on the concentrations of 5-HT (a) and 5-HIAA (b) in the hippocampus following daily or alternating schedule of administration. In the daily schedule, animals received four injections of the MDMA dose on four consecutive days and the levels of biogen amines were tested 24 h after the last injection. In the alternating schedule, animals received 4 injections of the MDMA dose each 48 h through 8 days and amine levels were evaluated 48 h after the last injection. ** $P < 0.01$, significant difference with respect to saline group.

during conditioning do not present reinstatement after a priming dose of 10 mg/kg. Thus, although the different doses produced a similar degree of CPP in all groups of animals, their susceptibility to the reinstatement induced by MDMA re-exposure may vary, it being greater in those conditioned with 10 mg/kg. A possible explanation for the lack of effects of the high dose on reinstatement can be focused on the development of sensitization after MDMA pre-exposure. During conditioning, animals were exposed to MDMA and, after a period of several weeks without injections (extinction), the effects of the drug were tested again in the reinstatement tests. If pre-exposure to MDMA could induce an increase in its effects (sensitization), the dose-effect curve would be shifted to the left and thus, the dose of 2.5 and 5 could induce more rewarding effects than 10 mg/kg, which may induce non-rewarding or even aversive effects in pre-exposed mice, interfering with the reinstatement process. Using the self-administration procedure, it has been observed that MDMA exhibited an inverted U dose-effect curve in mice, which were more motivated to obtain lower rather than higher doses of MDMA. Although no overt changes in the pattern or the rate of responding were observed during 15 days of MDMA self-administration, suggesting the lack of acute tolerance or

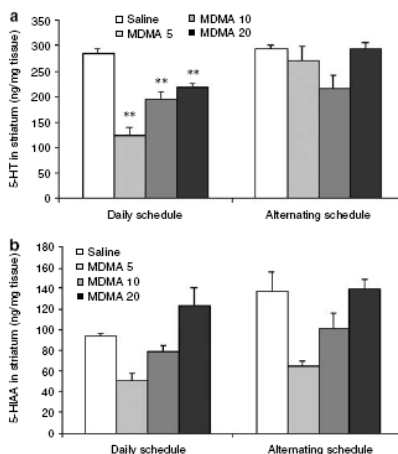


Figure 5 Effects of MDMA (5, 10, or 20 mg/kg) on the concentrations of 5-HT (a) and 5-HIAA (b) in the striatum following daily or alternating schedule of administration. In the daily schedule, animals received 4 injections of the MDMA dose on four consecutive days and the levels of biogen amines were tested 24 h after the last injection. In the alternating schedule, animals received four injections of the MDMA dose each 48 h through 8 days and amine levels were evaluated 48 h after the last injection. ** $P < 0.01$, significant difference with respect to saline group.

sensitization to its reinforcing properties, it is possible that sensitization only emerges after a non-drug interval (Trigo *et al.*, 2006). In accord with this hypothesis, in one study evaluating the motor effects of MDMA in rats, it was observed that dose-dependent increases were produced in motor activity that remained constant through six consecutive daily injections but after 5 or 25 days of washout, an increase in locomotion was observed, which expresses behavioral sensitization (Modi *et al.*, 2006). Similarly, we found that a low dose MDMA injection, after an interval of 2 or 5 weeks from the last drug administration during conditioning, produces a clear reinstatement of CPP, which can be even greater than that observed during Post-C.

The reinstating effects of MDMA may probably be affected by the interval elapsed between the conditioning (performed during adolescence) and the tests of reinstatement, which were performed between PN 56 and 77 in animals conditioned with the alternating schedule but between PN 59 and 199 in animals conditioned with the daily schedule, however, the results obtained argue against this hypothesis. Although both groups of animals conditioned with 5 mg/kg performed the reinstatement test at similar PN days (59 or 77 in daily or alternating, respectively), the priming dose of 2.5 mg/kg only reinstates CPP in animals conditioned using the alternating day schedule. Conversely, the dose of 10 mg/kg of MDMA does not reinstate CPP in any group conditioned with 20 mg/kg, irrespective of the time at which reinstatement tests were

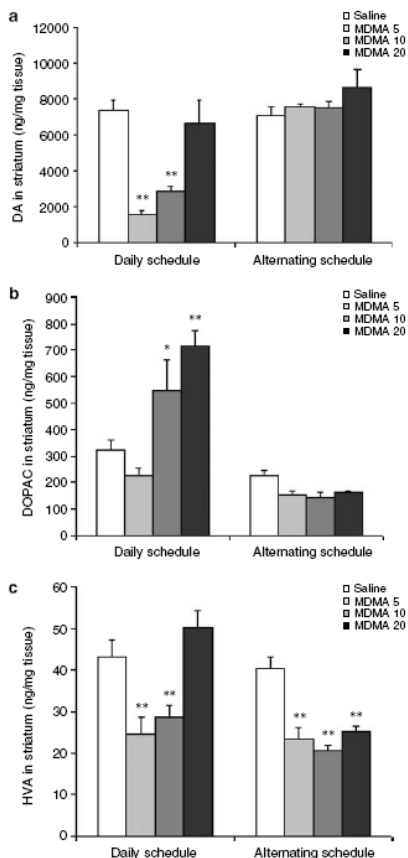


Figure 6 Effects of MDMA (5, 10, or 20 mg/kg) on the concentrations of DA (a), DOPAC (b), and HVA (c) in the striatum following daily or alternating schedule of administration. In the daily schedule, animals received four injections of the MDMA dose on four consecutive days and the levels of biogen amines were tested 24 h after the last injection. In the alternating schedule, animals received 4 injections of the MDMA dose each 48 h through 8 days and amine levels were evaluated 48 h after the last injection. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, significant difference with respect to saline group.

performed (PN 199 vs PN 77). Finally, although the test of reinstatement is performed at very different PN days (164 vs 56), in both groups conditioned with 10 mg/kg, the priming dose of 5 mg/kg induces an increase in the time spent in the

drug-paired compartment (even higher than in Post-C), although this effect is only significant in animals conditioned using an alternating day schedule. The lack of significant differences in those conditioned using the two-session/day schedule could be due to the great variability between mice in response to MDMA priming (see the wide SEM in Figure 1): some animals clearly increase the time spent in the drug-paired compartment but others decrease it. Thus, the temporal interval between conditioning and test of reinstatement does not seem to be responsible for the different susceptibility to reinstatement observed in animals conditioned with a two/session day schedule or an alternating day schedule. An explanation focused on the type of conditioning acquired by mice in both types of schedules is more plausible. Intermittent MDMA could have more ability to induce sensitization and modify brain reward pathways than daily treatment, rendering animals more susceptible to reinstatement after re-exposure to the drug received during conditioning.

Effects of Daily and Alternating MDMA Administration on the Acquisition and Extinction of CPP

In the present study, we have used two different protocols for the acquisition of place conditioning due to the fact that a review of the literature on the effects of MDMA on CPP indicates that they can vary as a function of several factors, such as housing of the animals or procedure of CPP. Four daily consecutive pairings of MDMA with the corresponding drug-paired compartment does not significantly increase the time spent in this compartment in the Post-C session with respect to that spent on the Pre-C day, although there is a tendency to induce CPP with the high dose of MDMA. The lack of significant differences in this group are probably due to the great variability in the response of the animals: some showing a great change in time spent in the MDMA-paired compartment (> 540 s) but some showing even a decrease (< 223 s). When animals are tested one week after to verify the lack of CPP, surprisingly, we observed that MDMA-conditioned animals present a clear CPP (see Figure 1, bar of First Extinction session). As we have previously observed with other drugs of abuse (Maldonado *et al*, 2006; Ribeiro Do Couto *et al*, 2005a), the duration of MDMA-induced CPP is dose-dependent: animals presented CPP 3, 13 and 22 weeks after conditioning with the low-, medium-, and high-dose, respectively. These results indicate that animals have acquired a long-lasting CPP, although they do not express it 1 day after the last conditioning session. A possible explanation for these effects could be focused on the fact that MDMA may produce a transient depletion of one or several neurotransmitters involved in the expression of CPP, such as 5-HT or DA. On the other hand, the phenomenon of 'incubation' of responding to reward cues (Grimm *et al*, 2001; Lu *et al*, 2004) could also contribute to the increased CPP over time following the completion of training, it becoming more evident 1 or several weeks after the last conditioning session (extinction sessions) than only 1 day after (Post-C).

The effects of MDMA on CPP have always been evaluated using a schedule of alternating days. With this model, in agreement with previous studies with adult mice (Robledo *et al*, 2004a,b; Salzmann *et al*, 2003), we have observed that

all doses of MDMA induced a clear CPP on Post-C day, although the duration of this CPP is not dose-dependent. Animals treated with low and high doses present CPP up to a maximum of 4 weeks, whereas those receiving the medium dose only exhibited CPP for 1 week after conditioning. Thus, besides differences in the acquisition, the duration of CPP clearly differs depending on the schedule used. With the two-session/day schedule, the extinction sessions extended from PN 41 to PN 195, as the duration of CPP is very long; whereas with the alternating day schedule, the extinction sessions extended from PN 45 to PN 73, as CPP lasts a few weeks. It is not clear whether the different protocols used to induce conditioning, daily being more intensive (four conditioning sessions in 4 days) than alternating (four conditioning sessions in 8 days), could explain these differences.

Effects of Daily and Alternating MDMA Administration on Biogenic Amines

With the objective of finding the neurochemical correlates of the effects observed in the acquisition of CPP, we evaluated the levels of 5-HT, DA and their metabolites in brain cortex, hippocampus, and striatum of mice treated with a daily or an alternating schedule of MDMA administration. Daily MDMA produces a decrease in 5-HT in the cortex with the low dose and in the striatum with all doses (striatal 5-HT loss of 56, 32, and 23% for the low-, medium-, and high dose, respectively). There is also a decrease in DA after the low and medium MDMA doses (DA loss of 74 and 52%, respectively). The lack of dose-dependence in the effect of MDMA on 5-HT and DA levels may be due to the fact that the animals treated with the highest dose were under the stimulating effect of the drug (as the neurotransmitter levels are evaluated only 24 h after the last administration). It is important to note that the pattern of 5-HT and DA concentrations is similar in the striatum and cortex (only 5-HT): greater decreases with the lower doses. It is possible that with repeated daily high dosage the stimulant effects of MDMA on DA release accumulates. Using *in vivo* microdialysis, it has been confirmed that the extracellular DA concentration in the mouse striatum increased after a single dose of MDMA (Camarero *et al*, 2002; Colado *et al*, 2001; Reveron *et al*, 2005) and that this rise was magnified and sustained by subsequent doses (Camarero *et al*, 2002; Colado *et al*, 2001). The alternating schedule of MDMA administration produces a dose-dependent decrease in cortical 5-HT without changes in striatal 5-HT or DA. In the hippocampus, 5-HT decreased in a dose-dependent way independently of the schedule used.

As commented previously, the apparent absence of CPP in animals conditioned with the two-session/day schedule could be due to the depletion of a neurotransmitter after daily MDMA administration. Biochemical analysis demonstrated a decrease in DA and 5-HT in the striatum that could be related to the lack of CPP. In fact, animals receiving the high dose of MDMA that present a lower decrease in DA show a greater increase in the time spent in the drug-paired compartment, whereas this is not the case in animals receiving low and medium doses that present a clear reduction in DA. When this drug is administered at

48-h intervals, these possible impairing effects on neurotransmission are prevented, as the neurotransmitters are within their normal levels that correlate with a clear expression of CPP in animals conditioned with the alternating schedule.

The CPP paradigm, a model of context-conditioned drug reward, is especially relevant for addiction research because contextual stimuli (acting as secondary reinforcers) can induce craving that might finally lead to relapse (Childress *et al*, 1999). As drugs that have rewarding properties are also considered to have a higher probability of dependence and abuse liability, the ability of MDMA to produce CPP observed in the present study may be predictive of such properties. Moreover, the long-term effects of MDMA on the susceptibility of the animals to the reinstatement of CPP induced by the re-exposure to this drug after extinction support the idea that MDMA exposure is capable of modifying the neural substrates of reward, making the animal's brain more vulnerable to addiction.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the following grants:

Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud 'Carlos III' (FIS), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (G03/005) and Proyectos de Investigación (PI052165). Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Investigación and FEDER (SEJ2005-00316/PSIC) (Spain). Conselleria de Sanitat, Agencia Valenciana de Salud. Dirección General de Drogodependencias (FEPAD) and Conselleria d' empresa, Universitat i Ciencia, Projectos I + D (GV04B46, GV06/355, ACOMP06/211), Generalitat Valenciana (Spain). Bruno Ribeiro Do Couto was supported by grant SFRH/BD/4559/2001 of the Fundação Para a Ciência e a Tecnologia, Ministério da Ciência e da Tecnologia (Portugal).

REFERENCES

- Acquas E, Marrocu P, Pisanu A, Cadoni C, Zernig G, Saria A *et al* (2001). Intravenous administration of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine) enhances cortical and striatal acetylcholine release *in vivo*. *Eur J Pharmacol* 418: 207–211.
- Beardsley PM, Balster RL, Harris LS (1986). Self-administration of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) by rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend* 18: 149–157.
- Bilsky EJ, Reid LD (1991). MDL7222, a serotonin 5-HT₃ receptor antagonist, blocks MDMA's ability to establish a conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav* 39: 509–512.
- Bilsky EJ, Hui Y, Hubbell CL, Reid LD (1990). Methylenedioxymethamphetamine's capacity to establish place preferences and modify intake of an alcoholic beverage. *Pharmacol Biochem Behav* 37: 633–638.
- Bilsky EJ, Hubbell CL, Delconte JD, Reid LD (1991). MDMA produces a conditioned place preference and elicits ejaculation in male rats: a modulatory role for the endogenous opioids. *Pharmacol Biochem Behav* 40: 443–447.
- Bilsky EJ, Montegut MJ, Nichols ML, Reid LD (1998). CGS 10746B, a novel dopamine release inhibitor, blocks the establishment of cocaine and MDMA conditioned place preferences. *Pharmacol Biochem Behav* 59: 215–220.
- Boot BP, Mehan AO, McCann UD, Ricaurte GA (2002). MDMA- and p-chlorophenylalanine-induced reduction in 5-HT

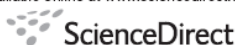
- concentrations: effects on serotonin transporter densities. *Eur J Pharmacol* 453: 239–244.
- Braida D, Sala M (2002). Role of the endocannabinoid system in MDMA intracerebral self-administration in rats. *Br J Pharmacol* 136: 1089–1092.
- Braida D, Iosue S, Pegorini S, Sala M (2005). 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine-induced conditioned place preference (CPP) is mediated by the endocannabinoid system. *Pharmacol Res* 51: 177–182.
- Cadoni C, Solinas M, Pisanu A, Zernig G, Acquas E, Di Chiara G (2005). Effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core. *Brain Res* 1055: 143–148.
- Camarero J, Sanchez V, O'Shea E, Green AR, Colado MI (2002). Studies, using *in vivo* microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ('ecstasy')-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. *J Neurochem* 81: 961–972.
- Carroll ME, Comer SD (1996). Animal models of relapse. *Exp Clin Psychopharmacol* 4: 11–18.
- Colado MI, Camarero J, Mechan AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM et al (2001). A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurons in mouse brain. *Br J Pharmacol* 134: 1711–1723.
- Colado MI, O'Shea E, Green AR (2004). Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. *Psychopharmacology* 173: 249–263.
- Cole JC, Sumnall HR (2003). The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA). *Neurosci Biobehav Rev* 27: 199–217.
- Cole JC, Sumnall HR, O'Shea E, Marsden CA (2003). Effects of MDMA exposure on the conditioned place preference produced by other drugs of abuse. *Psychopharmacology* 166: 383–390.
- Cornish JL, Shah Nawaz Z, Thompson MR, Wong S, Morley KC, Hunt GE et al (2003). Heat increases 3,4-methylenedioxy-methamphetamine self-administration and social effects in rats. *Eur J Pharmacol* 482: 339–341.
- Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP (1999). Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry* 156: 11–18.
- Daniela E, Brennan K, Gittings D, Hely L, Schenk S (2004). Effect of SCH 23390 on (+/-)-3,4-methylenedioxy-methamphetamine hyperactivity and self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 745–750.
- Escobedo I, O'Shea E, Orio L, Sanchez V, Segura M, de la Torre R et al (2005). A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HMA) on brain monoamine levels after *i.p.* or striatal administration in mice. *Br J Pharmacol* 144: 231–241.
- Fantegrossi WE, Ullrich T, Rice KC, Woods JH, Winger G (2002). 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. *Psychopharmacology* 161: 356–364.
- Fantegrossi WE, Woolverton WL, Kilbourn M, Sherman P, Yuan J, Hatzidimitriou G et al (2004). Behavioral and neurochemical consequences of long-term intravenous self-administration of MDMA and its enantiomers by rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology* 29: 1270–1281.
- Gough B, Ali SF, Slikker W, Holson RR (1991). Acute effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol Biochem Behav* 39: 619–623.
- Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y (2001). Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature* 412: 141–142.
- Herzig V, Capuani EM, Kovar KA, Schmidt WJ (2005). Effects of MPEP on expression of food-, MDMA- or amphetamine-conditioned place preference in rats. *Addict Biol* 10: 243–249.
- Hiramatsu M, Cho AK (1990). Enantiomeric differences in the effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine on extracellular monoamines and metabolites in the striatum of freely-moving rats: an *in vivo* microdialysis study. *Neuropharmacology* 29: 269–275.
- Kankaanpaa A, Meririnne E, Lillsunde P, Seppala T (1998). The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rat nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 59: 1003–1009.
- Koch S, Galloway MP (1997). MDMA induced dopamine release *in vivo*: role of endogenous serotonin. *J Neural Transm* 104: 135–146.
- Lamb R, Griffiths R (1987). Self-injections of d-3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) in the baboon. *Psychopharmacology* 91: 268–272.
- Li S-M, Ren Y-H, Zheng J-W (2002). Effect of 7-nitroindazole on drug-priming reinstatement of D-methamphetamine-induced conditioned place preference. *Eur J Pharmacol* 443: 205–206.
- Lile JA, Ross JT, Nader MA (2005). A comparison of the reinforcing efficacy of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA, 'ecstasy') with cocaine in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend* 78: 135–140.
- Lu L, Grimm JW, Dempsey J, Shaham Y (2004). Cocaine seeking over extended withdrawal periods in rats: different time courses of responding induced by cocaine cues versus cocaine priming over the first 6 months. *Psychopharmacology* 170: 101–106.
- Maldonado C, Rodriguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Miñarro J (2006). Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behav Pharmacol* 17: 119–131.
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Miñarro J (2001). Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 121: 189–197.
- Marona-Lewicka D, Rhee G-S, Sprague JE, Nichols DE (1996). Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 99–105.
- McGregor IS, Clemens KJ, van der Plass G, Li KM, Hunt GE, Chen F et al (2003). Increased anxiety 3 months after brief exposure to MDMA ('ecstasy') in rats: association with altered 5-HT transporter and receptor density. *Neuropsychopharmacology* 28: 1472–1484.
- Meyer A, Mayerhofer A, Kovar K-A, Schmidt WJ (2002). Rewarding effects of the optical isomers of 3,4-methylenedioxy-methylamphetamine ('Ecstasy') and 3,4-methylenedioxy-ethylamphetamine ('Eve') measured by conditioned place preference in rats. *Neurosci Lett* 330: 280–284.
- Modi GM, Yang PB, Swann AC, Dafny N (2006). Chronic exposure to MDMA (Ecstasy) elicits behavioral sensitization in rats but fails to induce cross-sensitization to other psychostimulants. *Behav Brain Funct* 2: 1.
- Nair SG, Gudelsky GA (2006). 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine enhances the release of acetylcholine in the prefrontal cortex and dorsal hippocampus of the rat. *Psychopharmacology* 184: 182–189.
- Nichols DE (1986). Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs* 18: 305–313.
- O'Brien CP (1997). A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science* 278: 66–70.
- O'Shea E, Escobedo J, Orio L, Sanchez V, Navarro M, Green AR et al (2005). Elevation of ambient room temperature has differential effects on MDMA-induced 5-HT and dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rats. *Neuropsychopharmacology* 30: 1312–1323.
- Reveron ME, Monks TJ, Duvachelle CL (2005). Age-dependent (+)MDMA-mediated neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology* 26: 1031–1040.

- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Miñarro J (2005a). Long-lasting rewarding effects of morphine induced by drug primings. *Brain Res* 1050: 53–63.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Miñarro J (2005b). NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Res Bull* 64: 493–503.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Armario A, Miñarro J (2006). Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology* 185: 459–470.
- Ricarte G, Bryan G, Strauss L, Seiden L, Schuster C (1985). Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science* 229: 986–988.
- Robledo P, Balerio B, Berrendero F, Maldonado R (2004a). Study of the behavioural responses related to the potential addictive properties of MDMA in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 369: 338–349.
- Robledo P, Mendizabal V, Ortuño J, de la Torre R, Kieffer BL, Maldonado R (2004b). The rewarding properties of MDMA are preserved in mice lacking m-opioid receptors. *Eur J Neurosci* 20: 853–858.
- Salzmann J, Marie-claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F (2003). Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br J Pharmacol* 140: 831–838.
- Schechter MD (1991). Effect of MDMA neurotoxicity upon its conditioned place preference and discrimination. *Pharmacol Biochem Behav* 38: 539–544.
- Schenk S, Gittings D, Johnstone M, Daniela E (2003). Development, maintenance and temporal pattern of self-administration maintained by ecstasy (MDMA) in rats. *Psychopharmacology* 169: 21–27.
- Schmidt CJ, Levin JA, Lovenberg W (1987). *In vitro* and *in vivo* neurochemical effects of methylenedioxyamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem Pharmacol* 36: 747–755.
- Shaham Y, Shalev U, Lu L, de Wit H, Stewart J (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology* 168: 3–20.
- Shalev U, Grimm JW, Shaham Y (2002). Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev* 54: 1–42.
- Stone DM, Johnson M, Hanson GR, Gibb JW (1987). A comparison of the neurotoxic potential of methylenedioxyamphetamine (MDA) and its N-methylated and N-ethylated derivatives. *Eur J Pharmacol* 134: 245–248.
- Trigo JM, Panayi F, Soria G, Maldonado R, Robledo P (2006). A reliable model of intravenous MDMA self-administration in naive mice. *Psychopharmacology* 184: 212–220.
- Weiss F (2005). Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. *Current Opinon Pharmacol* 5: 9–19.
- White SR, Duffy P, Kalivas PW (1994). Methylenedioxyamphetamine depresses glutamate-evoked neuronal firing and increases extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens *in vivo*. *Neuroscience* 62: 41–50.
- Yamamoto BK, Spanos LJ (1988). The acute effects of methylenedioxy-methamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur J Pharmacol* 148: 195–203.

ANEXO IV



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 32 (2008) 701–709

 Progress in
 Neuro-Psychopharmacology
 & Biological Psychiatry

www.elsevier.com/locate/prnpbp

Effect of adolescent exposure to MDMA and cocaine on acquisition and reinstatement of morphine-induced CPP

M. Daza-Losada, M. Rodríguez-Arias, M.A. Aguilar, J. Miñarro*

Unidad de Investigación Psicobiología de las Drogodependencias, Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universitat de València, Avda. Blasco Ibáñez 21, 46100 Valencia, Spain

Received 3 July 2007; received in revised form 14 November 2007; accepted 15 November 2007

Available online 23 November 2007

Abstract

It is well known that an elevated percentage of ecstasy users also consume cocaine. Recently, it has been reported that a high frequency of heroin smokers first consumed heroin under the effects of ecstasy with the hope of reducing the stimulant effects of the latter drug. The aim of the present study was to evaluate the effect of exposure to MDMA and cocaine during adolescence on morphine-induced conditioned place preference (CPP) and reinstatement in adulthood. In the first experiment, adolescent mice were exposed to six injections of MDMA and three weeks later their response to the reinforcing properties of 40 mg/kg of morphine was evaluated using the CPP paradigm. All the treatment groups developed the same magnitude of morphine-induced preference and, after CPP was extinguished, it was restored in all the groups with a priming dose of 10 mg/kg of morphine. Only mice that had been treated with 10 or 20 mg/kg of MDMA had their morphine-induced preference reinstated after receiving only 5 mg/kg of morphine. In the second experiment, adolescent mice were similarly treated with six administrations of cocaine (25 mg/kg) or cocaine plus MDMA (5, 10 or 20 mg/kg), and their response to morphine-induced CPP was evaluated three weeks later. Similarly to the first experiment, all the groups developed a preference for the morphine-paired compartment, but this preference was not reinstated with a priming dose of 10 mg/kg of morphine following extinction, as was the case among the control animals. These results lead us to hypothesize that periadolescent MDMA exposure alters responsiveness to the rewarding properties of morphine, highlighting MDMA as a gateway drug whose use may increase the likelihood of dependence on other drugs.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Cocaine; Conditioned place preference; MDMA; Mice; Morphine; Relapse

1. Introduction

MDMA (3,4-methylen-dioxy-methamphetamine) or ecstasy is an illicit recreational drug consumed by many teenagers and young adults. Ecstasy users are more likely to take other drugs than non-MDMA users, with 90% of MDMA users and only 13.8% of non-MDMA users reporting having consumed other

illicit substances. Specifically, cocaine has been reported as being used by 43.8% of MDMA users (The National Survey on Drug Use and Health, 2004; Wish et al., 2006). This pattern is also observed in Spain, where cocaine is used by about 60% of ecstasy abusers (DGPNSD, Encuesta Estatal sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias, 2004). Ecstasy users who do not consume any other illicit psychoactive drugs would seem to be uncommon (Rodgers, 2000). A number of reports have highlighted how an elevated proportion of heroin smokers recognize that they first consumed heroin hoping to decrease the stimulant effects of ecstasy (Gervin et al., 1998; 2001). These users also report taking more ecstasy tablets per night and consuming this drug more frequently than those who had not taken opiates (Gervin et al., 2001).

The repeated, intermittent administration of a variety of potentially addictive drugs produces persistent increases in their

Abbreviations: MDMA, 3,4-methylen-dioxy-methamphetamine; CPP, conditioned place preference; DA, dopamine; VTA, ventral tegmental area; PD, postnatal days; Pre-C, pre-conditioning; Post-C, post-conditioning; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CREB, cAMP response element-binding; mRNA, messenger ribonucleic acid; Nac, nucleus accumbens; Pro-Dyn, prodynorphin.

* Corresponding author. Tel.: +34 96 386 4020; fax: +34 96 386 4668.

E-mail address: jose.minarro@uv.es (J. Miñarro).0278-5846/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.pnpbp.2007.11.017

incentive motivational properties (Letz, 1989; Manzanedo et al., 2005; Shippenberg and Heidbreder, 1995). This phenomenon is known as sensitization. The neural changes that underlie behavioural sensitization are thought to contribute to the development of the compulsive patterns of drug seeking and drug craving that characterize addiction (Robinson and Berridge, 1993; for review, see Stewart and Badiani, 1993). Sensitization to the locomotor-activating effects after repeated MDMA administration has been widely demonstrated in rats (Herin et al., 2005; Kalivas et al., 1998; Modi et al., 2006; Ramos et al., 2004; Spanos and Yamamoto, 1989) and mice (Itzhak et al., 2003). Moreover, these augmented effects are known to affect the actions of other drugs. Repeated treatment of adult rats with MDMA has been reported to increase cocaine-induced motor activity and promote the subsequent acquisition of cocaine self-administration (Fletcher et al., 2001), which highlights the crossover effects of these two drugs. However other studies have failed to identify similar crossover effects between MDMA and amphetamine or methylphenidate (Modi et al., 2006).

Sensitization phenomena at developmental ages are not well understood, as important ontogenetic changes in the neurobiological systems, which underlie the development of sensitization, are common and might in turn be responsible for variations in the level of vulnerability to drugs as age progresses (Laviola et al., 1995). Age-related differences in psychostimulant sensitization profiles have been described for cocaine and amphetamines (Laviola et al., 1995, 1999). Although adolescent rats show an increase in the conditioned reinforcement of cocaine after treatment with MDMA (Aberg et al. 2007; Fone et al., 2002), a recent report has shown that they are less vulnerable to MDMA-induced sensitization, only developing this response to MDMA when administered with a high dose and within a narrow margin of time (Aberg et al., 2007).

The aim of the present study was to evaluate if adolescent exposure to MDMA or MDMA plus cocaine affects the rewarding actions of morphine. Adolescent animals were employed in view of the fact that ecstasy is consumed mostly by teenagers and young adults (Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanias, 2005). Furthermore, the elevated percentage of ecstasy users who also consume cocaine has prompted us to study the co-administration pattern. Adolescent mice were exposed to two daily administrations of MDMA or MDMA plus cocaine over three days (six doses in total), and their response to the reinforcing properties of 40 mg/kg of morphine was evaluated three weeks later using the conditioned place preference paradigm. Since this opiate is presently employed by many MDMA users in order to relieve the psychostimulant effects of ecstasy, it is of relevance to evaluate whether such users are subject to an increase in the well-known addictive properties of morphine and to study susceptibility to relapse into morphine abuse.

2. Material and methods

2.1. Subjects

A total of 146 male mice of the OF1 strain were acquired from Charles River (Barcelona, Spain) at 21 days of age (10–

13 g). They were housed in groups of 4, in plastic cages (25 cm × 25 cm × 15 cm), under the following conditions: constant temperature (21 ± 2 °C), a reversed light schedule (white lights on: 07.30–19.30 h), and food and water available ad libitum, except during the behavioural test. All procedures involving the experimental animals complied with national, regional and local laws and regulations, and were in accordance with European Community Council Directives (86/609/EEC, 24 November 1986).

2.2. Drugs

Animals were injected i.p. with morphine (Laboratorios Alcaliber, Madrid, Spain), MDMA (SIGMA-ALDRICH Laboratories, Spain) and cocaine hydrochloride (Laboratorios Alcaliber S A, Madrid, Spain), in a volume of 0.01 ml/g. A control group was injected with physiological saline. All compounds were diluted in physiological saline (0.9% NaCl), which was also used as a vehicle, and administered i.p.

2.3. Apparatus

Four identical plexiglas boxes were employed, consisting of two equal size compartments (30.7 cm long × 31.5 cm wide × 35.5 cm high) that were separated by a grey central area (13.8 cm long × 31.5 cm wide × 35.5 cm high). The walls of the compartments differed in colour (black versus white) and had distinctive floor textures (fine grid in the black compartment and wide grid in the white one). Four infrared light beams at the entrance to each of the box's compartments and six in the central area enabled the position of the animal and its crossings from one compartment to the other to be recorded. The equipment was controlled using an IBM PC computer and MONPRE2Z software (CIBERTEC, SA, Spain).

2.4. Experimental procedure

2.4.1. 1st experiment: effect of MDMA exposure on morphine-induced CPP, extinction and reinstatement

After an acclimatizing period of 8 days, animals were divided into different groups. Pre-treatment consisted of two daily administration (every 12 h, at 8 am and 8 pm) over three days (6 injections in total, from PD29 to 31) of physiological saline (Sal, $n=15$) or MDMA (5, 10 or 20 mg/kg) (M5, $n=21$; M10, $n=19$; M20, $n=17$). Three weeks after pre-treatment had finalized, the morphine-induced CPP procedure was initiated (postnatal day 52). A more detailed description of the experimental procedure is presented in Table 1. A dose of 40 mg/kg of morphine was selected on the basis of previous studies that demonstrated that animals presented a more stable and robust CPP when they received a high dose of this drug (Ribeiro Do Couto et al., 2003), without exhibiting any sedative effects (Manzanedo et al., 1999, 2001).

Place conditioning, consisting of three phases, was carried out during the dark cycle, following an unbiased procedure of initial spontaneous preference (Manzanedo et al., 2001; Ribeiro Do Couto et al., 2003). During the first phase, which represented pre-conditioning (Pre-C), mice were allowed access to

ANEXO IV

Table 1
Description of the treatment protocols corresponding to the first (Sal, M5, M10 and M20 groups) and the second experiment (Sal–Sal, Sal–C25, C25–M5, C25–M10 and C25–M20 groups)

	Drug treatment	CPP			Extinction of the CPP	First priming dose	Extinction of the first reinstatement	Second priming dose
		Pre-C	Conditioning	Test				
Sal					PD 60-65	PD 66	PD 67-68	PD 69
M5					PD 60-65	PD 66	PD 67-70	PD 71
M10					PD 60-65	PD 66	PD 67-70	PD 71
M20					PD 60-67	PD 68	PD 69-72	PD 73
Sal–Sal	PD 29-31	PD 52-54	PD 55-58	PD 59	PD 60-65	PD 66	PD 67-68	PD 69
Sal–C25					PD 60-61	PD 62	PD 63-75	PD 76
C25–M5					PD 60-63	PD 64	PD 65-66	PD 67
C25–M10					PD 60-61	PD 62	PD 63-64	PD 65
C25–M20					PD 60-62	PD 63	PD 64-65	PD 66

both compartments of the apparatus for 15 min (900 s) a day over 3 days. On day 3, the time spent by an animal in each compartment during a period of 900 s was recorded. Ten animals showed a marked unconditioned aversion (less than 33% of the session time) or preference (more than 67%) for one of the compartments and were therefore eliminated from the rest of the procedure. Half the animals in each group received the drug in the white compartment, while the other half received it in the black, as one compartment was paired with the drug and the other with the vehicle. There were no significant differences between time spent in the drug-paired and the vehicle paired compartments during the preconditioning phase. This is an important step in the experimental procedure that avoids any preference bias prior to conditioning. In the second phase (conditioning), which lasted 4 days, animals received an injection of physiological saline before being confined to the vehicle-paired compartment for 1 h. Following an interval of 4 h, animals were administered with an injection of 40 mg/kg of morphine and immediately confined for an hour to the drug-paired compartment. During conditioning, the central area was made inaccessible by guillotine doors. On day 8, during the third phase or post-conditioning (Post-C), the guillotine doors separating the two compartments were removed and the time spent in each compartment by the untreated mice during a period of 900 s was recorded. The difference (in seconds) between the time spent in the drug-paired compartment in the Post-C test and that spent in the same compartment in the Pre-C test is a measure of the degree of conditioning induced by the drug. If this difference is positive, the drug is considered to have induced a preference for the drug-paired compartment, while the opposite indicates that an aversion has been produced.

2.4.2. Extinction of place preference

After the Post-C test, the animals underwent a daily 15 min extinction session, which consisted of placing them in the apparatus (without guillotine doors separating the compartments) for a period of 15 min, so that all groups spent a similar period of time in the drug-paired compartment to that of the Pre-C session. Thus, in each group, all animals underwent the same number of extinction sessions, independently of their individual scores. Subsequently, a lack of significant differences with respect to Pre-C values and the presence of significant dif-

ferences with the Post-C scores constituted the criteria for extinction were detected. The time necessary for extinguishing preference was 8 days for the group treated with the highest MDMA dose (M20) and 6 days for the saline- (Sal) and low-medium dose of MDMA-treated groups (M5 and M10). Once these time periods had been established, measurements were repeated 24 h later in order to confirm the extinction.

2.4.3. Reinstatement of place preference

The effects of a priming dose of morphine were evaluated 48 h after the confirmation of extinction. The reinstatement tests were the same as those for Post-C (free ambulation for 15 min), only that animals were tested after the administration of a morphine injection (10 mg/kg). All priming injections were given 30 min before reinstatement tests in the colony room, a non-contingent place with respect to that of the previous conditioning injections. The time needed for extinguishing the preference developed after the priming dose of 10 mg/kg was 2 days for the control group (Sal) and 4 days for the MDMA-treated groups (M5, M10 and M20).

2.4.4. 2nd experiment: effect of MDMA plus cocaine exposure on morphine-induced CPP, extinction and reinstatement

In the second experiment, the procedure was similar to that described for the first study, with a pre-treatment of two injections of physiological saline (Sal–Sal, $n=14$) or 25 mg/kg of cocaine alone (Sal–C25, $n=14$) or plus MDMA (5, 10 or 20 mg/kg) (C25–M5, $n=16$; C25–M10, $n=14$; C25–M20, $n=16$). Three weeks after pre-treatment had finalized, the morphine-induced CPP procedure was initiated (postnatal day 52).

The place conditioning and extinction of the preference took place as described for the previous experiment. The time necessary for extinguishing preferences was 6 days for the saline-treated group (Sal–Sal), 4 days for the C25–M5 group, 3 days for the C25–M20 group and 2 days for the Sal–C25 and C25–M10 group. Measurements were repeated 24 h after these time periods had been established in order to confirm the extinction.

The effects of a priming dose of morphine were evaluated 48 h after confirmation of extinction under the abovementioned experimental conditions. Due to the findings of a previous report (Estelles et al., 2006) showing a decrease in the rewarding actions of morphine in mice exposed prenatally to cocaine, the

ANEXO IV

first priming dose of morphine was higher (20 mg/kg) than that of the first study (10 mg/kg). The time needed for extinguishing the preference developed after this priming dose was 2 days for all the groups, with the exception of the Sal–C25 group, which needed 13 days.

2.4.5. Statistical treatment.

The time spent in the drug-paired compartment during pre- and post-conditioning was analyzed by means of a mixed analysis of variance (ANOVA) with a between variable (Treatment) with four or five levels (groups of treatment) and a within variable (Days) with two levels (Pre-C, Post-C). Newman–Keuls tests were applied for post-hoc comparisons. Differences in the time spent by mice in the drug-paired compartment during the Pre-C and extinction or reinstatement tests were analyzed with a “*t*” Student paired test.

3. Results

3.1. 1st experiment: effect of MDMA exposure on morphine-induced CPP, extinction and reinstatement

The results regarding the effects of MDMA on morphine-induced CPP are presented in Fig. 1. The ANOVA revealed a significant effect of the variable Days [$F(1,76)=35.110$;

$p<0.0001$]. The variable Treatment [$F(7,76)=0.871$; $p<0.4598$] and the interaction Treatment×Days [$F(3,76)=0.423$; $p<0.7368$] were not significant. More time was spent in the drug-paired compartment in Post-C, thus suggesting that all groups acquired CPP after the administration of morphine (Newman–Keuls $p<0.01$).

After extinction was confirmed, no differences were observed with respect to Pre-C, but with Post-C, a priming dose of 10 mg/kg of morphine was shown to reinstate the preference in all the groups (Student’s *t* test $p<0.01$ for Sal and $p<0.001$ for the MDMA groups). After extinction was confirmed a second time, a lower priming dose of 5 mg/kg of morphine reinstated the preference only in the groups pre-treated with 10 or 20 mg/kg of MDMA (Student’s *t* test $p<0.01$).

3.2. 2nd experiment: effect of MDMA plus cocaine exposure on morphine-induced CPP, extinction and reinstatement

The results regarding the effects of MDMA plus cocaine on morphine-induced CPP are presented in Fig. 2. The ANOVA revealed a significant effect of the variable Days [$F(1,69)=77.826$; $p<0.0001$]. The variable Treatment [$F(4,69)=1.495$; $p<0.2132$] and the interaction Treatment×Days [$F(4,69)=2.307$; $p<0.0668$] were not significant. More time was spent in the drug-paired compartment in Post-C, thus suggesting that

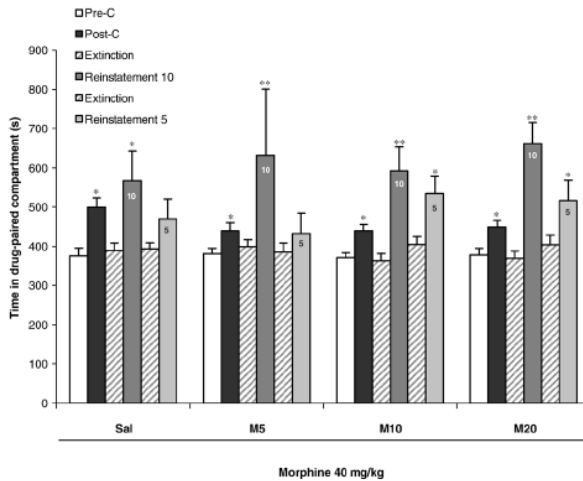


Fig. 1. Effects of MDMA administration during adolescence on the acquisition and reinstatement of morphine-induced CPP in adult mice. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (□), after conditioning session (■), in the last extinction session (dashed lines), and in the reinstatement test (dark grey for 10 mg/kg, and light grey for 5 mg/kg). During adolescence, mice were treated with six injections of physiological saline (Sal) or 5, 10 or 20 mg/kg of MDMA (M5, M10, and M20), and three weeks later were conditioned with 40 mg/kg of morphine. After the conditioning and extinction procedures, all the animals received a priming injection of 10 mg/kg of morphine, after which preference was once more extinguished and a new priming dose of 5 mg/kg of morphine was administered. * $p<0.01$, ** $p<0.001$ significant difference in time spent in Post-C or Reinstatement tests vs. Pre-C session.

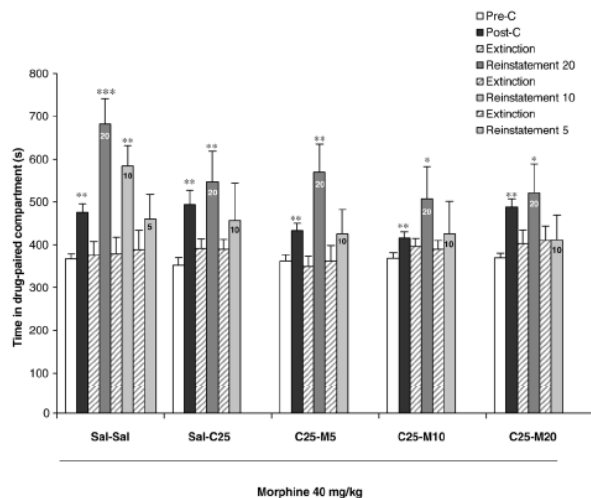


Fig. 2. Effects of MDMA plus cocaine administration during adolescence on the acquisition and reinstatement of morphine-induced CPP in adult mice. Bars represent the mean (\pm SEM) time spent in the drug-paired compartment before conditioning session (\square), after conditioning session (\blacksquare), in the last extinction session (dashed lines), and in the reinstatement test (dark grey for 20 mg/kg, and light grey for 5 and 10 mg/kg). During adolescence mice were treated with six injections of physiological saline (Sal–Sal), 25 mg/kg of cocaine alone (Sal–C25) or plus 5, 10 or 20 mg/kg of MDMA (C25–M5, C25–M10, and C25–M20), and three weeks later were conditioned with 40 mg/kg of morphine. After the conditioning and extinction procedures, all the animals received a priming injection of 20 mg/kg of morphine, after which preference was once more extinguished and a new priming dose of 10 mg/kg of morphine was administered. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ significant difference in time spent in Post-C or Reinstatement tests vs. Pre-C session.

all groups acquired CPP after the administration of morphine (Newman–Keuls $p < 0.01$).

After extinction was confirmed, no differences were observed with respect to Pre-C, but in Post-C a priming dose of 20 mg/kg of morphine reinstated preference in all the groups (Student's t test $p < 0.001$ for Sal–Sal, $p < 0.01$ for Sal–C25 and C25–M5, and $p < 0.05$ for C25–M10 and C25–M20). After extinction was confirmed once more, a second priming dose of

10 mg/kg of morphine reinstated the preference in the saline group only (Student's t test $p < 0.01$). In this group, after a further extinction, a lower priming dose of 5 mg/kg of morphine did not reinstate the preference.

Detailed information regarding changes in the time spent in the drug-paired compartment by each of the experimental groups is presented in Table 2.

4. Discussion

4.1. 1st effect of MDMA exposure on morphine-induced CPP, extinction and reinstatement

Our results show that exposure during adolescence to MDMA has an effect on the rewarding actions of morphine in adult mice. Although the magnitude of the place preference induced by 40 mg/kg of this opiate agonist is not affected, the sensitivity to reinstatement of the preference once extinguished is markedly modified. Mice treated with 10 or 20 mg/kg of MDMA showed a higher reinstatement of morphine-induced preference with lower priming doses than non-treated animals.

The present data concur with those of Cole and co-workers (2003), who did not detect any alteration of heroin-induced CPP two weeks after rats were treated with four injections of 10 mg/kg

Table 2
Percentage of increase in the time spent in the drug-paired compartment by each of the treatment groups after being conditioned with 40 mg/kg of morphine or receiving a priming dose of morphine

% of increase	Sal	M5	M10	M20
PostC–PreC	29%	18%	20%	23%
Reinstatement 10–PreC	47%	81%	70%	72%
Reinstatement 5–PreC	28%	29%	47%	40%

% of increase	Sal–Sal	Sal–C25	M10	C25–M10	C25–M20
PostC–PreC	34%	43%	24%	19%	35%
Reinstatement 20–PreC	73%	61%	60%	40%	51%
Reinstatement 10–PreC	69%	32%	20%	8%	16%

of MDMA, a neurotoxic regimen that induced decreases in hippocampal serotonin. Equally, a similar pre-treatment did not modify the effects of heroin in the elevated plus maze (Sumnall et al., 2004). Although all the groups in our study developed preference for the morphine-paired compartment, those treated with MDMA presented smaller increases (from 18 to 23%) than control animals (29%).

We have previously demonstrated that an extinguished morphine-induced CPP is reinstated by the non-contingent administration of different priming doses of morphine in mice (Ribeiro Do Couto et al., 2003, 2005). In the place-conditioning paradigm, several neutral environmental stimuli (cues) acquire a positive valence or salience through pairing with the rewarding hedonic effects of the drug. The reinstatement of this behaviour after priming could be explained as a “restoration” of the significance of the drug-paired environmental stimuli for the animal. Re-approach behaviour could reflect a reinstatement of craving that leads the animal to seek the environmental stimuli associated with a drug. The priming injection “reminds” the animal of the significance of the cues previously paired with the drug (Muedler and Stewart, 2000). In control animals that had not been exposed to any drug during adolescence, morphine induced a reinstatement of preferences when administered at a dose of 10 mg/kg, while lower doses were ineffective. However, those mice treated with MDMA (10 or 20 mg/kg) during adolescence had their preference reinstated with half of the aforementioned dose of morphine (5 mg/kg). Moreover, the increase in the drug-paired compartment observed after mice received a priming dose of 10 mg/kg morphine was greater among MDMA-treated mice (from 70 to 81%) than among control animals (47%). Indeed, mice previously exposed to ecstasy presented the same degree of reinstatement of preference as controls that received double the priming dose. Furthermore, the time needed to extinguish this preference was longer (two-fold) in animals treated with MDMA.

There are no previous studies reporting the effect of adolescent MDMA exposure on the rewarding actions of morphine, but Achat-Mendes and co-workers (2003) found similar results to ours with respect to cocaine-induced CPP. They found that mice previously exposed to a comparable regimen of MDMA during adolescence showed an enhanced sensitivity to the rewarding effect of cocaine. Although the preference of the MDMA-treated mice for the drug-paired compartment was of the same magnitude as those exposed to saline, a priming injection of cocaine after extinction reinstated significantly higher CPP in the former animals. Comparable results have been described in adolescent (Fone et al., 2002; Aberg et al., 2007) and adult rats (Horan et al., 2000). These results are also in accordance with the finding that rat pre-exposure to MDMA facilitates the acquisition of cocaine self-administration (Fletcher et al., 2001).

It is well known that MDMA is neurotoxic for dopaminergic terminals in the mouse brain (Colado et al., 2001). In a previous study, after four daily doses of MDMA (from 5 to 20 mg/kg), we observed a significant decrease in striatal dopamine (DA) and serotonin 24 h after the final administration. However, no changes were observed when these doses were administered on alternate days and the monoamine levels measured 48 h after

(Daza-Losada et al., 2007). A series of studies evaluating the long-lasting neurotoxic effects of MDMA on mice uncovered a dose-dependent loss in striatal DA concentration seven days later treatment with three doses of 20 or 30 mg/kg (Colado et al., 2001; O’Shea et al., 2001; Saadat et al., 2006). In the light of these reports, we would suggest that the two higher doses of MDMA induce dopaminergic neurotoxic effects. The nucleus accumbens (NAc) has been identified as a common target for stimuli related to pleasure (DiChiara and Imperato, 1988) and addiction (Nestler et al., 1996), and a large body of evidence has demonstrated that repeated treatments with cocaine, MDMA or opiates enhance dopamine transmission in this structure (Cadoni et al., 2005; for review, see White and Kalivas, 1998). In accordance with these results, studies conducted in adolescent rats have shown that MDMA acutely increases dopamine (DA) levels in the caudate-putamen (Broening et al., 1994). It is under debate whether the integrity of the dopaminergic system is required for reinstatement of a drug-induced morphine-CPP. A lesion of the ventral tegmental area (VTA) or the shell of the NAc blocks the reactivation of the CPP induced by morphine priming (Wang et al., 2002). On the other hand, relapse is not impeded by administration of DA antagonists prior to drug priming (Ribeiro Do Couto et al., 2005). It is possible that the treatment regimen employed in the present work induces DA loss in the striatum. However, due to the lapse of time between the administration of MDMA and the reinstatement test (more than 10 weeks), possible compensatory adjustments of the neurotransmitter loss may have led to an amplified response to the drug priming. Further studies of the neurotoxic effect of our treatment schedule are necessary in order to clarify this question.

To summarize, our results suggest that MDMA induces neurobiological changes in the adolescent mice brain that are persistent until adult life and increase the restoring effect of morphine.

4.2. 2nd effect of MDMA plus cocaine exposure on morphine-induced CPP, extinction and reinstatement

Contrary results were obtained when adolescent mice were treated with cocaine alone or plus MDMA. Similarly to the former study, all the treatment groups developed a preference for the compartment associated with 40 mg/kg of morphine, although the preference lasted longer among saline-treated animals. Once the CPP was extinguished, preference was reinstated in control saline-exposed mice after they received a priming dose of 10 mg/kg of morphine. However, animals treated with cocaine alone or plus any of the MDMA doses presented a reinstatement of preference only after receiving 20 mg/kg of morphine, with all the lower doses proving ineffective.

The time needed to extinguish the preference was longer among the groups in the first experiment, which were treated with saline or MDMA only, lasting 6 to 8 days. In the second study, in mice receiving cocaine the preference lasted only 3 to 4 days. Exposure to cocaine halved this time, so the morphine priming injection was not administered to all the groups on the same day. Animals treated with cocaine alone or plus MDMA were given their first priming morphine dose five days earlier

than the other groups (PD 62 versus PD68). Since 60-day-old mice can be considered adults (for review see Laviola et al., 2003), ontogenic effects are not likely to be responsible for differences in the results obtained.

Animals treated with cocaine alone or plus any of the doses of MDMA presented a decreased sensitivity to morphine priming doses, and a reinstatement of preference was only detected in those receiving 20 mg/kg of morphine, with all the lower doses proving ineffective. The four groups treated with cocaine exhibited the same response to morphine, independently of whether or not they received MDMA. It should be mentioned that mice pre-treated only with cocaine, although less sensitive to the morphine priming dose, required considerably more time than the rest of the groups for the reinstated preference to be extinguished.

There are no previous studies exploring the long-lasting effects of exposure to cocaine plus MDMA on the rewarding actions of morphine. Although the effect of cocaine has been widely studied, the results obtained are far from consistent. The ability of repeated treatments of psychomotor stimulants to enhance the response to subsequent challenge by an opiate seems to be affected by the route and timing of administration of the two drugs. We have previously reported that prenatal treatment with cocaine decreases the rewarding actions of morphine in adult offspring (Estelles et al., 2006). When such mice were conditioned with a threshold dose of 2 mg/kg of morphine, which induced preference in control animals, no effect was observed. However, in adult rats, doses of morphine that failed to produce CPP induced a marked preference in those which had previously received cocaine (Shippenberg et al., 1998). Moreover, repeated amphetamine administration into the VTA induced locomotor cross-sensitization to morphine between 2 and 11 days later (Cador et al., 1995; Vezina and Stewart, 1990). Likewise, in a recently published report, daily systemic injections of cocaine induced cross-sensitization to the motor effects of morphine after a 3-day withdrawal period (McDaid et al., 2005). Nevertheless, when acute challenge with heroin takes place 3 weeks after a daily intravenous cocaine self-administration, locomotor cross-sensitization does not occur (De Vries et al., 1998).

The main findings of this study are 1) that MDMA-treated mice are more vulnerable to relapse after receiving a morphine priming administration and 2) that this tendency is completely blocked in animals exposed to cocaine, in which an opposite effect is exhibited. These results could explain, at least in part, for the different mechanisms of action of the two drugs. Cocaine increases synaptic DA, serotonin and norepinephrine by binding to the transporters of these neurotransmitters and inhibiting their reuptake into presynaptic terminals. On the other hand, the complex mechanism of action of MDMA produces an acute release of both serotonin and DA from nerve terminals (review in Colado et al., 2004). In addition, MDMA displays a moderate affinity for a broad variety of receptors, including α 2-adrenergic, 5-HT2 serotonergic, M1 muscarinic and H1 histaminergic receptors, whose activation could underlie certain effects of the drug (Battaglia et al., 1988). Evidence suggests that serotonin has a more prominent role in the psychotropic effects of MDMA than in those of cocaine (Itzhak and Ali, 2006). In addition, the dopaminergic toxicity induced by MDMA can be affected by co-

administration with cocaine. Pre-treatment with the DA uptake inhibitor GBR 12909 prevents long-term loss in the striatal dopaminergic concentration in the mouse brain (O'Shea et al., 2001), which suggests that the dopaminergic system may not be affected in animals treated with both drugs.

On the other hand, there are well-documented reports confirming that cocaine induces modifications in DA receptor function and transduction events (for review see Anderson and Pierce, 2005). The up-regulation of the cAMP-signalling pathway induced by repeated exposure to cocaine (Nestler, 2004) augments the activity of the transcription factor cAMP response element-binding protein (CREB) (Walters et al., 2003). Increased CREB expression in the NAc decreases the rewarding effects of cocaine (Carlezon et al., 1998) and morphine (Barrot et al., 2002). This could be the one of the mechanisms responsible for the way in which cocaine affects the response of the dopaminergic system by altering the intensity of the response to priming.

On the other hand changes in opioid peptide systems may contribute to the psychoactive properties and abuse potential of different drugs of abuse. In general, treatment with cocaine increases preprodynorphin mRNA levels in the striatum (Hurd and Herkenham, 1992; Steiner and Gerfen, 1993; Smith and McGinty, 1994; Wang and McGinty, 1996) and thus modulates DA release by activating opioid receptors (Spanagel et al., 1990). More recent data in mice show that naloxone blocks the hyperlocomotion produced by MDMA, demonstrating the involvement of the endogenous opioid system in some of the behavioural effects induced by MDMA (Compan et al., 2003). Previous studies established that a single administration of MDMA increases the striatal and nigral concentrations of neurotensin and dynorphin (DYN) (Johnson et al., 1991), which has been confirmed by recent *in situ* hybridization data (Adams et al., 2005). However, other studies found that a single MDMA injection produced no changes, while chronic administration induced a significant increase in proDYN gene expression in the NAc and the opposite effect in the VTA (Di Benedetto et al., 2006).

The stimulant and rewarding properties of MDMA and cocaine are thought to arise partly from the ability of these drugs to activate mesolimbic DA neurons in the VTA projecting to the NAc (Hoebel, 1985; Kelley and Delfs, 1991). These are two key structures for the reinforcing properties of opioids (Wise and Rompre, 1989). The particular changes induced in the opioid neuropeptide system by cocaine and MDMA, which affect DYN-containing neurons localized within the dopaminergic system, would modulate the activity of dopaminergic neurons. The different neurochemical alterations induced by cocaine and MDMA in these structures may contribute to the deregulation of reward processes, thus increasing susceptibility to relapse after MDMA exposure, while reducing it when cocaine is also present.

Finally, given that the ability to form a correct association between a particular environment and morphine is altered after gestational cocaine exposure (Heyser et al., 1990; Inman-Wood et al., 2000), it should be considered that exposure to both drugs (MDMA and cocaine) could affect these animals' ability to recall said association.

5. Conclusion

Drug addiction is not only characterised by a compulsion to feed the habit, but also a chronic relapse disorder by which the craving for the substance is reinstated after detoxification and large periods of abstinence. The results of this study demonstrate that MDMA experience during adolescence affects the reinstatement of morphine-induced CPP, with lower priming doses being capable of reinstating the preference. On the other hand, we have also confirmed that cocaine counteracts this effect of MDMA. Clearly, only tentative deductions can be drawn from animal studies with respect to their implications in humans. However, the higher sensitivity we have observed leads us to hypothesize that periadolescent MDMA exposure alters responsiveness to the rewarding properties of morphine, highlighting MDMA as a gateway drug whose use increases the likelihood of dependence on other drugs.

Acknowledgements

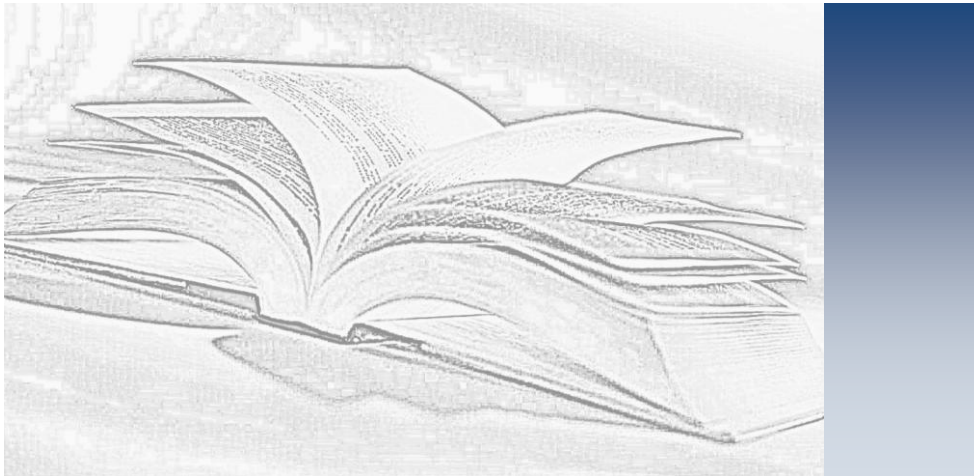
We wish to thank Mr. Brian Normanly for his editing of the language in this manuscript. This work was supported by the following funding: Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud "Carlos III" (FIS), RETICS, Red de Trastornos Adictivos (RD06/001/0016); Ministerio de Educación y Ciencia, Dirección General de Investigación and FEDER (SEJ2005-00316/PSC) (Spain); Agencia Valenciana de Salud. Dirección General de Drogodependencias (FEPAD), Generalitat Valenciana.

References

- Aberg M, Wade D, Wall E, Izenwasser S. Effect of MDMA (ecstasy) on activity and cocaine conditioned place preference in adult and adolescent rats. *Neurotoxicol Teratol* 2007;29:37–46.
- Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y. Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology* 2003;45:106–15.
- Adams DH, Hanson GR, Koefel KA. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases neuropeptide messenger RNA expression in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;133:131–42.
- Anderson SM, Pierce RC. Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacol Ther* 2005;106:389–403.
- Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, et al. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:11435–40.
- Battaglia G, Brooks BP, Kulsakdinun C, De Souza EB. Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur J Pharmacol* 1988;149:159–63.
- Broening HW, Bacon L, Slikker JW. Age modulates the long-term but not the acute effects of the serotonergic neurotoxicant 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:285–93.
- Cadoni C, Solinas M, Pisanu A, Zemig G, Acquas E, Di Chiara G. Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core. *Brain Res* 2005;1055:143–8.
- Cador M, Bijou Y, Stimus L. Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine. *Neuroscience* 1995;65:385–95.
- Carlezon Jr WA, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodin ES, Hiroi N, et al. Regulation of cocaine reward by CREB. *Science* 1998;282(5397):2272–5.
- Colado MI, Camarero J, Mecharo AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, et al. A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine neurons in mouse brain. *Br J Pharmacol* 2001;134:1711–23.
- Colado MI, O'Shea E, Green AR. Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. *Psychopharmacology* 2004;173:249–63.
- Cole JC, Sunmull HR, O'Shea E, Marsden CA. Effects of MDMA exposure on the conditioned place preference produced by other drugs of abuse. *Psychopharmacology* 2003;166:383–90.
- Compan V, Soeare-Levie K, Crosson C, Daszuta A, Hen R. Enkephalin contributes to the locomotor stimulating effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Eur J Neurosci* 2003;18:383–90.
- Daza-Losada M, Ribeiro Do Couto B, Manzanedo C, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Mifarrjo J. Rewarding effects and reinstatement of MDMA-induced CPP in adolescent mice. *Neuropsychopharmacology* 2007;32:1750–9.
- De Vries TJ, Schoffelmeier AN, Binnekade R, Mulder AH, Vanderschuren LJ. Drug-induced reinstatement of heroin- and cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. *Eur J Neurosci* 1998;10:3565–71.
- Di Benedetto M, D'addario C, Candelletti S, Romaldi P. Chronic and acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") administration on the dynorphinergic system in the rat brain. *Neuroscience* 2006;137:187–96.
- Di Chiara G, Impemato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely-moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5274–8.
- Estelles J, Rodriguez-Arias M, Maldonado C, Manzanedo C, Aguilar MA, Minarro J. Prenatal cocaine alters later responses to morphine in adult male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30:1073–82.
- Fletcher PJ, Robinson SR, Slippy DL. Pre-exposure to (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) facilitates acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Neuropsychopharmacology* 2001;25:195–203.
- Fone KC, Beckett SR, Topham IA, Swettenham J, Ball M, Maddocks L. Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity. *Psychopharmacology* 2002;159:437–44.
- Gervin M, Smith R, Bamford L, Keenan E. Chasing the dragon: experience in Ireland and association with "ecstasy". *Addiction* 1998;93:601–3.
- Gervin M, Hughes R, Bamford L, Smyth BP, Keenan E. Heroin smoking by "chasing the dragon" in young opiate users in Ireland: stability and associations with use to "come down" off "ecstasy". *J Subst Abuse Treat* 2001;20:297–300.
- Herin DV, Liu S, Ullrich T, Rice KC, Cunningham KA. Role of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the hyperlocomotive and hyperthermic effects of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Psychopharmacology* 2005;178:505–13.
- Heyser CJ, Chen WJ, Miller J, Spear NE, Spear LP. Prenatal cocaine exposure induces deficits in Pavlovian conditioning and sensory preconditioning among infant rat pups. *Behav Neurosci* 1990;104:955–63.
- Hoebel BG. Brain neurotransmitters in food and drug reward. *Am J Clin Nutr* 1985;42:1133–50.
- Horan B, Gardner EL, Ashby Jr CR. Enhancement of conditioned place preference response to cocaine in rats following subchronic administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Synapse* 2000;35:160–2.
- Hurd YL, Herkenham M. Influence of a single injection of cocaine, amphetamine or GBR 12909 on mRNA expression of striatal neuropeptides. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;16:97–104.
- Inman-Wood SL, Williams MT, Morford LL, Vorbees CV. Effects of prenatal cocaine on Morris and Barnes maze tests of spatial learning and memory in the offspring of C57BL/6j mice. *Neurotoxicol Teratol* 2000;22:547–57.
- Itzhak Y, Ali SF. Role of nitergic system in behavioral and neurotoxic effects of amphetamine analogs. *Pharmacol Ther* 2006;109:246–62.
- Itzhak Y, Ali SF, Achat CN, Anderson KL. Relevance of MDMA ("ecstasy")-induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology* 2003;166:241–8.
- Johnson M, Bush LG, Gibb JW, Hanson GR. Blockade of the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced changes in neurotensin and dynorphin A systems. *Eur J Pharmacol* 1991;193:367–70.
- Kalivas P, Duffy P, White S. MDMA elicits behavioral and neurochemical sensitization in rats. *Neuropsychopharmacology* 1998;18:469–79.
- Kelley AE, Delfs JM. Dopamine and conditioned reinforcement II. Contrasting effects of amphetamine microinjection into the nucleus accumbens with

- peptide microinjection into the ventral tegmental area. *Psychopharmacology* 1991;103:197–203.
- Laviola G, Wood RD, Kuhn C, Francis RLP. Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:345–57.
- Laviola G, Adriani W, Terranova ML, Gerra G. Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23:993–1010.
- Laviola G, Macri S, Morley-Fletcher S, Adriani W. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:19–31.
- Lett BT. Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine and cocaine. *Psychopharmacology* 1989;98:357–62.
- Manzanedo C, Aguilar MA, Minarro J. The effects of dopamine D2 and D3 antagonists on spontaneous motor activity and morphine-induced hyperactivity in male mice. *Psychopharmacology* 1999;143:82–8.
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Minarro J. Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 2001;121:189–97.
- Manzanedo C, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Minarro J. Sensitization to the rewarding effects of morphine depends on dopamine. *NeuroReport* 2005;16:201–5.
- McDaid J, Dallimore JE, Madkie AR, Mickiewicz AL, Napier TC. Cross-sensitization to morphine in cocaine-sensitized rats: behavioral assessments correlate with enhanced responding of ventral pallidal neurons to morphine and glutamate, with diminished effects of GABA. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:1182–93.
- Modi GM, Yang PB, Swann AC, Dafny N. Chronic exposure to MDMA (ecstasy) elicits behavioral sensitization in rats but fails to induce cross-sensitization to other psychostimulants. *Behav Brain Funct* 2006;2:1.
- Mueller D, Stewart J. Cocaine-induced conditioned place preference: reinstatement by priming injections of cocaine after extinction. *Behav Brain Res* 2000;115:39–47.
- Nesler EJ. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:210–8.
- Nesler EJ, Berhoo MT, Brodwin ES. Molecular mechanisms of drug addiction: adaptations in signal transduction pathways. *Mol Psychiatry* 1996;1:190–9.
- O'Shea E, Esteban B, Camarero J, Green AR, Colado MI. 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;40:65–74.
- Ramos M, Goni-Allo B, Aguirre N. Studies on the role of dopamine D1 receptors in the development and expression of MDMA-induced behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology* 2004;177:100–10.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J. Reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice by priming injections. *Neural Plast* 2003;10:279–90.
- Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J. NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Res Bull* 2005;64:493–503.
- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Rev* 1993;18:247–91.
- Rodgers J. Cognitive performance amongst recreational users of "ecstasy". *Psychopharmacology* 2000;151:19–24.
- Saadat KS, Elliott JM, Colado MI, Green AR. The acute and long-term neurotoxic effects of MDMA on marble burying behaviour in mice. *J Psychopharmacol* 2006;20:64–71.
- Shippenberg TS, Héklbreder C. Sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine: pharmacological and temporal characteristics. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;273:808–15.
- Shippenberg TS, LeFevour A, Thompson AC. Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine and cocaine: differential effects of the kappa-opioid receptor agonist U69593. *Eur J Pharmacol* 1998;345:27–34.
- Smith AJ, McGinty JF. Acute amphetamine or methamphetamine alters opioid peptide mRNA expression in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;21:359–62.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS. The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 1990;55:1734–40.
- Spanos LJ, Yamamoto BK. Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(±) MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;32:835–40.
- Steiner H, Gerfen CR. Cocaine-induced c-fos messenger RNA is inversely related to dynorphin expression in striatum. *J Neurosci* 1993;13:5066–81.
- Stewart J, Badiani A. Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 1993;4:289–312.
- Sumnall HR, O'Shea E, Marsden CA, Cole JC. The effects of MDMA pretreatment on the behavioural effects of other drugs of abuse in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77:805–14.
- Veizina P, Stewart J. Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. *Brain Res* 1990;516:99–106.
- Walters CL, Kuo YC, Blendy JA. Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. *J Neurochem* 2003;87:1237–44.
- Wang JQ, McGinty JF. D1 and D2 receptor regulation of preproenkephalin and preprodynorphin mRNA in rat striatum following acute injection of amphetamine or methamphetamine. *Synapse* 1996;22:114–22.
- Wang B, Luo F, Ge XC, Fu AH, Han JS. Effects of lesions of various brain areas on drug priming or footshock-induced reactivation of extinguished conditioned place preference. *Brain Res* 2002;950:1–9.
- White FJ, Kalivas PW. Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* 1998;51:141–53.
- Wise RA, Rompre PP. Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol* 1989;40:191–225.
- Wish ED, Fitzelle DB, O'Grady KE, Hsu MH, Arria AM. Evidence for significant polydrug use among ecstasy-using college students. *J Am Coll Health* 2006;55:99–104.

Bibliografia



16. BIBLIOGRAFÍA

1. Åberg M, Wade D, Wall E, Izenwasser S (2007). Effect of MDMA (ecstasy) on activity and cocaine conditioned place preference in adult and adolescent rats. *Neurotoxicol Teratol.* 29:37-46.
2. Acquas E, Marrocu P, Pisanu A, Cadoni C, Zernig G, Saria A, Di Chiara G (2001). Intravenous administration of ecstasy (3,4-methylenedioxyamphetamine) enhances cortical and striatal acetylcholine release in vivo. *Eur J Pharmacol.* 418:207-11.
3. Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y (2003). Methylphenidate and MDMA adolescent exposure in mice: long-lasting consequences on cocaine-induced reward and psychomotor stimulation in adulthood. *Neuropharmacology.* 45:106-15.
4. Achat-Mendes C, Ali SF, Itzhak Y (2005). Differential effects of amphetamines-induced neurotoxicity on appetitive and aversive Pavlovian conditioning in mice. *Neuropsychopharmacology.* 30:1128-37.
5. Adams DH, Hanson GR, Keefe KA (2005). 3,4-Methylenedioxyamphetamine increases neuropeptide messenger RNA expression in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res.* 133:131-42.
6. Adriani W, Laviola G (2000). A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology.* 39:334-46.
7. Adriani W, Chiarotti F, Laviola G (1998). Elevated novelty seeking and peculiar d-amphetamine sensitization in periadolescent mice compared with adult mice. *Behav Neurosci.* 112:1152-66.
8. Aguilar MA, Miñarro J, Felipe V (2000). Chronic moderate hyperammonemia impairs active and passive avoidance behavior and conditional discrimination learning in rats. *Exp Neurol.* 161:704-13.
9. Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2008). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Res Rev.* [en prensa].
10. Aguirre N, Ballaz S, Lasheras B, Del Río J (1998). MDMA ("Ecstasy") enhances 5-HT1A receptor density and 8-OH-DPAT-induced hypothermia: blockade by drugs preventing 5-hydroxytryptamine depletion. *Eur J Pharmacol.* 346:181-8.
11. Aguirre N, Barrionuevo M, Ramírez MJ, Del Río J, Lasheras B (1999). Alpha-lipoic acid prevents 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity. *Neuroreport.* 10:3675-80.

Bibliografía

- 12.** Aguirre N, Barrionuevo M, Ramírez MJ, Del Río J, Lasheras B (1993). Alpha-lipoic acid prevents 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)-induced neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol.* 15:91-6.
- 13.** Ali SF, Newport GD, Scallet AC, Binienda Z, Ferguson SA, Bailey JR, Paule MG, Slikker W Jr (1993). Oral administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) produces selective serotonergic depletion in the nonhuman primate. *Neurotoxicol Teratol.* 15:91-6.
- 14.** Andersen SL, Gazzara RA (1993). The ontogeny of apomorphine-induced alterations of neostriatal dopamine release: effects on spontaneous release. *J Neurochem.* 61:2247-55.
- 15.** Anderson KL, Itzhak Y (2003). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase suppresses the maintenance but not the induction of psychomotor sensitization to MDMA ("Ecstasy") and p-chloroamphetamine in mice. *Nitric Oxide.* 9:24-32.
- 16.** Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, Teicher MH (2000). Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse.* 37:167-9.
- 17.** Andersen SL, Arvanitogiannis A, Pliakas AM, LeBlanc C, Carlezon WA Jr (2002). Altered responsiveness to cocaine in rats exposed to methylphenidate during development. *Nat Neurosci.* 5:13-4.
- 18.** Anderson SM, Pierce RC (2005). Cocaine-induced alterations in dopamine receptor signaling: implications for reinforcement and reinstatement. *Pharmacol Ther.* 106:389-403.
- 19.** Anthony JC, Petronis KR. Early-onset drug use and risk of later drug problems (1995). *Drug Alcohol Depend.* 40:9-15.
- 20.** Arnett JJ (1992). Reckless behavior in adolescence: A developmental perspective. *Develop Rev.* 12:339-73.
- 21.** Asociación Americana de Psiquiatría (1994). Manual Diagnóstico y Estadístico de los Desórdenes Mentales TR. (DSM-IV TR).
- 22.** Balogh B, Molnar E, Jakus R, Quate L, Olverman HJ, Kelly PA, Kantor S, Bagdy G (2004). Effects of a single dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on circadian patterns, motor activity and sleep in drug-naïve rats and rats previously exposed to MDMA. *Psychopharmacology (Berl).* 173:296-309.
- 23.** Ball KT, Rebec GV (2005). Role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C/B} receptors in the acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on striatal single-unit activity and locomotion in freely moving rats. *Psychopharmacology (Berl).* 181:676-87.

24. Ball KT, Budreau D, Rebec GV (2003). Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on striatal single-unit activity and behavior in freely moving rats: differential involvement of dopamine D(1) and D(2) receptors. *Brain Res.* 994:203-15.
25. Ball KT, Budreau D, Rebec GV (2006). Context-dependent behavioural and neuronal sensitization in striatum to MDMA (ecstasy) administration in rats. *Eur J Neurosci.* 24:217-28.
26. Ball KT, Walsh KM, Rebec GV (2007). Reinstatement of MDMA (ecstasy) seeking by exposure to discrete drug-conditioned cues. *Pharmacol Biochem Behav.* 87:420-5.
27. Bankson MG, Cunningham KA (2001). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) as a unique model of serotonin receptor function and serotonin-dopamine interactions. *J Pharmacol Exp Ther.* 297:846-52.
28. Bankson MG, Cunningham KA (2002). Pharmacological studies of the acute effects of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine on locomotor activity: role of 5-HT(1B/1D) and 5-HT(2) receptors. *Neuropsychopharmacology.* 26:40-52.
29. Bankson MG, Yamamoto BK (2004). Serotonin-GABA interactions modulate MDMA-induced mesolimbic dopamine release. *J Neurochem.* 91:852-9.
30. Bar-Peled O, Gross-Isseroff R, Ben-Hur H, Hoskins I, Groner Y, Biegon A (1991). Fetal human brain exhibits a prenatal peak in the density of serotonin 5-HT1A receptors. *Neurosci Lett.* 127:173-6.
31. Barrionuevo M, Aguirre N, Del Río JD, Lasheras B (2000). Serotonergic deficits and impaired passive-avoidance learning in rats by MDEA: a comparison with MDMA. *Pharmacol Biochem Behav.* 65:233-40.
32. Barrot M, Olivier JD, Perrotti LI, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, Storm DR, Neve RL, Yin JC, Zachariou V, Nestler EJ (2002). CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:11435-40.
33. Battaglia G, Yeh SY, De Souza EB (1988). MDMA-induced neurotoxicity: parameters of degeneration and recovery of brain serotonin neurons. *Pharmacol Biochem Behav.* 29:269-74.
34. Baumann MH, Wang X, Rothman RB (2007). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: a reappraisal of past and present findings. *Psychopharmacology (Berl).* 189:407-24.

Bibliografia

- 35.** Baumgarten HG, Lachenmayer L (2004). Serotonin neurotoxins--past and present. *Neurotox Res.* 6:589-614.
- 36.** Baylen CA, Rosenberg H (2006). A review of the acute subjective effects of MDMA/ecstasy. *Addiction.* 101:933-47.
- 37.** Beardsley PM, Balster RL, Harris LS (1986). Self-administration of methylenedioxyamphetamine (MDMA) by rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.* 18:149-57.
- 38.** Bechara A (2001). Neurobiology of decision-making: risk and reward. *Semin Clin Neuropsychiatry.* 6:205-16.
- 39.** Beck J, Rosenbaum M (1994). *The pursuit of ecstasy: the MDMA experience.* New York: SUNY.
- 40.** Benloucif S, Galloway MP (1991). Facilitation of dopamine release in vivo by serotonin agonists: studies with microdialysis. *Eur J Pharmacol.* 200:1-8.
- 41.** Benloucif S, Keegan MJ, Galloway MP (1993). Serotonin-facilitated dopamine release in vivo: pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 265:373-7.
- 42.** Berger UV, Gu XF, Azmitia EC (1992). The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxyamphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine. *Eur J Pharmacol.* 215:153-60.
- 43.** Bhattachary S, Powell JH (2001). Recreational use of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) or "ecstasy": evidence for cognitive impairment. *Psychol Med.* 31:647-58.
- 44.** Bhattacharya SK, Bhattacharya A, Ghosal S (1998). Anxiogenic activity of methylenedioxyamphetamine (Ecstasy): an experimental study. *Biogenic Amines.* 14:217-37.
- 45.** Bilsky EJ, Reid LD (1991). MDL72222, a serotonin 5-HT₃ receptor antagonist, blocks MDMA's ability to establish a conditioned place preference. *Pharmacol Biochem Behav.* 39:509-12.
- 46.** Bilsky EJ, Hui YZ, Hubbell CL, Reid LD (1990). Methylenedioxyamphetamine's capacity to establish place preferences and modify intake of an alcoholic beverage. *Pharmacol Biochem Behav.* 37:633-8.

47. Bilsky EJ, Hubbell CL, Delconte JD, Reid LD (1991). MDMA produces a conditioned place preference and elicits ejaculation in male rats: a modulatory role for the endogenous opioids. *Pharmacol Biochem Behav.* 40:443-7.
48. Bilsky EJ, Montegut MJ, Nichols ML, Reid LD (1998). CGS 10746B, a novel dopamine release inhibitor, blocks the establishment of cocaine and MDMA conditioned place preferences. *Pharmacol Biochem Behav.* 59:215-20.
49. Bolanos CA, Glatt SJ, Jackson D (1998). Subsensitivity to dopaminergic drugs in periadolescent rats: a behavioral and neurochemical analysis. *Brain Res Dev Brain Res.* 111:25-33.
50. Bolla KI, McCann UD, Ricaurte GA (1998). Memory impairment in abstinent MDMA ("Ecstasy") users. *Neurology.* 51:1532-7.
51. Boot BP, Mechan AO, McCann UD, Ricaurte GA (2002). MDMA- and p-chlorophenylalanine-induced reduction in 5-HT concentrations: effects on serotonin transporter densities. *Eur J Pharmacol.* 453:239-44.
52. Bowyer JF, Young JF, Slikker W, Itzak Y, Mayorga AJ, Newport GD, Ali SF, Frederick DL, Paule MG (2003). Plasma levels of parent compound and metabolites after doses of either d-fenfluramine or d-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) that produce long-term serotonergic alterations. *Neurotoxicology.* 24:379-90.
53. Braidia D, Sala M (2002). Role of the endocannabinoid system in MDMA intracerebral self-administration in rats. *Br J Pharmacol.* 136:1089-92.
54. Braidia D, Iosuè S, Pegorini S, Sala M (2005). 3,4 Methylenedioxymethamphetamine-induced conditioned place preference (CPP) is mediated by endocannabinoid system. *Pharmacol Res.* 51:177-82.
55. Brain PF, Benton D, Childs G, Parmigiani S (1981). The effect of the type of opponent in test of murine aggression. *Behav Process.* 6:319-27.
56. Brain PF, Simón VM, Martínez M (1991). Ethopharmacological studies on the effects of antihormones on rodent agonistic behavior with especial emphasis on progesterone. *Neurosci Biobehav Rev.* 15:521-6.
57. Breier JM, Bankson MG, Yamamoto BK (2006). L-tyrosine contributes to (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced serotonin depletions. *J Neurosci.* 26:290-9.
58. Brent RL (2004a). Utilization of animal studies to determine the effects and human risks of environmental toxicants (drugs, chemicals, and physical agents). *Pediatrics.* 113:984-95.

Bibliografia

- 59.** Brent RL (2004b). Utilization of juvenile animal studies to determine the human effects and risks of environmental toxicants during postnatal developmental stages. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 71:303-20.
- 60.** Breslau N, Peterson EL (1996). Smoking cessation in young adults: age at initiation of cigarette smoking and other suspected influences. *Am J Public Health.* 86:214-20.
- 61.** Briley M, Chopin P, Moret C (1990). Effect of serotonergic lesion on "anxious" behaviour measured in the elevated plus-maze test in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 101:187-9.
- 62.** Brodtkin J, Malyala A, Nash JF (1993). Effect of acute monoamine depletion on 3,4-methylenedioxyamphetamine-induced neurotoxicity. *Pharmacol Biochem Behav.* 45:647-53.
- 63.** Broekkamp CL, Rijk HW, Joly-Gelouin D, Lloyd KL (1986). Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. *Eur J Pharmacol.* 126:223-9.
- 64.** Broening HW, Bowyer JF, Slikker W Jr (1995). Age-dependent sensitivity of rats to the long-term effects of the serotonergic neurotoxicant (+/-)-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) correlates with the magnitude of the MDMA-induced thermal response. *J Pharmacol Exp Ther.* 275:325-33.
- 65.** Broening HW, Morford LL, Inman-Wood SL, Fukumura M, Vorhees CV (2001). 3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy)-induced learning and memory impairments depend on the age of exposure during early development. *J Neurosci.* 21:3228-35.
- 66.** Brunson KL, Chen Y, Avishai-Eliner S, Baram TZ (2003). Stress and the developing hippocampus: a double-edged sword?. *Mol Neurobiol.* 27:121-36.
- 67.** Bubar MJ, Pack KM, Frankel PS, Cunningham KA (2004). Effects of dopamine D1- or D2-like receptor antagonists on the hypermotive and discriminative stimulus effects of (+)-MDMA. *Psychopharmacology (Berl).* 173:326-36.
- 68.** Buchert R, Thomasius R, Nebeling B, Petersen K, Obrocki J, Jenicke L, Wilke F, Wartberg L, Zapletalova P, Clausen M (2003). Long-term effects of "ecstasy" use on serotonin transporters of the brain investigated by PET. *J Nucl Med.* 44:375-84.
- 69.** Buchert R, Thomasius R, Wilke F, Petersen K, Nebeling B, Obrocki J, Schulze O, Schmidt U, Clausen M (2004). A voxel-based PET investigation of the long-term effects of "Ecstasy" consumption on brain serotonin transporters. *Am J Psychiatry.* 161:1181-9.

- 70.** Buchert R, Thomasius R, Petersen K, Wilke F, Obrocki J, Nebeling B, Wartberg L, Zapletalova P, Clausen M (2006). Reversibility of ecstasy-induced reduction in serotonin transporter availability in polydrug ecstasy users. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 33:188-99.
- 71.** Buchert R, Thiele F, Thomasius R, Wilke F, Petersen K, Brenner W, Mester J, Spies L, Clausen M (2007). Ecstasy-induced reduction of the availability of the brain serotonin transporter as revealed by [¹¹C](+)McN5652-PET and the multi-linear reference tissue model: loss of transporters or artifact of tracer kinetic modelling?. *J Psychopharmacol.* 21:628-34.
- 72.** Bull EJ, Hutson PH, Fone KC (2003). Reduced social interaction following 3,4-methylenedioxymethamphetamine is not associated with enhanced 5-HT_{2C} receptor responsiveness. *Neuropharmacology.* 44:439-48.
- 73.** Bull EJ, Hutson PH, Fone KC (2004). Decreased social behaviour following 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is accompanied by changes in 5-HT_{2A} receptor responsiveness. *Neuropharmacology.* 46:202-10.
- 74.** Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ (1994). Detection and quantitation of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNAs in human hippocampus using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique and their correlation with binding site densities and age. *Neurosci Lett.* 178:85-9.
- 75.** Butler GK, Montgomery AM (2004). Impulsivity, risk taking and recreational “ecstasy” (MDMA) use. *Drug Alcohol Depend.* 76:55-62.
- 76.** Byrne T, Baker LE, Poling A (2000). MDMA and learning: effects of acute and neurotoxic exposure in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 66:501-8.
- 77.** Cabrera, R. y Torrecilla, J.M. (1998). *Manual de drogodependencias.* Cauce Editorial. Agencia Antidroga de la Comunidad de Madrid.
- 78.** Cadet JL, Ladenheim B, Baum I, Carlson E, Epstein C (1994). CuZn-superoxide dismutase (CuZnSOD) transgenic mice show resistance to the lethal effects of methylenedioxyamphetamine (MDA) and of methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Brain Res.* 655:259-62.
- 79.** Cadet JL, Ladenheim B, Hirata H, Rothman RB, Ali S, Carlson E, Epstein C, Moran TH (1995). Superoxide radicals mediate the biochemical effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA): evidence from using CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Synapse.* 21:169-76.
- 80.** Cadet JL, Thiriet N, Jayanthi S (2001). Involvement of free radicals in MDMA-induced neurotoxicity in mice. *Ann Med Interne (Paris).* 152:57-9.

Bibliografia

- 81.** Cadoni C, Solinas M, Pisanu A, Zernig G, Acquas E, Di Chiara G (2005). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core. *Brain Res.* 1055:143-8.
- 82.** Callaway CW, Wing LL, Geyer MA (1990). Serotonin release contributes to the locomotor stimulant effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 254:456-64.
- 83.** Camarero J, Sanchez V, O'Shea E, Green AR, Colado MI (2002). Studies, using in vivo microdialysis, on the effect of the dopamine uptake inhibitor GBR 12909 on 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy")-induced dopamine release and free radical formation in the mouse striatum. *J Neurochem.* 81:961-72.
- 84.** Cami J, Farré M, Mas M, Roset PN, Poudevida S, Mas A, San L, de la Torre R (2000). Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"): psychomotor performance and subjective effects. *J Clin Psychopharmacol.* 20:455-66.
- 85.** Capela JP, Macedo C, Branco PS, Ferreira LM, Lobo AM, Fernandes E, Remião F, Bastos ML, Dirnagl U, Meisel A, Carvalho F (2007a). Neurotoxicity mechanisms of thioether ecstasy metabolites. *Neuroscience.* 146:1743-57.
- 86.** Capela JP, Fernandes E, Remião F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F (2007b). Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons. *Neurotoxicology.* 28:868-75.
- 87.** Carlezon WA Jr, Thome J, Olson VG, Lane-Ladd SB, Brodtkin ES, Hiroi N, Duman RS, Neve RL, Nestler EJ (1998). Regulation of cocaine reward by CREB. *Science.* 282:2272-5.
- 88.** Carlezon WA Jr, Mague SD, Andersen SL (2003). Enduring behavioral effects of early exposure to methylphenidate in rats. *Biol Psychiatry.* 54:1330-7.
- 89.** Carobrez AP, Bertoglio LJ (2005). Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev.* 29:1193-205.
- 90.** Carroll ME, Comer SD (1996). Animal models of relapse. *Exp Clin Psychopharmacol.* 4:11-18.
- 91.** Carvalho M, Carvalho F, Remião F, de Lourdes Pereira M, Pires-das-Neves R, de Lourdes Bastos M (2002). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") on body temperature and liver antioxidant status in mice: influence of ambient temperature. *Arch Toxicol.* 76:166-72.
- 92.** Cassel JC, Jeltsch H, Koenig J, Jones BC (2004). Locomotor and pyretic effects of MDMA-ethanol associations in rats. *Alcohol.* 34:285-9.

- 93.** Cassel JC, Riegert C, Rutz S, Koenig J, Rothmaier K, Cosquer B, Lazarus C, BIRTHELMER A, JELTSCH H, JONES BC, JACKISCH R (2005). Ethanol, 3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy) and their combination: long-term behavioral, neurochemical and neuropharmacological effects in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 30:1870-82.
- 94.** Catlow BJ, KIRSTEIN CL (2005). Heightened cocaine-induced locomotor activity in adolescent compared to adult female rats. *J Psychopharmacol*. 19:443-7.
- 95.** Catlow BJ, KIRSTEIN CL (2007). Cocaine during adolescence enhances dopamine in response to a natural reinforcer. *Neurotoxicol Teratol*. 29:57-65.
- 96.** Cirulli F, LAVIOLA G (2000). Paradoxical effects of D-amphetamine in infant and adolescent mice: role of gender and environmental risk factors. *Neurosci Biobehav Rev*. 24:73-84.
- 97.** Cirulli F, Terranova ML, LAVIOLA G (1996). Affiliation in periadolescent rats: behavioral and corticosterone response to social reunion with familiar or unfamiliar partners. *Pharmacol Biochem Behav*. 54:99-105.
- 98.** Clark DB, KIRISCI L, TARTER RE (1998). Adolescent versus adult onset and the development of substance use disorders in males. *Drug Alcohol Depend*. 49:115-21.
- 99.** Clemens KJ, Cornish JL, Li KM, Hunt GE, McGregor IS (2005). MDMA ("Ecstasy") and methamphetamine combined: order of administration influences hyperthermic and long-term adverse effects in female rats. *Neuropharmacology*. 49:195-207.
- 100.** Clemens KJ, Cornish JL, Hunt GE, McGregor IS (2006). Intravenous methamphetamine self-administration in rats: effects of intravenous or intraperitoneal MDMA co-administration. *Pharmacol Biochem Behav*. 85:454-63.
- 101.** Clemens KJ, Cornish JL, Hunt GE, McGregor IS (2007). Repeated weekly exposure to MDMA, methamphetamine or their combination: long-term behavioural and neurochemical effects in rats. *Drug Alcohol Depend*. 86:183-90.
- 102.** Cohen RS (1995). Subjective reports on the effects of the MDMA ("ecstasy") experience in humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 19:1137-45.
- 103.** Colado MI, Green AR (1995). The spin trap reagent alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents "ecstasy"-induced neurodegeneration of 5-hydroxytryptamine neurones. *Eur J Pharmacol*. 280:343-6.
- 104.** Colado MI, Murray TK, Green AR (1993). 5-HT loss in rat brain following 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA), p-chloroamphetamine and fenfluramine administration and effects of chlormethiazole and dizocilpine. *Br J Pharmacol*. 108:583-9.

Bibliografía

- 105.** Colado MI, Williams JL, Green AR (1995). The hyperthermic and neurotoxic effects of "Ecstasy" (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) in the Dark Agouti (DA) rat, a model of the CYP2D6 poor metabolizer phenotype. *Br J Pharmacol.* 115:1281-9.
- 106.** Colado MI, O'Shea E, Granados R, Murray TK, Green AR (1997). In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ("ecstasy") and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br J Pharmacol.* 121:889-900.
- 107.** Colado MI, Granados R, O'Shea E, Esteban B, Green AR (1998). Role of hyperthermia in the protective action of clomethiazole against MDMA ("ecstasy")-induced neurodegeneration, comparison with the novel NMDA channel blocker AR-R15896AR. *Br J Pharmacol.* 124:479-84.
- 108.** Colado MI, O'Shea E, Granados R, Esteban B, Martín AB, Green AR (1999a). Studies on the role of dopamine in the degeneration of 5-HT nerve endings in the brain of Dark Agouti rats following 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA or "ecstasy") administration. *Br J Pharmacol.* 126:911-24.
- 109.** Colado MI, O'Shea E, Esteban B, Granados R, Green AR (1999b). 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.* 38:307-14.
- 110.** Colado MI, Esteban B, O'Shea E, Granados R, Green AR (1999c). Studies on the neuroprotective effect of pentobarbitone on MDMA-induced neurodegeneration. *Psychopharmacology (Berl).* 142:421-5.
- 111.** Colado MI, Granados R, O'Shea E, Esteban B, Green AR (1999d). The acute effect in rats of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDEA, "eve") on body temperature and long term degeneration of 5-HT neurones in brain: a comparison with MDMA ("ecstasy"). *Pharmacol Toxicol.* 84:261-6.
- 112.** Colado MI, Camarero J, Mechañ AO, Sanchez V, Esteban B, Elliott JM, Green AR (2001). A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine neurones in mouse brain. *Br J Pharmacol.* 134:1711-23.
- 113.** Colado MI, O'Shea E, Green AR (2004). Acute and long-term effects of MDMA on cerebral dopamine biochemistry and function. *Psychopharmacology (Berl).* 173:249-63.
- 114.** Cole JC, Sumnall HR (2003a). Altered states: the clinical effects of Ecstasy. *Pharmacol Ther.* 98:35-58.

- 115.** Cole JC, Sumnall HR (2003b). The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Neurosci Biobehav Rev.* 27:199-217.
- 116.** Cole JC, Sumnall HR, O'Shea E, Marsden CA (2003). Effects of MDMA exposure on the conditioned place preference produced by other drugs of abuse. *Psychopharmacology (Berl)*. 166:383-90.
- 117.** Cologer-Clifford A, Simon NG, Lu SF, Smoluk SA (1997). Serotonin agonist-induced decreases in intermale aggression are dependent on brain region and receptor subtype. *Pharmacol Biochem Behav.* 58:425-30.
- 118.** Commins DL, Vosmer G, Virus RM, Woolverton WL, Schuster CR, Seiden LS (1987). Biochemical and histological evidence that methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) is toxic to neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 241:338-45.
- 119.** Compan V, Scearce-Levie K, Crosson C, Daszuta A, Hen R (2003). Enkephalin contributes to the locomotor stimulating effects of 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine. *Eur J Neurosci.* 18:383-90.
- 120.** Compas BE, Hinden BR, Gerhardt CA (1995). Adolescent development: pathways and processes of risk and resilience. *Annu Rev Psychol.*46:265-93.
- 121.** Compton WM 3rd, Cottler LB, Phelps DL, Ben Abdallah A, Spitznagel EL (2000). Psychiatric disorders among drug dependent subjects: are they primary or secondary?. *Am J Addict.* 9:126-34.
- 122.** Cornish JL, Shahnawaz Z, Thompson MR, Wong S, Morley KC, Hunt GE, McGregor IS (2003). Heat increases 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration and social effects in rats. *Eur J Pharmacol.* 482:339-41.
- 123.** Corral y Alonso MA, Sopolana Rodríguez PA (1998). Drogas de diseño: la MDMA ("éxtasis"). *Psiquiatría Pública.* 10: 389-398.
- 124.** Costall B, Kelly ME, Naylor RJ, Onaivi ES (1989). The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 33:197-203.
- 125.** Cottler LB, Womack SB, Compton WM, Ben-Abdallah A (2001). Ecstasy abuse and dependence among adolescents and young adults: applicability and reliability of DSM-IV criteria. *Hum Psychopharmacol.* 16:599-606.
- 126.** Coulter CL, Happe HK, Murrin LC (1997). Dopamine transporter development in postnatal rat striatum: an autoradiographic study with [3H]WIN 35,428. *Brain Res Dev Brain Res.* 104:55-62.

Bibliografia

- 127.** Crawley J, Goodwin FK (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav.* 13:167-70.
- 128.** Crean RD, Davis SA, Von Huben SN, Lay CC, Katner SN, Taffe MA (2006). Effects of (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine, (+/-)3,4-methylenedioxyamphetamine and methamphetamine on temperature and activity in rhesus macaques. *Neuroscience.* 142:515-25.
- 129.** Crespi D, Mennini T, Gobbi M (1997). Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine. *Br J Pharmacol.* 121:1735-43.
- 130.** Crews F, He J, Hodge C (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 86:189-99.
- 131.** Croft RJ, Klugman A, Baldeweg T, Gruzelier JH (2001a). Electrophysiological evidence of serotonergic impairment in long-term MDMA ("ecstasy") users. *Am J Psychiatry.* 158:1687-92.
- 132.** Croft RJ, Mackay AJ, Mills AT, Gruzelier JG (2001b). The relative contributions of ecstasy and cannabis to cognitive impairment. *Psychopharmacology (Berl).* 153:373-9.
- 133.** Curran HV, Travill RA (1997). Mood and cognitive effects of +/-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy"): week-end "high" followed by mid-week low. *Addiction.* 92:821-31.
- 134.** Curran HV, Rees H, Hoare T, Hoshi R, Bond A (2004). Empathy and aggression: two faces of ecstasy? A study of interpretative cognitive bias and mood change in ecstasy users. *Psychopharmacology (Berl).* 173:425-33.
- 135.** Charlier C, Broly F, Lhermitte M, Pinto E, Anseau M, Plomteux G (2003). Polymorphisms in the CYP 2D6 gene: association with plasma concentrations of fluoxetine and paroxetine. *Ther Drug Monit.* 25:738-42.
- 136.** Chen JP, van Praag HM, Gardner EL (1991). Activation of 5-HT₃ receptor by 1-phenylbiguanide increases dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Brain Res.* 543:354-7.
- 137.** Childress AR, Mozley PD, McElgin W, Fitzgerald J, Reivich M, O'Brien CP (1999). Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry.* 156:11-8.
- 138.** Cho AK, Hiramatsu M, Distefano EW, Chang AS, Jenden DJ (1990). Stereochemical differences in the metabolism of 3,4-methylenedioxyamphetamine in vivo and in vitro: a pharmacokinetic analysis. *Drug Metab Dispos.* 18:686-91.

- 139.** Choi S, Kellogg CK (1992). Norepinephrine utilization in the hypothalamus of the male rat during adolescent development. *Dev Neurosci.* 14:369-76.
- 140.** Choi S, Weisberg SN, Kellogg CK (1997). Control of endogenous norepinephrine release in the hypothalamus of male rats changes over adolescent development. *Brain Res Dev Brain Res.* 98:134-41.
- 141.** Chu T, Kumagai Y, DiStefano EW, Cho AK (1996). Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem Pharmacol.* 51:789-96.
- 142.** Chung T, Martin CS (2001). Classification and course of alcohol problems among adolescents in addictions treatment programs. *Alcohol Clin Exp Res.* 25:1734-42.
- 143.** Dafters RI (1994). Effect of ambient temperature on hyperthermia and hyperkinesis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy") in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 114:505-8.
- 144.** Dafters RI (1995). Hyperthermia following MDMA administration in rats: effects of ambient temperature, water consumption, and chronic dosing. *Physiol Behav.* 58:877-82.
- 145.** Dafters RI, Lynch E (1998). Persistent loss of thermoregulation in the rat induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy") but not by fenfluramine. *Psychopharmacology (Berl).* 138:207-12.
- 146.** Dafters RI, Duffy F, O'Donnell PJ, Bouquet C (1999). Level of use of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or Ecstasy) in humans correlates with EEG power and coherence. *Psychopharmacology (Berl).* 145:82-90.
- 147.** Daniela E, Brennan K, Gittings D, Hely L, Schenk S (2004). Effect of SCH 23390 on (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine hyperactivity and self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 77:745-50.
- 148.** Daniela E, Gittings D, Schenk S (2006). Conditioning following repeated exposure to MDMA in rats: role in the maintenance of MDMA self-administration. *Behav Neurosci.* 120:1144-50.
- 149.** Daumann J, Pelz S, Becker S, Tuchtenhagen F, Gouzoulis-Mayfrank E (2001). Psychological profile of abstinent recreational Ecstasy (MDMA) users and significance of concomitant cannabis use. *Hum Psychopharmacol.* 16:627-633.
- 150.** Daumann J Jr, Fischermann T, Heekeren K, Thron A, Gouzoulis-Mayfrank E (2004). Neural mechanisms of working memory in ecstasy (MDMA) users who continue or discontinue ecstasy and amphetamine use: evidence from an 18-month longitudinal functional magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry.* 56:349-55.

Bibliografía

- 151.** Daval G, Vergé D, Basbaum AI, Bourgoin S, Hamon M (1987). Autoradiographic evidence of serotonin₁ binding sites on primary afferent fibres in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 83:71-6.
- 152.** Davidson C, Gow AJ, Lee TH, Ellinwood EH (2001). Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res Brain Res Rev.* 36:1-22.
- 153.** Daza-Losada M (2005). Efectos conductuales a largo plazo de la administración de MDMA y cocaína durante la adolescencia en ratones. Trabajo de Investigación del Programa de Doctorado en Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad de Valencia.
- 154.** Daza-Losada M, Ribeiro Do Couto B, Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2007). Rewarding effects and reinstatement of MDMA-induced CPP in adolescent mice. *Neuropsychopharmacology.* 32:1750-9.
- 155.** Daza-Losada M, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Miñarro J (2008a). Effect of adolescent exposure to MDMA and cocaine on acquisition and reinstatement of morphine-induced CPP. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32:701-9.
- 156.** Daza-Losada M, Rodríguez-Arias M, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J (2008b). Behavioural and neurotoxic long-lasting effects of MDMA plus cocaine in adolescent mice. *Eur J Pharmacol.* 590:204-11.
- 157.** De Boer SF, Koolhaas JM (2003). Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol.* 463:145-61.
- 158.** De Deurwaerdère P, L'hirondel M, Bonhomme N, Lucas G, Cheramy A, Spampinato U (1997). Serotonin stimulation of 5-HT₄ receptors indirectly enhances in vivo dopamine release in the rat striatum. *J Neurochem.* 68:195-203.
- 159.** de la Torre R, Farré M (2004). Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol Sci.* 25:505-8.
- 160.** de la Torre R, Ortuño J, Mas M, Farré M, Segura J (1999). Fatal MDMA intoxication. *Lancet.* 353:593.
- 161.** de la Torre R, Farré M, Ortuño J, Mas M, Brenneisen R, Roset PN, Segura J, Camí J (2000a). Non-linear pharmacokinetics of MDMA ("ecstasy") in humans. *Br J Clin Pharmacol.* 49:104-9.
- 162.** de la Torre R, Farré M, Roset PN, Lopez CH, Mas M, Ortuño J, Menoyo E, Pizarro N, Segura J, Camí J (2000b). Pharmacology of MDMA in humans. *Ann N Y Acad Sci.* 914:225-37.

- 163.** de la Torre R, Farré M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, Segura J, Camí J (2004). Human pharmacology of MDMA: pharmacokinetics, metabolism, and disposition. *Ther Drug Monit.* 26:137-44.
- 164.** de la Torre R, Farré M, Mathúna BO, Roset PN, Pizarro N, Segura M, Torrens M, Ortuño J, Pujadas M, Camí J (2005). MDMA (ecstasy) pharmacokinetics in a CYP2D6 poor metaboliser and in nine CYP2D6 extensive metabolisers. *Eur J Clin Pharmacol.* 61:551-4.
- 165.** De Souza EB, Battaglia G, Insel TR (1990). Neurotoxic effect of MDMA on brain serotonin neurons: evidence from neurochemical and radioligand binding studies. *Ann N Y Acad Sci.* 600:682-97.
- 166.** de Win MM, Reneman L, Reitsma JB, den Heeten GJ, Booij J, van den Brink W (2004). Mood disorders and serotonin transporter density in ecstasy users--the influence of long-term abstention, dose, and gender. *Psychopharmacology (Berl).* 173:376-82.
- 167.** de Win MM, Schilt T, Reneman L, Vervaeke H, Jager G, Dijkink S, Booij J, van den Brink W (2006). Ecstasy use and self-reported depression, impulsivity, and sensation seeking: a prospective cohort study. *J Psychopharmacol.* 20:226-35.
- 168.** DeWit DJ, Adlaf EM, Offord DR, Ogborne AC (2000a). Age at first alcohol use: a risk factor for the development of alcohol disorders. *Am J Psychiatry.* 157:745-50.
- 169.** DeWit DJ, Hance J, Offord DR, Ogborne A (2000b). The influence of early and frequent use of marijuana on the risk of desistance and of progression to marijuana-related harm. *Prev Med.* 31:455-64.
- 170.** de Wit H, Enggasser JL, Richards JB (2002). Acute administration of d-amphetamine decreases impulsivity in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology.* 27:813-25.
- 171.** del Olmo E, López-Giménez JF, Vilaró MT, Mengod G, Palacios JM, Pazos A (1998). Early localization of mRNA coding for 5-HT1A receptors in human brain during development. *Brain Res Mol Brain Res.* 60:123-6.
- 172.** Deminiere JM, Piazza PV, Le Moal M, Simon H (1989). Experimental approach to individual vulnerability to psychostimulant addiction. *Neurosci Biobehav Rev.* 13:141-7.
- 173.** Depue RA, Spoont MR (1986). Conceptualizing a serotonin trait. A behavioral dimension of constraint. *Ann N Y Acad Sci.* 487:47-62.
- 174.** Dhossche DM (1999). Aggression and recent substance abuse: absence of association in psychiatric emergency room patients. *Compr Psychiatry.* 40:343-6.

Bibliografia

- 175.** Di Benedetto M, D'addario C, Candeletti S, Romualdi P (2005). Chronic and acute effects of 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine ("Ecstasy") administration on the dynorphinergic system in the rat brain. *Neuroscience*. 137:187-96.
- 176.** Diller AJ, Rocha A, Cardon AL, Valles R, Wellman PJ, Nation JR (2007). The effects of concurrent administration of +/-3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine on conditioned place preference in the adult male rat. *Pharmacol Biochem Behav*. 88:165-70.
- 177.** Dillon KA, Gross-Isseroff R, Israeli M, Biegon A (1991). Autoradiographic analysis of serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in the human brain postmortem: effects of age and alcohol. *Brain Res*. 554:56-64.
- 178.** Dinopoulos A, Dori I, Parnavelas JG (1997). The serotonin innervation of the basal forebrain shows a transient phase during development. *Brain Res Dev Brain Res*. 99:38-52.
- 179.** Dishion TJ, McMahon RJ (1998). Parental monitoring and the prevention of child and adolescent problem behavior: a conceptual and empirical formulation. *Clin Child Fam Psychol Rev*. 1:61-75.
- 180.** Dockstader CL, van der Kooy D (2001). Mouse strain differences in opiate reward learning are explained by differences in anxiety, not reward or learning. *J Neurosci*. 21:9077-81.
- 181.** Dori IE, Dinopoulos A, Parnavelas JG (1998). The development of the synaptic organization of the serotonergic system differs in brain areas with different functions. *Exp Neurol*. 154:113-25.
- 182.** Dotson JW, Ackehman DL, West LJ (1996). Ketamine abuse. *J Drug Issues*. 25:751-58.
- 183.** Dughiero G, Schifano F, Forza G (2001). Personality dimensions and psychopathological profiles of Ecstasy users. *Hum Psychopharmacol*. 16:635-9.
- 184.** Dyck RH, Cynader MS (1993). Autoradiographic localization of serotonin receptor subtypes in cat visual cortex: transient regional, laminar, and columnar distributions during postnatal development. *J Neurosci*. 13:4316-38.
- 185.** Easton N, Marsden CA (2006). Ecstasy: are animal data consistent between species and can they translate to humans?. *J Psychopharmacol*. 20:194-210.
- 186.** Eddy NB, Halbach H, Isbell H, Seevers MH (1965). Drug dependence: its significance and characteristics. *Bull World Health Organ*. 32:721-33.

- 187.** Ehrlich ME, Sommer J, Canas E, Unterwald EM (2002). Periadolescent mice show enhanced DeltaFosB upregulation in response to cocaine and amphetamine. *J Neurosci.* 22:9155-9.
- 188.** el-Guebaly N, Hodgins D (1998). Substance-related cravings and relapses: clinical implications. *Can J Psychiatry.* 43:29-36.
- 189.** El-Mallakh RS, Abraham HD (2007). MDMA (Ecstasy). *Ann Clin Psychiatry.* 19:45-52.
- 190.** Erhardt E, Zibetti LC, Godinho JM, Bacchieri B, Barros HM (2006). Behavioral changes induced by cocaine in mice are modified by a hyperlipidic diet or recombinant leptin. *Braz J Med Biol Res.* 39:1625-35.
- 191.** Escobedo I, O'Shea E, Orio L, Sanchez V, Segura M, de la Torre R, Farre M, Green AR, Colado MI (2005). A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. *Br J Pharmacol.* 144:231-41.
- 192.** Esteban B, O'Shea E, Camarero J, Sanchez V, Green AR, Colado MI (2001). 3,4-Methylenedioxyamphetamine induces monoamine release, but not toxicity, when administered centrally at a concentration occurring following a peripherally injected neurotoxic dose. *Psychopharmacology (Berl).* 154:251-60.
- 193.** Estelles J, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Miñarro J (2004). Social behavioural profile of cocaine in isolated and grouped male mice. *Drug Alcohol Depend.* 76:115-23.
- 194.** Estelles J, Rodríguez-Arias M, Maldonado C, Aguilar MA, Miñarro J (2005). Prenatal cocaine exposure alters spontaneous and cocaine-induced motor and social behaviors. *Neurotoxicol Teratol.* 27:449-57.
- 195.** Estelles J, Rodríguez-Arias M, Maldonado C, Manzanedo C, Aguilar MA, Miñarro J (2006). Prenatal cocaine alters later responses to morphine in adult male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 30:1073-82.
- 196.** Estelles J, Lluch J, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Miñarro J (2007). Cocaine exposure during adolescence affects anxiety in adult mice. *Brain Res Bull.* 71:393-403.
- 197.** Estroff TW, Schwartz RH, Hoffmann NG (1989). Adolescent cocaine abuse. Addictive potential, behavioral and psychiatric effects. *Clin Pediatr (Phila).* 28:550-5.
- 198.** Evenden J (1999a). Impulsivity: a discussion of clinical and experimental findings. *J Psychopharmacol.* 13:180-92.

Bibliografia

- 199.** Evenden JL (1999b). Varieties of impulsivity. *Psychopharmacology (Berl)*. 146:348-61.
- 200.** Fantegrossi WE, Ullrich T, Rice KC, Woods JH, Winger G (2002). 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. *Psychopharmacology (Berl)*. 161:356-64.
- 201.** Fantegrossi WE, Godlewski T, Karabenick RL, Stephens JM, Ullrich T, Rice KC, Woods JH (2003). Pharmacological characterization of the effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine ("ecstasy") and its enantiomers on lethality, core temperature, and locomotor activity in singly housed and crowded mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 166:202-11.
- 202.** Fantegrossi WE, Woolverton WL, Kilbourn M, Sherman P, Yuan J, Hatzidimitriou G, Ricaurte GA, Woods JH, Winger G (2004). Behavioral and neurochemical consequences of long-term intravenous self-administration of MDMA and its enantiomers by rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology*. 29:1270-81.
- 203.** Faria R, Magalhães A, Monteiro PR, Gomes-Da-Silva J, Amélia Tavares M, Summavielle T (2006). MDMA in adolescent male rats: decreased serotonin in the amygdala and behavioral effects in the elevated plus-maze test. *Ann N Y Acad Sci*. 1074:643-9.
- 204.** Farré M, de la Torre R, Mathúna BO, Roset PN, Peiró AM, Torrens M, Ortuño J, Pujadas M, Camí J (2004). Repeated doses administration of MDMA in humans: pharmacological effects and pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)*. 173:364-75.
- 205.** Fernandez F, Porrás G, Mormède P, Spampinato U, Chaouloff F (2003). Effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine on locomotor activity and extracellular dopamine in the nucleus accumbens of Fischer 344 and Lewis rats. *Neurosci Lett*. 335:212-6.
- 206.** Ferrington L, Kirilly E, McBean DE, Olverman HJ, Bagdy G, Kelly PA (2006). Persistent cerebrovascular effects of MDMA and acute responses to the drug. *Eur J Neurosci*. 24:509-19.
- 207.** File SE, Seth P (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol*. 463:35-53.
- 208.** Fink JS, Smith GP (1980). Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. *Brain Res*. 199:359-84.
- 209.** Finney JW, Moos RH (1992). The long-term course of treated alcoholism: II. Predictors and correlates of 10-year functioning and mortality. *J Stud Alcohol*. 53:142-53.

- 210.** Fischer C, Hatzidimitriou G, Wlos J, Katz J, Ricaurte G (1995). Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *J Neurosci.* 15:5476-85.
- 211.** Fisk JE, Montgomery C, Wareing M, Murphy PN (2006). The effects of concurrent cannabis use among ecstasy users: neuroprotective or neurotoxic?. *Hum Psychopharmacol.* 21:355-66.
- 212.** Fletcher PJ, Robinson SR, Slippy DL (2001). Pre-exposure to (+/-)3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) facilitates acquisition of intravenous cocaine self-administration in rats. *Neuropsychopharmacology.* 25:195-203.
- 213.** Fletcher PJ, Korth KM, Robinson SR, Baker GB (2002). Multiple 5-HT receptors are involved in the effects of acute MDMA treatment: studies on locomotor activity and responding for conditioned reinforcement. *Psychopharmacology (Berl).* 162:282-91.
- 214.** Fletcher PJ, Sinyard J, Higgins GA (2006). The effects of the 5-HT(2C) receptor antagonist SB242084 on locomotor activity induced by selective, or mixed, indirect serotonergic and dopaminergic agonists. *Psychopharmacology (Berl).* 187:515-25.
- 215.** Fone KC, Beckett SR, Topham IA, Swettenham J, Ball M, Maddocks L (2002). Long-term changes in social interaction and reward following repeated MDMA administration to adolescent rats without accompanying serotonergic neurotoxicity. *Psychopharmacology (Berl).* 159:437-44.
- 216.** Forsyth AJ (1996). Places and patterns of drug use in the Scottish dance scene. *Addiction.* 91:511-21.
- 217.** Fox HC, Toplis AS, Turner JJ, Parrott AC (2001a). Auditory verbal learning in drug-free Ecstasy polydrug users. *Hum Psychopharmacol.* 16:613-618.
- 218.** Fox HC, Parrott AC, Turner JJ (2001b). Ecstasy use: cognitive deficits related to dosage rather than self-reported problematic use of the drug. *J Psychopharmacol.* 15:273-81.
- 219.** Fox HC, McLean A, Turner JJ, Parrott AC, Rogers R, Sahakian BJ (2002). Neuropsychological evidence of a relatively selective profile of temporal dysfunction in drug-free MDMA ("ecstasy") polydrug users. *Psychopharmacology (Berl).* 162:203-14.
- 220.** Frederick DL, Ali SF, Slikker W Jr, Gillam MP, Allen RR, Paule MG (1995). Behavioral and neurochemical effects of chronic methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treatment in rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol.* 17:531-43.

Bibliografia

- 221.** Frederick DL, Ali SF, Gillam MP, Gossett J, Slikker W, Paule MG (1998). Acute effects of dexfenfluramine (d-FEN) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) before and after short-course, high-dose treatment. *Ann N Y Acad Sci.* 844:183-90.
- 222.** Freedman RR, Johanson CE, Tancer ME (2005). Thermoregulatory effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in humans. *Psychopharmacology (Berl).* 183:248-56.
- 223.** Freudenmann RW, Oxler F, Bernschneider-Reif S (2006). The origin of MDMA (ecstasy) revisited: the true story reconstructed from the original documents. *Addiction.* 101:1241-5.
- 224.** Gartside SE, Cowen PJ, Sharp T (1992). Effect of 5-hydroxy-L-tryptophan on the release of 5-HT in rat hypothalamus in vivo as measured by microdialysis. *Neuropharmacology.* 31:9-14.
- 225.** Gartside SE, McQuade R, Sharp T (1997). Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on 5-HT cell firing and release: comparison between dorsal and median raphe 5-HT systems. *Neuropharmacology.* 36:1697-703.
- 226.** Gawin FH (1991). Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science.* 251:1580-6.
- 227.** Gerasimov MR, Schiffer WK, Brodie JD, Lennon IC, Taylor SJ, Dewey SL (2000). gamma-aminobutyric acid mimetic drugs differentially inhibit the dopaminergic response to cocaine. *Eur J Pharmacol.* 395:129-35.
- 228.** Gerbing DW, Ahadi SA, Patton JH (1987). Toward a conceptualization of impulsivity: components across the behavioral and self-report domains. *Multivariate Behav Res.* 22:357-79.
- 229.** Gerra G, Zaimovic A, Giucastro G, Maestri D, Monica C, Sartori R, Caccavari R, Delsignore R (1998). Serotonergic function after (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in humans. *Int Clin Psychopharmacol.* 13:1-9.
- 230.** Gerra G, Zaimovic A, Moi G, Giusti F, Gardini S, Delsignore R, Laviola G, Macchia T, Brambilla F (2002). Effects of (+/-) 3,4-methylene-dioxymethamphetamine (ecstasy) on dopamine system function in humans. *Behav Brain Res.* 134:403-10.
- 231.** Gerra G, Bassignana S, Zaimovic A, Moi G, Bussandri M, Caccavari R, Brambilla F, Molina E (2003). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress in subjects with 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ("ecstasy") use history: correlation with dopamine receptor sensitivity. *Psychiatry Res.* 120:115-24.

- 232.** Giannaccini G, Betti L, Pirone A, Palego L, Fabiani O, Fabbrini L, Mascia G, Giusti L, Macchia M, Giusiani M, Martini C, Lucacchini A (2007). Short-term effects of 3,4-methylen-dioxy-metamphetamine (MDMA) on 5-HT(1A) receptors in the rat hippocampus. *Neurochem Int.* 51:496-506.
- 233.** Gilman M (1991). Beyond opiates...and in to the 90's. *Druglink.* 16-18.
- 234.** Glantz MD, Pickens RW (1992). Vulnerability to drug abuse. American Psychological Association. Washington DC. Washington, D.C.: pp 533.
- 235.** Glantz MD, Hartel CR (1999). Drug Abuse: Origins and Interventions. American Psychological Association. Washington, D.C.: pp 489.
- 236.** Glantz MD, Weinberg NZ, Miner LL, Colliver JD (1999). The Etiology of Drug Abuse: Mapping the Paths. En Glantz MD, Hartell CR (Eds.). Drug Abuse: Origins and Interventions. American Psychological Association. Washington, D.C.: pp 3-46.
- 237.** Goodwin AK, Pynnonen DM, Baker LE (2003). Serotonergic-dopaminergic mediation of MDMA's discriminative stimulus effects in a three-choice discrimination. *Pharmacol Biochem Behav.* 74:987-95.
- 238.** Gordon HW (2002). Early environmental stress and biological vulnerability to drug abuse. *Psychoneuroendocrinology.* 27:115-26.
- 239.** Gordon CJ, Fogelson L (1994). Metabolic and thermoregulatory responses of the rat maintained in acrylic or wire-screen cages: implications for pharmacological studies. *Physiol Behav.* 56:73-9.
- 240.** Gordon CJ, Watkinson WP, O'Callaghan JP, Miller DB (1991). Effects of 3,4-methylenedioxy-metamphetamine on autonomic thermoregulatory responses of the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 38:339-44.
- 241.** Gough B, Ali SF, Slikker W Jr, Holson RR (1991). Acute effects of 3,4-methylenedioxy-metamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol Biochem Behav.* 39:619-23.
- 242.** Gould E, Woolf NJ, Butcher LL (1991). Postnatal development of cholinergic neurons in the rat: I. Forebrain. *Brain Res Bull.* 27:767-89.
- 243.** Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J, Tuchtenhagen F, Pelz S, Becker S, Kunert HJ, Fimm B, Sass H (2000). Impaired cognitive performance in drug free users of recreational ecstasy (MDMA). *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 68:719-25.

Bibliografía

- 244.** Gouzoulis-Mayfrank E, Thimm B, Rezk M, Hensen G, Daumann J (2003). Memory impairment suggests hippocampal dysfunction in abstinent ecstasy users. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27:819-27.
- 245.** Graeff FG (1997). Serotonergic systems. *Psychiatr Clin North Am*. 20:723-39.
- 246.** Graeff FG, Viana MB, Mora PO (1997). Dual role of 5-HT in defense and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 21:791-9.
- 247.** Granado N, Escobedo I, O'Shea E, Colado I, Moratalla R (2008). Early loss of dopaminergic terminals in striosomes after MDMA administration to mice. *Synapse*. 62:80-4.
- 248.** Grande C, Zhu H, Martin AB, Lee M, Ortiz O, Hiroi N, Moratalla R (2004). Chronic treatment with atypical neuroleptics induces striosomal FosB/DeltaFosB expression in rats. *Biol Psychiatry*. 55:457-63.
- 249.** Green AR, McGregor IS (2002). On the anxiogenic and anxiolytic nature of long-term cerebral 5-HT depletion following MDMA. *Psychopharmacology (Berl)*. 162:448-50.
- 250.** Green AR, Cross AJ, Goodwin GM (1995). Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)*. 119:247-60.
- 251.** Green AR, Mehan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI (2003). The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev*. 55:463-508.
- 252.** Green AR, O'Shea E, Colado MI (2004a). A review of the mechanisms involved in the acute MDMA (ecstasy)-induced hyperthermic response. *Eur J Pharmacol*. 500:3-13.
- 253.** Green AR, Sanchez V, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI (2004b). Effect of ambient temperature and a prior neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on the hyperthermic response of rats to a single or repeated ("binge" ingestion) low dose of MDMA. *Psychopharmacology (Berl)*. 173:264-9.
- 254.** Green AR, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI (2005). Studies on the effect of MDMA ("ecstasy") on the body temperature of rats housed at different ambient room temperatures. *Br J Pharmacol*. 146:306-12.
- 255.** Greer G, Tolbert R (1990). The therapeutic use of MDMA. En Peroutka SJ (Ed.). *Ecstasy: The Clinical, Pharmacological and Neurotoxicological Effects of the Drug MDMA*. Kluwer Academic Publishers. Boston, MA.: pp 21-35.

- 256.** Grimm JW, Hope BT, Wise RA, Shaham Y (2001). Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature*. 412:141-2.
- 257.** Gudelsky GA, Nash JF (1996). Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J Neurochem*. 66:243-9.
- 258.** Gudelsky GA, Yamamoto BK (2008). Actions of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on cerebral dopaminergic, serotonergic and cholinergic neurons. *Pharmacol Biochem Behav*. 90:198-207.
- 259.** Gurtman CG, Morley KC, Li KM, Hunt GE, McGregor IS (2002). Increased anxiety in rats after 3,4-methylenedioxymethamphetamine: association with serotonin depletion. *Eur J Pharmacol*. 446:89-96.
- 260.** Halpern JH, Pope HG Jr, Sherwood AR, Barry S, Hudson JI, Yurgelun-Todd D (2004). Residual neuropsychological effects of illicit 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in individuals with minimal exposure to other drugs. *Drug Alcohol Depend*. 75:135-47.
- 261.** Hall FS, Devries AC, Fong GW, Huang S, Pert A (1999). Effects of 5,7-dihydroxytryptamine depletion of tissue serotonin levels on extracellular serotonin in the striatum assessed with in vivo microdialysis: relationship to behavior. *Synapse*. 33:16-25.
- 262.** Halliwell B, Kaur H, Ingelman-Sundberg M (1991). Hydroxylation of salicylate as an assay for hydroxyl radicals: a cautionary note. *Free Radic Biol Med*. 10:439-41.
- 263.** Hammersley R, Ditton J, Smith I, Short E (1999). Patterns of ecstasy use by drug users. *Br J Criminol*. 39:625-47.
- 264.** Han DD, Gu HH (2006). Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs. *BMC Pharmacol*. 6:6.
- 265.** Handley SL, McBlane JW (1993a). An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 29:129-38.
- 266.** Handley SL, McBlane JW (1993b). Serotonin mechanisms in animal models of anxiety. *Braz J Med Biol Res*. 26:1-13.
- 267.** Handley SL, McBlane JW (1993c). 5HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. 112:13-20.
- 268.** Hansen D, Maycock B, Lower T (2001). "Weddings, parties, anythingellipsis", a qualitative analysis of ecstasy use in Perth, Western Australia. *Int J Drug Policy*. 12:181-199.

Bibliografia

- 269.** Hansen JP, Riddle EL, Sandoval V, Brown JM, Gibb JW, Hanson GR, Fleckenstein AE (2002). Methylenedioxymethamphetamine decreases plasmalemmal and vesicular dopamine transport: mechanisms and implications for neurotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:1093-100.
- 270.** Hanson GR, Rau KS, Fleckenstein AE (2004). The methamphetamine experience: a NIDA partnership. *Neuropharmacology.* 47:92-100.
- 271.** Hanson KL, Luciana M (2004). Neurocognitive function in users of MDMA: the importance of clinically significant patterns of use. *Psychol Med.* 34:229-46.
- 272.** Hanson KL, Luciana M, Sullwold K (2008). Reward-related decision-making deficits and elevated impulsivity among MDMA and other drug users. *Drug Alcohol Depend.* 96:99-110.
- 273.** Harrison RJ, Connor DF, Nowak C, Melloni RH Jr (2000). Chronic low-dose cocaine treatment during adolescence facilitates aggression in hamsters. *Physiol Behav.* 69:555-62.
- 274.** Hascoët M, Bourin M (1998). A new approach to the light/dark test procedure in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 60:645-53.
- 275.** Hatzidimitriou G, McCann UD, Ricaurte GA (1999). Altered serotonin innervation patterns in the forebrain of monkeys treated with (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine seven years previously: factors influencing abnormal recovery. *J Neurosci.* 19:5096-107.
- 276.** Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K (2005). Persistent anxiogenic effects of a single or repeated doses of cocaine and methamphetamine: interactions with endogenous cannabinoid receptor ligands. *Behav Pharmacol.* 16:395-404.
- 277.** Hedner J, Lundell KH, Breese GR, Mueller RA, Hedner T (1986). Developmental variations in CSF monoamine metabolites during childhood. *Biol Neonate.* 49:190-7.
- 278.** Heffernan TM, Ling J, Scholey AB (2001). Subjective ratings of prospective memory deficits in MDMA ("ecstasy") users. *Hum Psychopharmacol.* 16:339-344.
- 279.** Heffner TG, Seiden LS (1982). Possible involvement of serotonergic neurons in the reduction of locomotor hyperactivity caused by amphetamine in neonatal rats depleted of brain dopamine. *Brain Res.* 244:81-90.
- 280.** Heffner TG, Hartman JA, Seiden LS (1980). A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 13:453-6.
- 281.** Hefner K, Holmes A (2007). Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior across adolescence in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 176:210-5.

- 282.** Helmlin HJ, Bracher K, Bourquin D, Vonlanthen D, Brenneisen R (1996). Analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its metabolites in plasma and urine by HPLC-DAD and GC-MS. *J Anal Toxicol.* 20:432-40.
- 283.** Henry DJ, White FJ (1991). Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D1 dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther.* 258:882-90.
- 284.** Herin DV, Liu S, Ullrich T, Rice KC, Cunningham KA (2005). Role of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the hyperlocomotive and hyperthermic effects of (+)-3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Psychopharmacology (Berl).* 178:505-13.
- 285.** Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 24:151-80.
- 286.** Hernández-López C, Farré M, Roset PN, Menoyo E, Pizarro N, Ortuño J, Torrens M, Camí J, de La Torre R (2002). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and alcohol interactions in humans: psychomotor performance, subjective effects, and pharmacokinetics. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:236-44.
- 287.** Herzig V, Capuani EM, Kovar KA, Schmidt WJ (2005). Effects of MPEP on expression of food-, MDMA- or amphetamine-conditioned place preference in rats. *Addict Biol.* 10:243-9.
- 288.** Hewitt KE, Green AR (1994). Chlormethiazole, dizocilpine and haloperidol prevent the degeneration of serotonergic nerve terminals induced by administration of MDMA ("Ecstasy") to rats. *Neuropharmacology.* 33:1589-95.
- 289.** Hewton R, Salem A, Irvine RJ (2007). Potentiation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced 5-HT release in the rat substantia nigra by clorgyline, a monoamine oxidase A inhibitor. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34:1051-7.
- 290.** Himmelsbach CK (1943). Can the euphoric, analgetic, and physical dependence effects of drugs be separated? IV With reference to physical dependence. *Fed Proc.* 2:201-3.
- 291.** Hiramatsu M, Cho AK (1990). Enantiomeric differences in the effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine on extracellular monoamines and metabolites in the striatum of freely-moving rats: an in vivo microdialysis study. *Neuropharmacology.* 29:269-75.

Bibliografía

- 292.** Ho YJ, Pawlak CR, Guo L, Schwarting RK (2004). Acute and long-term consequences of single MDMA administration in relation to individual anxiety levels in the rat. *Behav Brain Res.* 149:135-44.
- 293.** Hoebel BG (1985). Brain neurotransmitters in food and drug reward. *Am J Clin Nutr.* 42:1133-50.
- 294.** Horan B, Gardner EL, Ashby CR Jr (2000). Enhancement of conditioned place preference response to cocaine in rats following subchronic administration of 3, 4-methylenedioxyamphetamine (MDMA). *Synapse.* 35:160-2.
- 295.** Hoshi R, Mullins K, Boundy C, Brignell C, Piccini P, Curran HV (2007). Neurocognitive function in current and ex-users of ecstasy in comparison to both matched polydrug-using controls and drug-naïve controls. *Psychopharmacology (Berl).* 194:371-9.
- 296.** Hubbard RL, Craddock SG, Anderson J (2003). Overview of 5-year followup outcomes in the drug abuse treatment outcome studies (DATOS). *J Subst Abuse Treat.* 25:125-34.
- 297.** Hubner CB, Bird M, Rassnick S, Kornetsky C (1988). The threshold lowering effects of MDMA (ecstasy) on brain-stimulation reward. *Psychopharmacology (Berl).* 95:49-51.
- 298.** Huether G, Zhou D, Rüter E (1997). Causes and consequences of the loss of serotonergic presynapses elicited by the consumption of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its congeners. *J Neural Transm.* 104:771-94.
- 299.** Hurd YL, Herkenham M (1992). Influence of a single injection of cocaine, amphetamine or GBR 12909 on mRNA expression of striatal neuropeptides. *Brain Res Mol Brain Res.* 16:97-104.
- 300.** Huttenlocher PR (1984). Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *Am J Ment Defic.* 88:488-96.
- 301.** Informe de la encuesta estatal sobre el uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES) (2007). Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General de Sanidad Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. España.: pp 1-47.
- 302.** Insel TR, Battaglia G, Johannessen JN, Marra S, De Souza EB (1989). 3,4-Methylenedioxyamphetamine ("ecstasy") selectively destroys brain serotonin terminals in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther.* 249:713-20.

- 303.** Iravani MM, Asari D, Patel J, Wiczorek WJ, Kruk ZL (2000). Direct effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on serotonin or dopamine release and uptake in the caudate putamen, nucleus accumbens, substantia nigra pars reticulata, and the dorsal raphé nucleus slices. *Synapse*. 36:275-85.
- 304.** Iravani MM, Syed E, Jackson MJ, Johnston LC, Smith LA, Jenner P (2005). A modified MPTP treatment regime produces reproducible partial nigrostriatal lesions in common marmosets. *Eur J Neurosci*. 21:841-54.
- 305.** Itzhak Y, Achat-Mendes C (2004). Methamphetamine and MDMA (ecstasy) neurotoxicity: "of mice and men". *IUBMB Life*. 56:249-55.
- 306.** Itzhak Y, Ali SF (2006). Role of nitrenergic system in behavioral and neurotoxic effects of amphetamine analogs. *Pharmacol Ther*. 109:246-62.
- 307.** Itzhak Y, Ali SF, Achat CN, Anderson KL (2003). Relevance of MDMA ("ecstasy")-induced neurotoxicity to long-lasting psychomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 166:241-8.
- 308.** Itzhak Y, Achat-Mendes CN, Ali SF, Anderson KL (2004). Long-lasting behavioral sensitization to psychostimulants following p-chloroamphetamine-induced neurotoxicity in mice. *Neuropharmacology*. 46:74-84.
- 309.** Izenwasser S (2005). Differential effects of psychoactive drugs in adolescents and adults. *Crit Rev Neurobiol*. 17:51-67.
- 310.** Jacobsen LK, Mencl WE, Pugh KR, Skudlarski P, Krystal JH (2004). Preliminary evidence of hippocampal dysfunction in adolescent MDMA ("ecstasy") users: possible relationship to neurotoxic effects. *Psychopharmacology (Berl)*. 173:383-90.
- 311.** Jansen KL (1999). Ecstasy (MDMA) dependence. *Drug Alcohol Depend*. 53:121-4.
- 312.** Jayanthi S, Ladenheim B, Andrews AM, Cadet JL (1999). Overexpression of human copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice attenuates oxidative stress caused by methylenedioxymethamphetamine (Ecstasy). *Neuroscience*. 91:1379-87.
- 313.** Jensen KF, Olin J, Haykal-Coates N, O'Callaghan J, Miller DB, de Olmos JS (1993). Mapping toxicant-induced nervous system damage with a cupric silver stain: a quantitative analysis of neural degeneration induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *NIDA Res Monogr*. 136:133-49.
- 314.** Jerison HJ (1988). Evolutionary biology of intelligence: the nature of the problem. En Jerison HJ, Jerison I (Eds). *Intelligence and evolutionary biology*. Springer. Berlin.: pp 1-11.

Bibliografia

- 315.** Johanson CE, Fischman MW (1989). The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev.* 41:3-52.
- 316.** Johnson EA, Sharp DS, Miller DB (2000). Restraint as a stressor in mice: against the dopaminergic neurotoxicity of D-MDMA, low body weight mitigates restraint-induced hypothermia and consequent neuroprotection. *Brain Res.* 875:107-18.
- 317.** Johnson EA, Shvedova AA, Kisin E, O'Callaghan JP, Kommineni C, Miller DB (2002a). d-MDMA during vitamin E deficiency: effects on dopaminergic neurotoxicity and hepatotoxicity. *Brain Res.* 933:150-63.
- 318.** Johnson EA, O'Callaghan JP, Miller DB (2002b). Chronic treatment with supraphysiological levels of corticosterone enhances D-MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in the C57BL/6J female mouse. *Brain Res.* 933:130-8.
- 319.** Johnson M, Bush LG, Gibb JW, Hanson GR (1991). Blockade of the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced changes in neurotensin and dynorphin A systems. *Eur J Pharmacol.* 193:367-70.
- 320.** Johnston L, O'Malley P, Bachman J, Schulenberg JE (2003). Monitoring the future: National survey results on adolescent drug use, overview of key Findings. National Institute on Drug Abuse. Bethesda, MD.: pp 1-63.
- 321.** Jones AL, Volans G (1999). Management of self poisoning. *BMJ.* 319:1414-7.
- 322.** Jones DC, Lau SS, Monks TJ (2004). Thioether metabolites of 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine inhibit human serotonin transporter (hSERT) function and simultaneously stimulate dopamine uptake into hSERT-expressing SK-N-MC cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 311:298-306.
- 323.** Julien RM (1998). A primer of drug action (8a ed). WH Freeman and company. New York.
- 324.** Kalant H (2001). The pharmacology and toxicology of "ecstasy" (MDMA) and related drugs. *CMAJ.* 165:917-28.
- 325.** Kalivas PW (1993). Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev.* 18:75-113.
- 326.** Kalivas PW, Duffy P, White SR (1998). MDMA elicits behavioral and neurochemical sensitization in rats. *Neuropsychopharmacology.* 18:469-79.
- 327.** Kalsbeek A, Voorn P, Buijs RM, Pool CW, Uylings HB (1988). Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol.* 269:58-72.

- 328.** Kalueff AV, LaPorte JL, Murphy DL (2008). Perspectives on genetic animal models of serotonin toxicity. *Neurochem Int.* 52:649-58.
- 329.** Kandel D (1975). Stages in adolescent involvement in drug use. *Science.* 190:912-4.
- 330.** Kandel D, Faust R (1975). Sequence and stages in patterns of adolescent drug use. *Arch Gen Psychiatry.* 32:923-32.
- 331.** Kandel DB, Kessler RC, Margulies RZ (1978). Antecedents of adolescent initiation into stages of drug use: A developmental analysis. *J Youth Adolesc.* 7:13-40.
- 332.** Kankaanpää A, Meririnne E, Lillsunde P, Seppälä T (1998). The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rat nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav.* 59:1003-9.
- 333.** Kehne JH, Ketteler HJ, McCloskey TC, Sullivan CK, Dudley MW, Schmidt CJ (1996). Effects of the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist MDL 100,907 on MDMA-induced locomotor stimulation in rats. *Neuropsychopharmacology.* 15:116-24.
- 334.** Kelley AE, Delfs JM (1991). Dopamine and conditioned reinforcement. II. Contrasting effects of amphetamine microinjection into the nucleus accumbens with peptide microinjection into the ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl).* 103:197-203.
- 335.** Kellogg CK (1998). Early developmental modulation of GABA_A receptor function. Influence on adaptive responses. *Perspect Dev Neurobiol.* 5:219-34.
- 336.** Kelz MB, Chen J, Carlezon WA Jr, Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang YJ, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranaukas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR, Nestler EJ (1999). Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature.* 401:272-6.
- 337.** Kim JA, Pollak KA, Hjelmstad GO, Fields HL (2004). A single cocaine exposure enhances both opioid reward and aversion through a ventral tegmental area-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:5664-9.
- 338.** Kindlundh-Högberg AM, Schiöth HB, Svenningsson P (2007). Repeated intermittent MDMA binges reduce DAT density in mice and SERT density in rats in reward regions of the adolescent brain. *Neurotoxicology.* 28:1158-69.
- 339.** Kish SJ (2002). How strong is the evidence that brain serotonin neurons are damaged in human users of ecstasy?. *Pharmacol Biochem Behav.* 71:845-55.
- 340.** Kish SJ, Furukawa Y, Ang L, Vorce SP, Kalasinsky KS (2000). Striatal serotonin is depleted in brain of a human MDMA (Ecstasy) user. *Neurology.* 55:294-6.

Bibliografía

- 341.** Klebaur JE, Phillips SB, Kelly TH, Bardo MT (2001a). Exposure to novel environmental stimuli decreases amphetamine self-administration in rats. *Exp Clin Psychopharmacol.* 9:372-9.
- 342.** Klebaur JE, Bevins RA, Segar TM, Bardo MT (2001b). Individual differences in behavioral responses to novelty and amphetamine self-administration in male and female rats. *Behav Pharmacol.* 12:267-75.
- 343.** Kleven MS, Woolverton WL, Seiden LS (1989). Evidence that both intragastric and subcutaneous administration of methylenedioxymethylamphetamine (MDMA) produce serotonin neurotoxicity in rhesus monkeys. *Brain Res.* 488:121-5.
- 344.** Koch S, Galloway MP (1997). MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. *J Neural Transm.* 104:135-46.
- 345.** Koenig J, Lazarus C, Jeltsch H, Ben Hamida S, Riegert C, Kelche C, Jones BC, Cassel JC (2005). MDMA (ecstasy) effects in pubescent rats: Males are more sensitive than females. *Pharmacol Biochem Behav.* 81:635-44.
- 346.** Koff JM, Shuster L, Miller LG (1994). Chronic cocaine administration is associated with behavioral sensitization and time-dependent changes in striatal dopamine transporter binding. *J Pharmacol Exp Ther.* 268:277-82.
- 347.** Koob GF, Le Moal M (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science.* 278:52-8.
- 348.** Koob GF, Le Moal M (2005). *Neurobiology of Addiction.* Academic Press (Elsevier). pp 1-502.
- 349.** Koprach JB, Chen EY, Kanaan NM, Campbell NG, Kordower JH, Lipton JW (2003). Prenatal 3,4-methylenedioxymethylamphetamine (ecstasy) alters exploratory behavior, reduces monoamine metabolism, and increases forebrain tyrosine hydroxylase fiber density of juvenile rats. *Neurotoxicol Teratol.* 25:509-17.
- 350.** Kostović I (1990). Structural and histochemical reorganization of the human prefrontal cortex during perinatal and postnatal life. *Prog Brain Res.* 85:223-39.
- 351.** Kovács GG, Andó RD, Adori C, Kirilly E, Benedek A, Palkovits M, Bagdy G (2007). 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.* 33:193-203.
- 352.** Kuypers KP, Ramaekers JG (2005). Transient memory impairment after acute dose of 75mg 3,4-Methylene-dioxymethylamphetamine. *J Psychopharmacol.* 19:633-9.

- 353.** Kuypers KP, Ramaekers JG (2007). Acute dose of MDMA (75 mg) impairs spatial memory for location but leaves contextual processing of visuospatial information unaffected. *Psychopharmacology (Berl)*. 189:557-63.
- 354.** Lamb RJ, Griffiths RR (1987). Self-injection of d,1-3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) in the baboon. *Psychopharmacology (Berl)*. 91:268-72.
- 355.** Larson R, Richards, MH (1994) (Eds.). *Divergent realities: the emotional lives of mothers, fathers, and adolescents*. New York: Basic Books.
- 356.** Larson RW, Moneta G, Richards MH, Wilson S (2002). Continuity, stability, and change in daily emotional experience across adolescence. *Child Dev*. 73:1151-65.
- 357.** Lauder JM (1990). Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann N Y Acad Sci*. 600:297-313.
- 358.** Lauder JM, Bloom FE (1974). Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, Raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J Comp Neurol*. 155:469-81.
- 359.** Laverty R, Logan BJ (1990). Protection by MK 801 and other drugs of methylenedioxyamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats and mice. *Eur J Pharmacol*. 183:451-2.
- 360.** Laviola G, Dell’Omo G (1997). Precocious weaning and changes in social variables during pre-puberty affect cocaine reinforcing properties in adult mice. *Psychobiology*. 25:163-70.
- 361.** Laviola G, Dell’Omo G, Alleva E, Bignami G (1992). Ontogeny of cocaine hyperactivity and conditioned place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 107:221-8.
- 362.** Laviola G, Dell’Omo G, Chiarotti F, Bignami G (1994). d-amphetamine conditioned place preference in developing mice: relations with changes in activity and stereotypies. *Behav Neurosci*. 108:514-24.
- 363.** Laviola G, Wood RD, Kuhn C, Francis R, Spear LP (1995). Cocaine sensitization in periadolescent and adult rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 275:345-57.
- 364.** Laviola G, Adriani W, Terranova ML, Gerra G (1999). Psychobiological risk factors for vulnerability to psychostimulants in human adolescents and animal models. *Neurosci Biobehav Rev*. 23:993-1010.

Bibliografia

- 365.** Laviola G, Adriani W, Morley-Fletcher S, Terranova ML (2002). Peculiar response of adolescent mice to acute and chronic stress and to amphetamine: evidence of sex differences. *Behav Brain Res.* 130:117-25.
- 366.** Laviola G, Macrì S, Morley-Fletcher S, Adriani W (2003). Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci Biobehav Rev.* 27:19-31.
- 367.** Laws KR, Kokkalis J (2007). Ecstasy (MDMA) and memory function: a meta-analytic update. *Hum Psychopharmacol.* 22:381-8.
- 368.** Leonard BE (1997). *Fundamentals of Psychopharmacology.* (2a ed.). John Wiley & sons. Chichester, UK.: pp 159-62.
- 369.** Leonardi ET, Azmitia EC (1994). MDMA (ecstasy) inhibition of MAO type A and type B: comparisons with fenfluramine and fluoxetine (Prozac). *Neuropsychopharmacology.* 10:231-8.
- 370.** Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 274:1527-31.
- 371.** Leslie FM, Loughlin SE, Wang R, Perez L, Lotfipour S, Belluzia JD (2004). Adolescent development of forebrain stimulant responsiveness: insights from animal studies. *Ann N Y Acad Sci.* 1021:148-59.
- 372.** Lewis DA (1997). Development of the prefrontal cortex during adolescence: insights into vulnerable neural circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 16:385-98.
- 373.** Li SM, Ren YH, Zheng JW (2002). Effect of 7-nitroindazole on drug-priming reinstatement of D-methamphetamine-induced conditioned place preference. *Eur J Pharmacol.* 443:205-6.
- 374.** Lieb R, Schuetz CG, Pfister H, von Sydow K, Wittchen H (2002). Mental disorders in ecstasy users: a prospective-longitudinal investigation. *Drug Alcohol Depend.* 68:195-207.
- 375.** Liechti ME, Vollenweider FX (2000a). The serotonin uptake inhibitor citalopram reduces acute cardiovascular and vegetative effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in healthy volunteers. *J Psychopharmacol.* 14:269-74.
- 376.** Liechti ME, Vollenweider FX (2000b). Acute psychological and physiological effects of MDMA ("Ecstasy") after haloperidol pretreatment in healthy humans. *Eur Neuropsychopharmacol.* 10:289-95.

- 377.** Liechti ME, Vollenweider FX (2001). Which neuroreceptors mediate the subjective effects of MDMA in humans? A summary of mechanistic studies. *Hum Psychopharmacol.* 16:589-98.
- 378.** Liechti ME, Saur MR, Gamma A, Hell D, Vollenweider FX (2000a). Psychological and physiological effects of MDMA ("Ecstasy") after pretreatment with the 5-HT(2) antagonist ketanserin in healthy humans. *Neuropsychopharmacology.* 23:396-404.
- 379.** Liechti ME, Baumann C, Gamma A, Vollenweider FX (2000b). Acute psychological effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") are attenuated by the serotonin uptake inhibitor citalopram. *Neuropsychopharmacology.* 22:513-21.
- 380.** Liechti ME, Gamma A, Vollenweider FX (2001). Gender differences in the subjective effects of MDMA. *Psychopharmacology (Berl).* 154:161-8.
- 381.** Lile JA, Ross JT, Nader MA (2005). A comparison of the reinforcing efficacy of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") with cocaine in rhesus monkeys. *Drug Alcohol Depend.* 78:135-40.
- 382.** Lim HK, Foltz RL (1988). In vivo and in vitro metabolism of 3,4-(methylenedioxy)methamphetamine in the rat: identification of metabolites using an ion trap detector. *Chem Res Toxicol.* 1:370-8.
- 383.** Lin LY, Kumagai Y, Cho AK (1992). Enzymatic and chemical demethylenation of (methylenedioxy)amphetamine and (methylenedioxy)methamphetamine by rat brain microsomes. *Chem Res Toxicol.* 5:401-6.
- 384.** Lin HQ, Atrens DM, Christie MJ, Jackson DM, McGregor IS (1993). Comparison of conditioned taste aversions produced by MDMA and d-amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 46:153-6.
- 385.** Lin LY, Fujimoto M, Distefano EW, Schmitz DA, Jayasinghe A, Cho AK (1996). Selective mechanism-based inactivation of rat CYP2D by 4-allyloxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 277:595-603.
- 386.** Lin LY, Di Stefano EW, Schmitz DA, Hsu L, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT, Cho AK (1997a). Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. *Drug Metab Dispos.* 25:1059-64.
- 387.** Lin HQ, Jackson DM, Atrens DM, Christie MJ, McGregor IS (1997b). Serotonergic modulation of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-elicited reduction of response rate but not rewarding threshold in accumbal self-stimulation. *Brain Res.* 744:351-7.

Bibliografía

- 388.** Lin HQ, Burden PM, Christie MJ, Johnston GA (1999). The anxiogenic-like and anxiolytic-like effects of MDMA on mice in the elevated plus-maze: a comparison with amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav.* 62:403-8.
- 389.** Lister RG (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl).* 92:180-5.
- 390.** Logan BJ, Laverty R, Sanderson WD, Yee YB (1988). Differences between rats and mice in MDMA (methylenedioxymethylamphetamine) neurotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 152:227-34.
- 391.** López-Muñoz F, Rubio G, González-Martínez E, Álamo C (2004). Éxtasis (3, 4-metilendioximetanfetamina, MDMA): aspectos farmacológicos, clínicos y criminológicos. *Trastornos Adictivos.* 6:16-38.
- 392.** Lu L, Grimm JW, Dempsey J, Shaham Y (2004). Cocaine seeking over extended withdrawal periods in rats: different time courses of responding induced by cocaine cues versus cocaine priming over the first 6 months. *Psychopharmacology (Berl).* 176:101-8.
- 393.** Lucas G, Bonhomme N, De Deurwaerdère P, Le Moal M, Spampinato U (1997). 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} agonist and ritanserin, a 5-HT_{2A/C} antagonist, reverse haloperidol-induced catalepsy in rats independently of striatal dopamine release. *Psychopharmacology (Berl).* 131:57-63.
- 394.** Lucas G, De Deurwaerdère P, Porrás G, Spampinato U (2000a). Endogenous serotonin enhances the release of dopamine in the striatum only when nigro-striatal dopaminergic transmission is activated. *Neuropharmacology.* 39:1984-95.
- 395.** Lucas G, De Deurwaerdère P, Caccia S, Umberto Spampinato (2000b). The effect of serotonergic agents on haloperidol-induced striatal dopamine release in vivo: opposite role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor subtypes and significance of the haloperidol dose used. *Neuropharmacology.* 39:1053-63.
- 396.** Lyles J, Cadet JL (2003). Methylenedioxymethylamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev.* 42:155-68.
- 397.** Lyvers M (2006). Recreational ecstasy use and the neurotoxic potential of MDMA: current status of the controversy and methodological issues. *Drug Alcohol Rev.* 25:269-76.
- 398.** Lluch J, Rodríguez-Arias M, Aguilar MA, Miñarro J (2005). Role of dopamine and glutamate receptors in cocaine-induced social effects in isolated and grouped male OF1 mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 82:478-87.
- 399.** MacCoun R (1998). What sense (if any) is marijuana a gateway drug?. *The FAS Drug Policy Analysis Bulletin* (4). En: <http://www.fas.org/drugs/issue4.htm#gateway>.

- 400.** Malberg JE, Seiden LS (1998). Small changes in ambient temperature cause large changes in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)-induced serotonin neurotoxicity and core body temperature in the rat. *J Neurosci.* 18:5086-94.
- 401.** Malberg JE, Sabol KE, Seiden LS (1996). Co-administration of MDMA with drugs that protect against MDMA neurotoxicity produces different effects on body temperature in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 278:258-67.
- 402.** Maldonado C, Rodríguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Miñarro J (2006). Gamma-hydroxybutyric acid affects the acquisition and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Behav Pharmacol.* 17:119-31.
- 403.** Maldonado C, Rodríguez-Arias M, Castillo A, Aguilar MA, Miñarro J (2007). Effect of memantine and CNQX in the acquisition, expression and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 31:932-9.
- 404.** Maldonado E, Navarro JF (2000). Effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) on anxiety in mice tested in the light-dark box. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 24:463-72.
- 405.** Maldonado E, Navarro JF (2001). MDMA ("ecstasy") exhibits an anxiogenic-like activity in social encounters between male mice. *Pharmacol Res.* 44:27-31.
- 406.** Malpass A, White JM, Irvine RJ, Somogyi AA, Bochner F (1999). Acute toxicity of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in Sprague-Dawley and Dark Agouti rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 64:29-34.
- 407.** Malle BF, Neubauer AC (1991). Impulsivity, reflection, and questionnaire response latencies-no evidence for a broad impulsivity trait. *Pers Individ Differ.* 12:865-71.
- 408.** Mann H, Ladenheim B, Hirata H, Moran TH, Cadet JL (1997). Differential toxic effects of methamphetamine (METH) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in multidrug-resistant (mdr1a) knockout mice. *Brain Res.* 769:340-6.
- 409.** Manzanedo C, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2001). Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res.* 121:189-97.
- 410.** Marek GJ, Vosmer G, Seiden LS (1990). Dopamine uptake inhibitors block long-term neurotoxic effects of methamphetamine upon dopaminergic neurons. *Brain Res.* 513:274-9.
- 411.** Marinelli M, Piazza PV (2002). Interaction between glucocorticoid hormones, stress and psychostimulant drugs. *Eur J Neurosci.* 16:387-94.

Bibliografía

- 412.** Marona-Lewicka D, Rhee GS, Sprague JE, Nichols DE (1996). Reinforcing effects of certain serotonin-releasing amphetamine derivatives. *Pharmacol Biochem Behav.* 53:99-105.
- 413.** Marston HM, Reid ME, Lawrence JA, Olverman HJ, Butcher SP (1999). Behavioural analysis of the acute and chronic effects of MDMA treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 144:67-76.
- 414.** Mas M, Farré M, de la Torre R, Roset PN, Ortuño J, Segura J, Camí J (1999). Cardiovascular and neuroendocrine effects and pharmacokinetics of 3, 4-methylenedioxymethamphetamine in humans. *J Pharmacol Exp Ther.*290:136-45.
- 415.** Maurer HH, Bickeboeller-Friedrich J, Kraemer T, Peters FT (2000). Toxicokinetics and analytical toxicology of amphetamine-derived designer drugs ("Ecstasy"). *Toxicol Lett.* 112-113:133-42.
- 416.** Maxwell JC (2005). Party drugs: properties, prevalence, patterns, and problems. *Subst Use Misuse.* 40:1203-40.
- 417.** McCann UD, Ricaurte GA (1992). MDMA ("ecstasy") and panic disorder: induction by a single dose. *Biol Psychiatry.* 32:950-3.
- 418.** McCann UD, Szabo Z, Scheffel U, Dannals RF, Ricaurte GA (1998). Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet.* 352:1433-7.
- 419.** McCann UD, Mertl M, Eligulashvili V, Ricaurte GA (1999a). Cognitive performance in (+/-) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") users: a controlled study. *Psychopharmacology (Berl).* 143:417-25.
- 420.** McCann UD, Eligulashvili V, Mertl M, Murphy DL, Ricaurte GA (1999b). Altered neuroendocrine and behavioral responses to m-chlorophenylpiperazine in 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) users. *Psychopharmacology (Berl).* 147:56-65.
- 421.** McCann UD, Eligulashvili V, Ricaurte GA (2000). (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy")-induced serotonin neurotoxicity: clinical studies. *Neuropsychobiology.* 42:11-6.
- 422.** McCann UD, Szabo Z, Seckin E, Rosenblatt P, Mathews WB, Ravert HT, Dannals RF, Ricaurte GA (2005). Quantitative PET studies of the serotonin transporter in MDMA users and controls using [11C]McN5652 and [11C]DASB. *Neuropsychopharmacology.* 30:1741-50.

- 423.** McCardle K, Luebbers S, Carter JD, Croft RJ, Stough C (2004). Chronic MDMA (ecstasy) use, cognition and mood. *Psychopharmacology (Berl)*. 173:434-9.
- 424.** McCarthy LE, Mannelli P, Niculescu M, Gingrich K, Unterwald EM, Ehrlich ME (2004). The distribution of cocaine in mice differs by age and strain. *Neurotoxicol Teratol*. 26:839-48.
- 425.** McCreary AC, Bankson MG, Cunningham KA (1999). Pharmacological studies of the acute and chronic effects of (+)-3, 4-methylenedioxymethamphetamine on locomotor activity: role of 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B/1D) receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 290:965-73.
- 426.** McGregor IS, Gurtman CG, Morley KC, Clemens KJ, Blokland A, Li KM, Cornish JL, Hunt GE (2003a). Increased anxiety and "depressive" symptoms months after MDMA ("ecstasy") in rats: drug-induced hyperthermia does not predict long-term outcomes. *Psychopharmacology (Berl)*. 168:465-74.
- 427.** McGregor IS, Clemens KJ, Van der Plasse G, Li KM, Hunt GE, Chen F, Lawrence AJ (2003b). Increased anxiety 3 months after brief exposure to MDMA ("Ecstasy") in rats: association with altered 5-HT transporter and receptor density. *Neuropsychopharmacology*. 28:1472-84.
- 428.** McGue M, Iacono WG, Legrand LN, Elkins I (2001a). Origins and consequences of age at first drink. II. Familial risk and heritability. *Alcohol Clin Exp Res*. 25:1166-73.
- 429.** McGue M, Iacono WG, Legrand LN, Malone S, Elkins I (2001b). Origins and consequences of age at first drink. I. Associations with substance-use disorders, disinhibitory behavior and psychopathology, and P3 amplitude. *Alcohol Clin Exp Res*. 25:1156-65.
- 430.** McLellan AT, McKay J (1998). The treatment of addiction: what can research offer practice? En Lamb S, Greenlick MR, McCarty D (Eds.). *Bridging the Gap Between Practice and Research: Forging Partnerships with Community-Based Drug and Alcohol Treatment*. Nat Acad Press, Washington D.C.: pp 147-85.
- 431.** McLellan AT, Lewis DC, O'Brien CP, Kleber HD (2000). Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *JAMA*. 284:1689-95.
- 432.** McNamara MG, Kelly JP, Leonard BE (1995). Some behavioural and neurochemical aspects of subacute (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 52:479-84.

Bibliografía

- 433.** Mechan AO, O'Shea E, Elliott JM, Colado MI, Green AR (2001). A neurotoxic dose of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; ecstasy) to rats results in a long-term defect in thermoregulation. *Psychopharmacology (Berl)*. 155:413-8.
- 434.** Mechan AO, Moran PM, Elliott M, Young AJ, Joseph MH, Green R (2002a). 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)*. 159:167-75.
- 435.** Mechan AO, Esteban B, O'Shea E, Elliott JM, Colado MI, Green AR (2002b). The pharmacology of the acute hyperthermic response that follows administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") to rats. *Br J Pharmacol*. 135:170-80.
- 436.** Mechan AO, Moran PM, Elliott M, Young AJ, Joseph MH, Green AR (2002c). A comparison between Dark Agouti and Sprague-Dawley rats in their behaviour on the elevated plus-maze, open-field apparatus and activity meters, and their response to diazepam. *Psychopharmacology (Berl)*. 159:188-95.
- 437.** Mechan A, Yuan J, Hatzidimitriou G, Irvine RJ, McCann UD, Ricaurte GA (2006). Pharmacokinetic profile of single and repeated oral doses of MDMA in squirrel monkeys: relationship to lasting effects on brain serotonin neurons. *Neuropsychopharmacology*. 31:339-50.
- 438.** Medina L, Figueredo-Cardenas G, Rothstein JD, Reiner A (1996). Differential abundance of glutamate transporter subtypes in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-vulnerable versus ALS-resistant brain stem motor cell groups. *Exp Neurol*. 142:287-95.
- 439.** Meek JL, Neff NH (1972). Tryptophan 5-hydroxylase: approximation of half-life and rate of axonal transport. *J Neurochem*. 19:1519-25.
- 440.** Meilman PW, Gaylor MS, Turco JH, Stone JE (1990). Drug use among college undergraduates: current use and 10-year trends. *Int J Addict*. 25:1025-36.
- 441.** Menard J, Treit D (1999). Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*. 23:591-613.
- 442.** Meneses A (1999). 5-HT system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*. 23:1111-25.
- 443.** Meng SZ, Ozawa Y, Itoh M, Takashima S (1999). Developmental and age-related changes of dopamine transporter, and dopamine D1 and D2 receptors in human basal ganglia. *Brain Res*. 843:136-44.
- 444.** Merchant J, MacDonald R (1994). Youth and the rave culture, ecstasy and health, youth and policy. *J Crit Anal*. 45:16-38.

- 445.** Meyer JM, Neale MC (1992). The relationship between age at first drug use and teenage drug use liability. *Behav Genet.* 22:197-213.
- 446.** Meyer A, Mayerhofer A, Kovar KA, Schmidt WJ (2002). Rewarding effects of the optical isomers of 3,4-methylenedioxy-methylamphetamine (“Ecstasy”) and 3,4-methylenedioxy-ethylamphetamine (“Eve”) measured by conditioned place preference in rats. *Neurosci Lett.* 330:280-4.
- 447.** Miczek KA (1979). A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology (Berl).* 60:253-9.
- 448.** Miczek KA, Haney M (1994). Psychomotor stimulant effects of d-amphetamine, MDMA and PCP: aggressive and schedule-controlled behavior in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 115:358-65.
- 449.** Miczek KA, O’Donnell JM (1978). Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. *Psychopharmacology (Berl).* 57:47-55.
- 450.** Milani R, Turner JJD, Parrott AC, Parmar R (2000). Recreational drug use and psychobiological problems, collaborative UK/Italy study (5): ecstasy (MDMA) polydrug findings. *J Psychopharmacol.* 14:A15.
- 451.** Milroy CM (1999). Ten years of “ecstasy”. *J R Soc Med.* 92:68-72.
- 452.** Miller DB, O’Callaghan JP (1994). Environment-, drug- and stress-induced alterations in body temperature affect the neurotoxicity of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 270:752-60.
- 453.** Mlinar B, Corradetti R (2003). Endogenous 5-HT, released by MDMA through serotonin transporter- and secretory vesicle-dependent mechanisms, reduces hippocampal excitatory synaptic transmission by preferential activation of 5-HT1B receptors located on CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci.* 18:1559-71.
- 454.** Modi GM, Yang PB, Swann AC, Dafny N (2006). Chronic exposure to MDMA (Ecstasy) elicits behavioral sensitization in rats but fails to induce cross-sensitization to other psychostimulants. *Behav Brain Funct.* 2:1.
- 455.** Moeller FG, Dougherty DM, Barratt ES, Schmitz JM, Swann AC, Grabowski J (2001). The impact of impulsivity on cocaine use and retention in treatment. *J Subst Abuse Treat.* 21:193-8.
- 456.** Moeller FG, Dougherty DM, Rustin T, Swann AC, Allen TJ, Shah N, Cherek DR (1997). Antisocial personality disorder and aggression in recently abstinent cocaine dependent subjects. *Drug Alcohol Depend.* 44:175-82.

Bibliografía

- 457.** Moeller FG, Steinberg JL, Dougherty DM, Narayana PA, Kramer LA, Renshaw PF (2004). Functional MRI study of working memory in MDMA users. *Psychopharmacology (Berl)*. 177:185-94.
- 458.** Molliver ME, Berger UV, Mamounas LA, Molliver DC, O'Hearn E, Wilson MA (1990). Neurotoxicity of MDMA and related compounds: anatomic studies. *Ann N Y Acad Sci*. 600:649-61.
- 459.** Montgomery C, Fisk JE, Newcombe R, Murphy PN (2005). The differential effects of ecstasy/polydrug use on executive components: shifting, inhibition, updating and access to semantic memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 182:262-76.
- 460.** Monti PM, Miranda R Jr, Nixon K, Sher KJ, Swartzwelder HS, Tapert SF, White A, Crews FT (2005). Adolescence: booze, brains, and behavior. *Alcohol Clin Exp Res*. 29:207-20.
- 461.** Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, Graybiel AM (1996). Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron*. 17:147-56.
- 462.** Morgan AE, Horan B, Dewey SL, Ashby CR Jr (1997). Repeated administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine augments cocaine's action on dopamine in the nucleus accumbens: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol*. 331:R1-3.
- 463.** Morgan MJ (1998). Recreational use of "ecstasy" (MDMA) is associated with elevated impulsivity. *Neuropsychopharmacology*. 19:252-64.
- 464.** Morgan MJ (1999). Memory deficits associated with recreational use of "ecstasy" (MDMA). *Psychopharmacology (Berl)*. 141:30-6.
- 465.** Morgan MJ (2000). Ecstasy (MDMA): a review of its possible persistent psychological effects. *Psychopharmacology (Berl)*. 152:230-48.
- 466.** Morgan MJ, McFie L, Fleetwood H, Robinson JA (2002). Ecstasy (MDMA): are the psychological problems associated with its use reversed by prolonged abstinence?. *Psychopharmacology (Berl)*. 159:294-303.
- 467.** Morgan MJ, Impallomeni LC, Pirona A, Rogers RD (2006). Elevated impulsivity and impaired decision-making in abstinent Ecstasy (MDMA) users compared to polydrug and drug-naïve controls. *Neuropsychopharmacology*. 31:1562-73.
- 468.** Morilak DA, Ciaranello RD (1993). Ontogeny of 5-hydroxytryptamine₂ receptor immunoreactivity in the developing rat brain. *Neuroscience*. 55:869-80.

- 469.** Morley KC, McGregor IS (2000). (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") increases social interaction in rats. *Eur J Pharmacol.* 408:41-9.
- 470.** Morley KC, Gallate JE, Hunt GE, Mallet PE, McGregor IS (2001). Increased anxiety and impaired memory in rats 3 months after administration of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy"). *Eur J Pharmacol.* 433:91-9.
- 471.** Morley KC, Cornish JL, Li KM, McGregor IS (2004). Preexposure to MDMA ("Ecstasy") delays acquisition but facilitates MDMA-induced reinstatement of amphetamine self-administration behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 79:331-42.
- 472.** Morley KC, Arnold JC, McGregor IS (2005). Serotonin (1A) receptor involvement in acute 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) facilitation of social interaction in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29:648-57.
- 473.** Morley-Fletcher S, Bianchi M, Gerra G, Laviola G (2002). Acute and carryover effects in mice of MDMA ("ecstasy") administration during periadolescence. *Eur J Pharmacol.* 448:31-8.
- 474.** Moyano S, Frechilla D, Del Río J (2004). NMDA receptor subunit and CaMKII changes in rat hippocampus induced by acute MDMA treatment: a mechanism for learning impairment. *Psychopharmacology (Berl).* 173:337-45.
- 475.** Moyano S, Del Río J, Frechilla D (2005). Acute and chronic effects of MDMA on molecular mechanisms implicated in memory formation in rat hippocampus: surface expression of CaMKII and NMDA receptor subunits. *Pharmacol Biochem Behav.* 82:190-9.
- 476.** Mugford RA, Nowell NW (1970). Pheromones and their effect on aggression in mice. *Nature.* 226:967-8.
- 477.** Murrin LC, Zeng W (1986). Postnatal ontogeny of dopamine D2 receptors in rat striatum. *Biochem Pharmacol.* 35:1159-62.
- 478.** Murrin LC, Zeng WY (1990). Ontogeny of dopamine D1 receptors in rat forebrain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res Dev Brain Res.* 57:7-13.
- 479.** Naciones Unidas: Oficina contra la droga y el delito (2006). Informe mundial sobre las drogas. Vol 1: Análisis.: pp 1-224.
- 480.** Naciones Unidas: Oficina contra la droga y el delito (2007). Informe mundial sobre las drogas.: pp 1-282.

Bibliografía

- 481.** Nair SG, Gudelsky GA (2006a). 3,4-Methylenedioxyamphetamine enhances the release of acetylcholine in the prefrontal cortex and dorsal hippocampus of the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 184:182-9.
- 482.** Nair SG, Gudelsky GA (2006b). Effect of a serotonin depleting regimen of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) on the subsequent stimulation of acetylcholine release in the rat prefrontal cortex. *Brain Res Bull*. 69:382-7.
- 483.** Nash JF Jr, Meltzer HY, Gudelsky GA (1988). Elevation of serum prolactin and corticosterone concentrations in the rat after the administration of 3,4-methylenedioxyamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 245:873-9.
- 484.** Navarro JF, Maldonado E (1999). Behavioral profile of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) in agonistic encounters between male mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 203:327-34.
- 485.** Navarro JF, Maldonado E (2002). Acute and subchronic effects of MDMA ("ecstasy") on anxiety in male mice tested in the elevated plus-maze. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 26:1151-4.
- 486.** Navarro JF, Rivera A, Maldonado E, Cavas M, de la Calle A (2004). Anxiogenic-like activity of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ("Ecstasy") in the social interaction test is accompanied by an increase of c-fos expression in mice amygdala. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 28:249-54.
- 487.** Nelson RM, Green AR, Lambert DG, Hainsworth AH (2000). On the regulation of ischaemia-induced glutamate efflux from rat cortex by GABA; in vitro studies with GABA, clomethiazole and pentobarbitone. *Br J Pharmacol*. 130:1124-30.
- 488.** Nestler EJ (2004a). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci*. 25:210-8.
- 489.** Nestler EJ (2004b). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*. 47:24-32.
- 490.** Nestler EJ, Barrot M, Self DW (2001). DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:11042-6.
- 491.** Newcomb MD (1995). Identifying high-risk youth: prevalence and patterns of adolescent drug abuse. *NIDA Res Monogr*. 156:7-38.
- 492.** Niculescu M, Ehrlich ME, Unterwald EM (2005). Age-specific behavioral responses to psychostimulants in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 82:280-8.

- 493.** Nichols DE (1986). Differences between the mechanism of action of MDMA, MBDB, and the classic hallucinogens. Identification of a new therapeutic class: entactogens. *J Psychoactive Drugs*. 18:305-13.
- 494.** Njung'e K, Handley SL (1991a). Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav*. 38:63-7.
- 495.** Njung'e K, Handley SL (1991b). Effects of 5-HT uptake inhibitors, agonists and antagonists on the burying of harmless objects by mice; a putative test for anxiolytic agents. *Br J Pharmacol*. 104:105-12.
- 496.** O'Brien CP (1997). A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science*. 278:66-70.
- 497.** O'Brien CP, McLellan AT (1996). Myths about the treatment of addiction. *Lancet*. 347:237-40.
- 498.** O'Callaghan JP, Miller DB (1993). Quantification of reactive gliosis as an approach to neurotoxicity assessment. *NIDA Res Monogr*. 136:188-212.
- 499.** O'Callaghan JP, Miller DB (1994). Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 270:741-51.
- 500.** O'Callaghan JP, Sriram K (2005). Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf*. 4:433-42.
- 501.** O'Callaghan JP, Jensen KF, Miller DB (1995). Quantitative aspects of drug and toxicant-induced astrogliosis. *Neurochem Int*. 26:115-24.
- 502.** O'Hearn E, Battaglia G, De Souza EB, Kuhar MJ, Molliver ME (1988). Methylenedioxymphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA) cause selective ablation of serotonergic axon terminals in forebrain: immunocytochemical evidence for neurotoxicity. *J Neurosci*. 8:2788-803.
- 503.** O'Shea E, Granados R, Esteban B, Colado MI, Green AR (1998). 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*. 37:919-26.
- 504.** O'Shea E, Esteban B, Camarero J, Green AR, Colado MI (2001). Effect of GBR 12909 and fluoxetine on the acute and long term changes induced by MDMA ("ecstasy") on the 5-HT and dopamine concentrations in mouse brain. *Neuropharmacology*. 40:65-74.

Bibliografía

- 505.** O'Shea E, Escobedo I, Orio L, Sanchez V, Navarro M, Green AR, Colado MI (2005). Elevation of ambient room temperature has differential effects on MDMA-induced 5-HT and dopamine release in striatum and nucleus accumbens of rats. *Neuropsychopharmacology*. 30:1312-23.
- 506.** O'Shea E, Orio L, Escobedo I, Sanchez V, Camarero J, Green AR, Colado MI (2006). MDMA-induced neurotoxicity: long-term effects on 5-HT biosynthesis and the influence of ambient temperature. *Br J Pharmacol*. 148:778-85.
- 507.** Obrocki J, Buchert R, Väterlein O, Thomasius R, Beyer W, Schiemann T (1999). Ecstasy--long-term effects on the human central nervous system revealed by positron emission tomography. *Br J Psychiatry*. 175:186-8.
- 508.** Observatorio Español sobre Drogas. Informe (2007). Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaria de Sanidad y Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.: pp 1-199.
- 509.** Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Informe Anual (2006): El problema de la drogodependencia en Europa.: pp 1-104.
- 510.** Olivier B, Mos J (1992). Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 16:847-70.
- 511.** Outslay MG (2006). Understanding ecstasy. *JAAPA*. 19:42-7.
- 512.** Pacifici R, Zuccaro P, Hernandez López C, Pichini S, Di Carlo S, Farré M, Roset PN, Ortuño J, Segura J, Torre RL (2001). Acute effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine alone and in combination with ethanol on the immune system in humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 296:207-15.
- 513.** Paine TA, Jackman SL, Olmstead MC (2002). Cocaine-induced anxiety: alleviation by diazepam, but not buspirone, dimenhydrinate or diphenhydramine. *Behav Pharmacol*. 13:511-23.
- 514.** Palenicek T, Votava M, Bubenikova V, Horacek J (2005). Increased sensitivity to the acute effects of MDMA ("ecstasy") in female rats. *Physiol Behav*. 86:546-53.
- 515.** Parrott AC (2000). Human research on MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) neurotoxicity: cognitive and behavioural indices of change. *Neuropsychobiology*. 42:17-24.
- 516.** Parrott AC (2001). Human psychopharmacology of Ecstasy (MDMA): a review of 15 years of empirical research. *Hum Psychopharmacol*. 16:557-77.

- 517.** Parrott AC (2002). Recreational Ecstasy/MDMA, the serotonin syndrome, and serotonergic neurotoxicity. *Pharmacol Biochem Behav.* 71:837-44.
- 518.** Parrott AC (2003). Cognitive deficits and cognitive normality in recreational cannabis and Ecstasy/MDMA users. *Hum Psychopharmacol.* 18:89-90.
- 519.** Parrott AC (2004a). Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. *Psychopharmacology (Berl).* 173:234-41.
- 520.** Parrott AC (2004b). MDMA (3,4-Methylenedioxymethamphetamine) or ecstasy: the neuropsychobiological implications of taking it at dances and raves. *Neuropsychobiology.* 50:329-35.
- 521.** Parrott AC (2005). Chronic tolerance to recreational MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) or Ecstasy. *J Psychopharmacol.* 19:71-83.
- 522.** Parrott AC (2006). MDMA in humans: factors which affect the neuropsychobiological profiles of recreational ecstasy users, the integrative role of bioenergetic stress. *J Psychopharmacol.* 20:147-63.
- 523.** Parrott AC, Lasky J (1998). Ecstasy (MDMA) effects upon mood and cognition: before, during and after a Saturday night dance. *Psychopharmacology (Berl).* 139:261-8.
- 524.** Parrott AC, Young L. 2005. Increased body temperature in recreational Ecstasy/MDMA users out clubbing and dancing. *J Psychopharmacol* 19: a26.
- 525.** Parrott AC, Lees A, Garnham NJ, Jones M, Wesnes K (1998). Cognitive performance in recreational users of MDMA of “ecstasy”: evidence for memory deficits. *J Psychopharmacol.* 12:79-83.
- 526.** Parrott AC, Sisk E, Turner JJ (2000). Psychobiological problems in heavy “ecstasy” (MDMA) polydrug users. *Drug Alcohol Depend.* 60:105-10.
- 527.** Parrott AC, Milani RM, Parmar R, Turner JD (2001). Recreational ecstasy/MDMA and other drug users from the UK and Italy: psychiatric symptoms and psychobiological problems. *Psychopharmacology (Berl).* 159:77-82.
- 528.** Parrott AC, Buchanan T, Scholey AB, Heffernan T, Ling J, Rodgers J (2002). Ecstasy/MDMA attributed problems reported by novice, moderate and heavy recreational users. *Hum Psychopharmacol.* 17:309-12.

Bibliografía

- 529.** Parrott AC, Rodgers J, Buchanan T, Ling J, Heffernan T, Scholey AB (2006). Dancing hot on Ecstasy: physical activity and thermal comfort ratings are associated with the memory and other psychobiological problems reported by recreational MDMA users. *Hum Psychopharmacol.* 21:285-98.
- 530.** Parrott AC, Milani RM, Gouzoulis-Mayfrank E, Daumann J (2007). Cannabis and Ecstasy/MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine): an analysis of their neuropsychobiological interactions in recreational users. *J Neural Transm.* 114:959-68.
- 531.** Parsons LH, Justice JB Jr (1993). Perfusate serotonin increases extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 606:195-9.
- 532.** Partilla JS, Dempsey AG, Nagpal AS, Blough BE, Baumann MH, Rothman RB (2006). Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther.* 319:237-46.
- 533.** Paulus MP, Geyer MA (1991). A temporal and spatial scaling hypothesis for the behavioral effects of psychostimulants. *Psychopharmacology (Berl).* 104:6-16.
- 534.** Pavón N, Martín AB, Mendiola A, Moratalla R (2006). ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biol Psychiatry.* 59:64-74.
- 535.** Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods.* 14(3):149-67.
- 536.** Peroutka SJ (1989). "Ecstasy": a human neurotoxin?. *Arch Gen Psychiatry.* 46:191.
- 537.** Peroutka SJ (1990). Recreational use of MDMA. En Peroutka SJ (Ed.). *Ecstasy: the clinical, pharmacological and neurotoxicological effects of the drug MDMA.* Kluwer Academic Publishing. Boston.: pp 53-62.
- 538.** Peroutka SJ, Newman H, Harris H (1988). Subjective effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in recreational users. *Neuropsychopharmacology.* 1:273-7.
- 539.** Perry KW, Fuller RW (1993). Extracellular 5-hydroxytryptamine concentration in rat hypothalamus after administration of fluoxetine plus L-5-hydroxytryptophan. *J Pharm Pharmacol.* 45:759-61.
- 540.** Petry NM (2001). Substance abuse, pathological gambling, and impulsiveness. *Drug Alcohol Depend.* 63:29-38.

- 541.** Petry NM, Casarella T (1999). Excessive discounting of delayed rewards in substance abusers with gambling problems. *Drug Alcohol Depend.* 56:25-32.
- 542.** Piazza PV, Le Moal M (1998). The role of stress in drug self-administration. *Trends Pharmacol Sci.* 19:67-74.
- 543.** Pierce RC, Crawford CA, Nonneman AJ, Mattingly BA, Bardo MT (1990). Effect of forebrain dopamine depletion on novelty-induced place preference behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 36:321-5.
- 544.** Piper BJ, Meyer JS (2004). Memory deficit and reduced anxiety in young adult rats given repeated intermittent MDMA treatment during the periadolescent period. *Pharmacol Biochem Behav.* 79:723-31.
- 545.** Piper BJ, Fraiman JB, Meyer JS (2005). Repeated MDMA ("Ecstasy") exposure in adolescent male rats alters temperature regulation, spontaneous motor activity, attention, and serotonin transporter binding. *Dev Psychobiol.* 47:145-57.
- 546.** Piper BJ, Vu HL, Safain MG, Oliver AJ, Meyer JS (2006). Repeated adolescent 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) exposure in rats attenuates the effects of a subsequent challenge with MDMA or a 5-hydroxytryptamine(1A) receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther.* 317:838-49.
- 547.** Pizarro N, Farré M, Pujadas M, Peiró AM, Roset PN, Joglar J, de la Torre R (2004). Stereochemical analysis of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and its main metabolites in human samples including the catechol-type metabolite (3,4-dihydroxymethamphetamine). *Drug Metab Dispos.* 32:1001-7.
- 548.** Plant MA, Plant M (1992). *Risk-takers: Alcohol, drugs, sex and youth.* Tavistock Routledge. London.: pp 1-176.
- 549.** Portas CM, Bjorvatn B, Ursin R (2000). Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol.* 60:13-35.
- 550.** Prisco S, Pagannone S, Esposito E (1994). Serotonin-dopamine interaction in the rat ventral tegmental area: an electrophysiological study in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 271:83-90.
- 551.** Pubill D, Canudas AM, Pallàs M, Camins A, Camarasa J, Escubedo E (2003). Different glial response to methamphetamine- and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 367:490-9.
- 552.** Pulvirenti L (2003). Glutamate neurotransmission in the course of cocaine addiction. En Herman BH (Ed.). *Glutamate and Addiction.* Human Press. New Jersey.: pp 171-81.

Bibliografía

- 553.** Quate L, McBean DE, Ritchie IM, Olverman HJ, Kelly PA (2004). Acute methylenedioxymethamphetamine administration: effects on local cerebral blood flow and glucose utilisation in the Dark Agouti rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 173:287-95.
- 554.** Quednow BB, Jessen F, Kuhn KU, Maier W, Daum I, Wagner M (2006). Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction. *J Psychopharmacol*. 20:373-84.
- 555.** Quednow BB, Kühn KU, Hoppe C, Westheide J, Maier W, Daum I, Wagner M (2007). Elevated impulsivity and impaired decision-making cognition in heavy users of MDMA ("Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)*. 189:517-30.
- 556.** Quinn DI, Wodak A, Day RO (1997). Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of illicit drug use and treatment of illicit drug users. *Clin Pharmacokinet*. 33:344-400.
- 557.** Rakic P, Bourgeois JP, Goldman-Rakic PS (1994). Synaptic development of the cerebral cortex: implications for learning, memory, and mental illness. *Prog Brain Res*. 102:227-43.
- 558.** Ramos M, Goñi-Allo B, Aguirre N (2004). Studies on the role of dopamine D1 receptors in the development and expression of MDMA-induced behavioral sensitization in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 177:100-10.
- 559.** Ramos M, Goñi-Allo B, Aguirre N (2005a). Administration of SCH 23390 into the medial prefrontal cortex blocks the expression of MDMA-induced behavioral sensitization in rats: an effect mediated by 5-HT_{2C} receptor stimulation and not by D1 receptor blockade. *Neuropsychopharmacology*. 30:2180-91.
- 560.** Ramos M, Goñi-Allo B, Aguirre N (2005b). Ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex block the development and expression of 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced behavioral sensitization in rats. *Behav Brain Res*. 160:304-11.
- 561.** Ratzenboeck E, Saria A, Kriechbaum N, Zernig G (2001). Reinforcing effects of MDMA ("ecstasy") in drug-naive and cocaine-trained rats. *Pharmacology*. 62:138-44.
- 562.** Reay JL, Hamilton C, Kennedy DO, Scholey AB (2006). MDMA polydrug users show process-specific central executive impairments coupled with impaired social and emotional judgement processes. *J Psychopharmacol*. 20:385-8.
- 563.** Rebec GV, Christensen JR, Guerra C, Bardo MT (1997). Regional and temporal differences in real-time dopamine efflux in the nucleus accumbens during free-choice novelty. *Brain Res*. 776:61-7.

- 564.** Reid LD, Hubbell CL, Tsai J, Fishkin MD, Amendola CA (1996). Naltrindole, a delta-opioid antagonist, blocks MDMA's ability to enhance pressing for rewarding brain stimulation. *Pharmacol Biochem Behav.* 53:477-80.
- 565.** Reid LW, Elifson KW, Sterk CE (2007). Ecstasy and gateway drugs: initiating the use of ecstasy and other drugs. *Ann Epidemiol.* 17:74-80.
- 566.** Reinhard C, Wolffgramm J (2006). Long-term voluntary consumption of MDMA and THC in rats is modified by individual and situational factors. *Addict Biol.* 11:131-44.
- 567.** Rendell PG, Gray TJ, Henry JD, Tolan A (2007). Prospective memory impairment in "ecstasy" (MDMA) users. *Psychopharmacology (Berl).* 194:497-504.
- 568.** Reneman L, Booij J, Majoie CB, Van Den Brink W, Den Heeten GJ (2001a). Investigating the potential neurotoxicity of Ecstasy (MDMA): an imaging approach. *Hum Psychopharmacol.* 16:579-588.
- 569.** Reneman L, Booij J, de Bruin K, Reitsma JB, de Wolff FA, Gunning WB, den Heeten GJ, van den Brink W (2001b). Effects of dose, sex, and long-term abstinence from use on toxic effects of MDMA (ecstasy) on brain serotonin neurons. *Lancet.* 358:1864-9.
- 570.** Reneman L, Lavalaye J, Schmand B, de Wolff FA, van den Brink W, den Heeten GJ, Booij J (2001c). Cortical serotonin transporter density and verbal memory in individuals who stopped using 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "ecstasy"): preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry.* 58:901-6.
- 571.** Reneman L, Majoie CB, Habraken JB, den Heeten GJ (2001d). Effects of ecstasy (MDMA) on the brain in abstinent users: initial observations with diffusion and perfusion MR imaging. *Radiology.* 220:611-7.
- 572.** Reneman L, Majoie CB, Schmand B, van den Brink W, den Heeten GJ (2001e). Prefrontal N-acetylaspartate is strongly associated with memory performance in (abstinent) ecstasy users: preliminary report. *Biol Psychiatry.* 50:550-4.
- 573.** Reneman L, Endert E, de Bruin K, Lavalaye J, Feenstra MG, de Wolff FA, Booij J (2002). The acute and chronic effects of MDMA ("ecstasy") on cortical 5-HT_{2A} receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology.* 26:387-96.
- 574.** Renner MJ, Seltzer CP (1991). Molar characteristics of exploratory and investigatory behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol.* 105:326-39.
- 575.** Reveron ME, Monks TJ, Duvauchelle CL (2005). Age-dependent (+)MDMA-mediated neurotoxicity in mice. *Neurotoxicology.* 26(6):1031-40.

Bibliografía

- 576.** Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2003). Reinstatement of morphine-induced conditioned place preference in mice by priming injections. *Neural Plast.* 10:279-90.
- 577.** Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2005a). Long-lasting rewarding effects of morphine induced by drug primings. *Brain Res.* 1050:53-63.
- 578.** Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2005b). Cross-reinstatement by cocaine and amphetamine of morphine-induced place preference in mice. *Behav Pharmacol.* 16:253-9.
- 579.** Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Miñarro J (2005c). NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Res Bull.* 64:493-503.
- 580.** Ribeiro Do Couto B, Aguilar MA, Manzanedo C, Rodríguez-Arias M, Armario A, Miñarro J (2006). Social stress is as effective as physical stress in reinstating morphine-induced place preference in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 185:459-70.
- 581.** Ricaurte GA (1989). Studies of MDMA-induced neurotoxicity in nonhuman primates: a basis for evaluating long-term effects in humans. *NIDA Res Monogr.* 94:306-22.
- 582.** Ricaurte GA, McCann UD (1992). Neurotoxic amphetamine analogues: effects in monkeys and implications for humans. *Ann N Y Acad Sci.* 648:371-82.
- 583.** Ricaurte G, Bryan G, Strauss L, Seiden L, Schuster C (1985). Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science.* 229:986-8.
- 584.** Ricaurte GA, DeLanney LE, Wiener SG, Irwin I, Langston JW (1988a). 5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid reflects serotonergic damage induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in CNS of non-human primates. *Brain Res.* 474:359-63.
- 585.** Ricaurte GA, Forno LS, Wilson MA, DeLanney LE, Irwin I, Molliver ME, Langston JW (1988b). (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *JAMA.* 260:51-5.
- 586.** Ricaurte GA, Markowska AL, Wenk GL, Hatzidimitriou G, Wlos J, Olton DS (1993). 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, serotonin and memory. *J Pharmacol Exp Ther.* 266:1097-105.
- 587.** Ricaurte GA, Yuan J, McCann UD (2000). (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy")-induced serotonin neurotoxicity: studies in animals. *Neuropsychobiology.* 42:5-10.

- 588.** Risbrough VB, Masten VL, Caldwell S, Paulus MP, Low MJ, Geyer MA (2006). Differential contributions of dopamine D1, D2, and D3 receptors to MDMA-induced effects on locomotor behavior patterns in mice. *Neuropsychopharmacology*. 31:2349-58.
- 589.** Robins LN, Przybeck TR (1985). Age of onset of drug use as a factor in drug and other disorders. *NIDA Res Monogr*. 56:178-92.
- 590.** Robledo P, Balerio G, Berrendero F, Maldonado R (2004a). Study of the behavioural responses related to the potential addictive properties of MDMA in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 369:338-49.
- 591.** Robledo P, Mendizabal V, Ortuño J, de la Torre R, Kieffer BL, Maldonado R (2004b). The rewarding properties of MDMA are preserved in mice lacking mu-opioid receptors. *Eur J Neurosci*. 20:853-8.
- 592.** Robledo P, Trigo JM, Panayi F, de la Torre R, Maldonado R (2007). Behavioural and neurochemical effects of combined MDMA and THC administration in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 195:255-64.
- 593.** Rodgers RJ (1997). Animal models of "anxiety": where next?. *Behav Pharmacol*. 8:477-96.
- 594.** Rodgers RJ (2000). Cognitive performance amongst recreational users of "ecstasy". *Psychopharmacology (Berl)*. 151:19-24.
- 595.** Rodgers J, Buchanan T, Scholey AB, Heffernan TM, Ling J, Parrott A (2001). Differential effects of Ecstasy and cannabis on self-reports of memory ability: a web-based study. *Hum Psychopharmacol*. 16:619-625.
- 596.** Rodríguez-Arias M, Miñarro J, Aguilar MA, Pinazo J, Simón VM (1998). Effects of risperidone and SCH 23390 on isolation-induced aggression in male mice. *Eur Neuropsychopharmacol*. 8:95-103.
- 597.** Rogerio R, Takahashi RN (1992a). Anxiogenic properties of cocaine in the rat evaluated with the elevated plus-maze. *Pharmacol Biochem Behav*. 43:631-3.
- 598.** Rogerio R, Takahashi RN (1992b). Anxiogenic action of acute but not repeated cocaine administration in handling-habituated mice in the plus-maze test. *Braz J Med Biol Res*. 25:713-6.
- 599.** Roiser JP, Sahakian BJ (2004). Relationship between ecstasy use and depression: a study controlling for poly-drug use. *Psychopharmacology (Berl)*. 173:411-7.

Bibliografía

- 600.** Roiser JP, Cook LJ, Cooper JD, Rubinsztein DC, Sahakian BJ (2005). Association of a functional polymorphism in the serotonin transporter gene with abnormal emotional processing in ecstasy users. *Am J Psychiatry*. 162:609-12.
- 601.** Roiser JP, Rogers RD, Cook LJ, Sahakian BJ (2006). The effect of polymorphism at the serotonin transporter gene on decision-making, memory and executive function in ecstasy users and controls. *Psychopharmacology (Berl)*. 188:213-27.
- 602.** Roiser JP, Rogers RD, Sahakian BJ (2007). Neuropsychological function in ecstasy users: a study controlling for polydrug use. *Psychopharmacology (Berl)*. 189:505-16.
- 603.** Rosenberg DR, Lewis DA (1994). Changes in the dopaminergic innervation of monkey prefrontal cortex during late postnatal development: a tyrosine hydroxylase immunohistochemical study. *Biol Psychiatry*. 36:272-7.
- 604.** Rudnick G, Wall SC (1992). The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:1817-21.
- 605.** Saadat KS, Elliott JM, Colado MI, Green AR (2004). Hyperthermic and neurotoxic effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in guinea pigs. *Psychopharmacology (Berl)*. 173:452-3.
- 606.** Saadat KS, Elliott JM, Colado MI, Green AR (2006a). The acute and long-term neurotoxic effects of MDMA on marble burying behaviour in mice. *J Psychopharmacol*. 20:264-71.
- 607.** Saadat KS, Elliott JM, Green AR, Moran PM (2006b). High-dose MDMA does not result in long-term changes in impulsivity in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 188:75-83.
- 608.** Sáiz PA, García-Portilla P, Paredes B, Bobes J (2003). Evolución histórica del uso y abuso de MDMA. En Bobes J, Sáiz PA (Eds). *Monografía drogas recreativas. Adicciones* 15: 35-49.
- 609.** Salzmann J, Marie-Claire C, Le Guen S, Roques BP, Noble F (2003). Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br J Pharmacol*. 140:831-8.
- 610.** Sanchez V, Camarero J, Esteban B, Peter MJ, Green AR, Colado MI (2001). The mechanisms involved in the long-lasting neuroprotective effect of fluoxetine against MDMA ("ecstasy")-induced degeneration of 5-HT nerve endings in rat brain. *Br J Pharmacol*. 134:46-57.

- 611.** Sanchez V, Camarero J, O'Shea E, Green AR, Colado MI (2003). Differential effect of dietary selenium on the long-term neurotoxicity induced by MDMA in mice and rats. *Neuropharmacology*. 44:449-61.
- 612.** Sanchez V, O'Shea E, Saadat KS, Elliott JM, Colado MI, Green AR (2004). Effect of repeated ("binge") dosing of MDMA to rats housed at normal and high temperature on neurotoxic damage to cerebral 5-HT and dopamine neurones. *J Psychopharmacol*. 18:412-6.
- 613.** Santucci AC, Knott PJ, Haroutunian V (1996). Excessive serotonin release, not depletion, leads to memory impairments in rats. *Eur J Pharmacol*. 295:7-17.
- 614.** Saunders N (1995). Ecstasy and the dance culture. Saunders Nicholas. London: pp 1-320.
- 615.** Scanzello CR, Hatzidimitriou G, Martello AL, Katz JL, Ricaurte GA (1993). Serotonergic recovery after (+/-)3,4-(methylenedioxy) methamphetamine injury: observations in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 264:1484-91.
- 616.** Scarce-Levie K, Viswanathan SS, Hen R (1999). Locomotor response to MDMA is attenuated in knockout mice lacking the 5-HT_{1B} receptor. *Psychopharmacology (Berl)*. 141:154-61.
- 617.** Schechter MD (1991). Effect of MDMA neurotoxicity upon its conditioned place preference and discrimination. *Pharmacol Biochem Behav*. 38:539-44.
- 618.** Schechter MD (1997). Drug-drug discrimination: stimulus properties of drugs of abuse upon a serotonergic-dopaminergic continuum. *Pharmacol Biochem Behav*. 56:89-96.
- 619.** Scheffel U, Szabo Z, Mathews WB, Finley PA, Dannals RF, Ravert HT, Szabo K, Yuan J, Ricaurte GA (1998). In vivo detection of short- and long-term MDMA neurotoxicity--a positron emission tomography study in the living baboon brain. *Synapse*. 29:183-92.
- 620.** Schenk S, Izenwasser S (2002). Pretreatment with methylphenidate sensitizes rats to the reinforcing effects of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav*. 72:651-7.
- 621.** Schenk S, Gittings D, Johnstone M, Daniela E (2003). Development, maintenance and temporal pattern of self-administration maintained by ecstasy (MDMA) in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 169:21-7.
- 622.** Schenk S, Hely L, Gittings D, Lake B, Daniela E (2008). Effects of priming injections of MDMA and cocaine on reinstatement of MDMA- and cocaine-seeking in rats. *Drug Alcohol Depend*. 96:249-55.

Bibliografia

- 623.** Schifano F, Di Furia L, Forza G, Minicuci N, Bricolo R (1998). MDMA (“ecstasy”) consumption in the context of polydrug abuse: a report on 150 patients. *Drug Alcohol Depend.* 52:85-90.
- 624.** Schifano F, Corkery J, Deluca P, Oyefeso A, Ghodse AH (2006). Ecstasy (MDMA, MDA, MDEA, MBDB) consumption, seizures, related offences, prices, dosage levels and deaths in the UK (1994-2003). *J Psychopharmacol.* 20:456-63.
- 625.** Schmidt CJ (1987). Neurotoxicity of the psychedelic amphetamine, methylenedioxymethamphetamine. *J Pharmacol Exp Ther.* 240:1-7.
- 626.** Schmidt CJ, Taylor VL (1987). Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine. *Biochem Pharmacol.* 36:4095-102.
- 627.** Schmidt CJ, Levin JA, Lovenberg W (1987). In vitro and in vivo neurochemical effects of methylenedioxymethamphetamine on striatal monoaminergic systems in the rat brain. *Biochem Pharmacol.* 36:747-55.
- 628.** Schmidt CJ, Abbate GM, Black CK, Taylor VL (1990). Selective 5-hydroxytryptamine₂ receptor antagonists protect against the neurotoxicity of methylenedioxymethamphetamine in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 255:478-83.
- 629.** Schmidt CJ, Sullivan CK, Fadayel GM (1994). Blockade of striatal 5-hydroxytryptamine₂ receptors reduces the increase in extracellular concentrations of dopamine produced by the amphetamine analogue 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *J Neurochem.* 62:1382-9.
- 630.** Schmued LC (2003). Demonstration and localization of neuronal degeneration in the rat forebrain following a single exposure to MDMA. *Brain Res.* 974:127-33.
- 631.** Schmued LC, Hopkins KJ (2000). Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration. *Toxicol Pathol.* 28:91-9.
- 632.** Scholey AB, Parrott AC, Buchanan T, Heffernan TM, Ling J, Rodgers J (2004). Increased intensity of Ecstasy and polydrug usage in the more experienced recreational Ecstasy/MDMA users: a WWW study. *Addict Behav.* 29:743-52.
- 633.** Schramm-Sapyta NL, Pratt AR, Winder DG (2004). Effects of periadolescent versus adult cocaine exposure on cocaine conditioned place preference and motor sensitization in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 173:41-8.
- 634.** Schramm-Sapyta NL, Morris RW, Kuhn CM (2006). Adolescent rats are protected from the conditioned aversive properties of cocaine and lithium chloride. *Pharmacol Biochem Behav.* 84:344-52.

- 635.** Segal DS, Kuczenski R (1997). An escalating dose "binge" model of amphetamine psychosis: behavioral and neurochemical characteristics. *J Neurosci.* 17:2551-66.
- 636.** Segura M, Ortuño J, Farré M, McLure JA, Pujadas M, Pizarro N, Llebaria A, Joglar J, Roset PN, Segura J, de La Torre R (2001). 3,4-Dihydroxymethamphetamine (HHMA). A major in vivo 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) metabolite in humans. *Chem Res Toxicol.* 14:1203-8.
- 637.** Semple DM, Ebmeier KP, Glabus MF, O'Carroll RE, Johnstone EC (1999). Reduced in vivo binding to the serotonin transporter in the cerebral cortex of MDMA ("ecstasy") users. *Br J Psychiatry.* 175:63-9.
- 638.** Semple SJ, Zians J, Grant I, Patterson TL (2005). Impulsivity and methamphetamine use. *J Subst Abuse Treat.* 29:85-93.
- 639.** Shaham Y, Shalev U, Lu L, De Wit H, Stewart J (2003). The reinstatement model of drug relapse: history, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl).* 168:3-20.
- 640.** Shalev U, Grimm JW, Shaham Y (2002). Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: a review. *Pharmacol Rev.* 54:1-42.
- 641.** Shankaran M, Gudelsky GA (1998). Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on hippocampal dopamine and serotonin. *Pharmacol Biochem Behav.* 61:361-6.
- 642.** Shankaran M, Gudelsky GA (1999). A neurotoxic regimen of MDMA suppresses behavioral, thermal and neurochemical responses to subsequent MDMA administration. *Psychopharmacology (Berl).* 147:66-72.
- 643.** Shankaran M, Yamamoto BK, Gudelsky GA (1999a). Involvement of the serotonin transporter in the formation of hydroxyl radicals induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Eur J Pharmacol.* 385:103-10.
- 644.** Shankaran M, Yamamoto BK, Gudelsky GA (1999b). Mazindol attenuates the 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced formation of hydroxyl radicals and long-term depletion of serotonin in the striatum. *J Neurochem.* 72:2516-22.
- 645.** Shankaran M, Yamamoto BK, Gudelsky GA (2001). 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.* 40:55-64.
- 646.** Shippenberg TS, LeFevour A, Thompson AC (1998). Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine and cocaine: differential effects of the kappa-opioid receptor agonist U69593. *Eur J Pharmacol.* 345:27-34.

Bibliografia

- 647.** Shulgin AT (1986). The background and chemistry of MDMA. *J Psychoactive Drugs*. 18:291-304.
- 648.** Shulgin AT, Nichols DE (1978). Characterization of three new psychomimetics. En Stillman RC; Willette RE (Eds.). *The psychopharmacology of hallucinogens*. Pergamon Press. New York.: 74-83.
- 649.** Slikker W Jr, Ali SF, Scallet AC, Frith CH, Newport GD, Bailey JR (1988). Neurochemical and neurohistological alterations in the rat and monkey produced by orally administered methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Toxicol Appl Pharmacol*. 94:448-57.
- 650.** Slikker W Jr, Holson RR, Ali SF, Kolta MG, Paule MG, Scallet AC, McMillan DE, Bailey JR, Hong JS, Scalzo FM (1989). Behavioral and neurochemical effects of orally administered MDMA in the rodent and nonhuman primate. *Neurotoxicology*. 10:529-42.
- 651.** Smith RF (2003). Animal models of periadolescent substance abuse. *Neurotoxicol Teratol*. 25:291-301.
- 652.** Smith AJ, McGinty JF (1994). Acute amphetamine or methamphetamine alters opioid peptide mRNA expression in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res*. 21:359-62.
- 653.** Smoothy R, Brain PF, Berry MS, Haug M (1986). Alcohol and social behaviour in group-housed female mice. *Physiol Behav*. 37:689-94.
- 654.** Soar K, Turner JJ, Parrott AC (2006). Problematic versus non-problematic ecstasy/MDMA use: the influence of drug usage patterns and pre-existing psychiatric factors. *J Psychopharmacol*. 20:417-24.
- 655.** Solowij N, Hall W, Lee N (1992). Recreational MDMA use in Sydney: a profile of "Ecstasy" users and their experiences with the drug. *Br J Addict*. 87:1161-72.
- 656.** Sowell ER, Thompson PM, Holmes CJ, Bath R, Jernigan TL, Toga AW (1999). Localizing age-related changes in brain structure between childhood and adolescence using statistical parametric mapping. *Neuroimage*. 9:587-97.
- 657.** Sowell ER, Delis D, Stiles J, Jernigan TL (2001). Improved memory functioning and frontal lobe maturation between childhood and adolescence: a structural MRI study. *J Int Neuropsychol Soc*. 7:312-22.
- 658.** Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1990a). The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem*. 55:1734-40.

- 659.** Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1990b). Identification of the opioid receptor types mediating beta-endorphin-induced alterations in dopamine release in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol.* 190:177-84.
- 660.** Spanos LJ, Yamamoto BK (1989). Acute and subchronic effects of methylenedioxyamphetamine [(+/-)MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 32:835-40.
- 661.** Spear L (2000a). Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health.* 24:115-23.
- 662.** Spear LP (2000b). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev.* 24:417-63.
- 663.** Spear LP (2002). The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *J Stud Alcohol Suppl.* 14:71-81.
- 664.** Spear LP, Brake SC (1983). Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol.* 16:83-109.
- 665.** Spear LP, Enters EK, Linville DG (1985). Age-specific behaviors as tools for examining teratogen-induced neural alterations. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 7:691-5.
- 666.** Sprague JE, Nichols DE (1995). The monoamine oxidase-B inhibitor L-deprenyl protects against 3,4-methylenedioxyamphetamine-induced lipid peroxidation and long-term serotonergic deficits. *J Pharmacol Exp Ther.* 273:667-73.
- 667.** Sprague JE, Nichols DE (2005). Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): beyond metabolism. *Trends Pharmacol Sci.* 26:59-60.
- 668.** Sprague JE, Everman SL, Nichols DE (1998). An integrated hypothesis for the serotonergic axonal loss induced by 3,4-methylenedioxyamphetamine. *Neurotoxicology.* 19:427-41.
- 669.** Sprague JE, Preston AS, Leifheit M, Woodside B (2003). Hippocampal serotonergic damage induced by MDMA (ecstasy): effects on spatial learning. *Physiol Behav.* 79:281-7.
- 670.** St Omer VE, Ali SF, Holson RR, Duhart HM, Scalzo FM, Slikker W Jr (1991). Behavioral and neurochemical effects of prenatal methylenedioxyamphetamine (MDMA) exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 13:13-20.
- 671.** Staley JK, Malison RT, Innis RB (1998). Imaging of the serotonergic system: interactions of neuroanatomical and functional abnormalities of depression. *Biol Psychiatry.* 44:534-49.

Bibliografia

- 672.** Stansfield KH, Kirstein CL (2005). Neurochemical effects of cocaine in adolescence compared to adulthood. *Brain Res Dev Brain Res.* 159:119-25.
- 673.** Stanwood GD, McElligot S, Lu L, McGonigle P (1997). Ontogeny of dopamine D3 receptors in the nucleus accumbens of the rat. *Neurosci Lett.* 223:13-6.
- 674.** Steele TD, McCann UD, Ricaurte GA (1994). 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA, "Ecstasy"): pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction.* 89:539-51.
- 675.** Steiner H, Gerfen CR (1993). Cocaine-induced c-fos messenger RNA is inversely related to dynorphin expression in striatum. *J Neurosci.* 13:5066-81.
- 676.** Stone DM, Stahl DC, Hanson GR, Gibb JW (1986). The effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) on monoaminergic systems in the rat brain. *Eur J Pharmacol.* 128:41-8.
- 677.** Stone DM, Hanson GR, Gibb JW (1987a). Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxyamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology.* 26:1657-61.
- 678.** Stone DM, Johnson M, Hanson GR, Gibb JW (1987b). A comparison of the neurotoxic potential of methylenedioxyamphetamine (MDA) and its N-methylated and N-ethylated derivatives. *Eur J Pharmacol.* 134(2):245-8.
- 679.** Stone DM, Johnson M, Hanson GR, Gibb JW (1989). Acute inactivation of tryptophan hydroxylase by amphetamine analogs involves the oxidation of sulfhydryl sites. *Eur J Pharmacol.* 172:93-7.
- 680.** Straiko MM, Gudelsky GA, Coolen LM (2007). Treatment with a serotonin-depleting regimen of MDMA prevents conditioned place preference to sex in male rats. *Behav Neurosci.* 121:586-93.
- 681.** Stuerenburg HJ, Petersen K, Bäumer T, Rosenkranz M, Buhmann C, Thomasius R (2002). Plasma concentrations of 5-HT, 5-HIAA, norepinephrine, epinephrine and dopamine in ecstasy users. *Neuro Endocrinol Lett.* 23:259-61.
- 682.** Sumnall HR, O'Shea E, Marsden CA, Cole JC (2004). The effects of MDMA pretreatment on the behavioural effects of other drugs of abuse in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacol Biochem Behav.* 77:805-14.
- 683.** Suto N, Tanabe LM, Austin JD, Creekmore E, Vezina P (2003). Previous exposure to VTA amphetamine enhances cocaine self-administration under a progressive ratio schedule in an NMDA, AMPA/kainate, and metabotropic glutamate receptor-dependent manner. *Neuropsychopharmacology.* 28:629-39.

- 684.** Swann JW, Pierson MG, Smith KL, Lee CL (1999). Developmental neuroplasticity: roles in early life seizures and chronic epilepsy. *Adv Neurol.* 79:203-16.
- 685.** Switzer RC 3rd (2000). Application of silver degeneration stains for neurotoxicity testing. *Toxicol Pathol.* 28:70-83.
- 686.** Taffe MA, Weed MR, Davis S, Huitrón-Resendiz S, Schroeder R, Parsons LH, Henriksen SJ, Gold LH (2001). Functional consequences of repeated (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treatment in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology.* 24:230-9.
- 687.** Taffe MA, Davis SA, Yuan J, Schroeder R, Hatzidimitriou G, Parsons LH, Ricaurte GA, Gold LH (2002). Cognitive performance of MDMA-treated rhesus monkeys: sensitivity to serotonergic challenge. *Neuropsychopharmacology.* 27:993-1005.
- 688.** Taffe MA, Huitrón-Resendiz S, Schroeder R, Parsons LH, Henriksen SJ, Gold LH (2003). MDMA exposure alters cognitive and electrophysiological sensitivity to rapid tryptophan depletion in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav.* 76:141-52.
- 689.** Tancer ME, Johanson CE (2001). The subjective effects of MDMA and mCPP in moderate MDMA users. *Drug Alcohol Depend.* 65:97-101.
- 690.** Tarazi FI, Baldessarini RJ (2000). Comparative postnatal development of dopamine D(1), D(2) and D(4) receptors in rat forebrain. *Int J Dev Neurosci.* 18:29-37.
- 691.** Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ (1998a). Postnatal development of dopamine D4-like receptors in rat forebrain regions: comparison with D2-like receptors. *Brain Res Dev Brain Res.* 110:227-33.
- 692.** Tarazi FI, Tomasini EC, Baldessarini RJ (1998b). Postnatal development of dopamine and serotonin transporters in rat caudate-putamen and nucleus accumbens septi. *Neurosci Lett.* 254:21-4.
- 693.** Teicher MH, Barber NI, Gelbard HA, Gallitano AL, Campbell A, Marsh E, Baldessarini RJ (1993). Developmental differences in acute nigrostriatal and mesocorticolimbic system response to haloperidol. *Neuropsychopharmacology.* 9:147-56.
- 694.** Teicher MH (1999). Limbic serotonin turnover plunges during puberty. Poster presented at the meeting of the Society for Neuroscience, Miami Beach, FL.
- 695.** Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC Jr (1995). Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Brain Res Dev Brain Res.* 89:167-72.

Bibliografía

- 696.** Terranova ML, Laviola G, Alleva E (1993). Ontogeny of amicable social behavior in the mouse: gender differences and ongoing isolation outcomes. *Dev Psychobiol.* 26:467-81.
- 697.** Terranova ML, Laviola G, de Acetis L, Alleva E (1998). A description of the ontogeny of mouse agonistic behavior. *J Comp Psychol.* 112:3-12.
- 698.** The National Survey on Drug Use and Health (2004). United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). World drug report. Vol. 1: Analysis.
- 699.** Thomas MJ, Beurrier C, Bonci A, Malenka RC (2001). Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat Neurosci.* 4:1217-23.
- 700.** Thomasius R, Petersen K, Buchert R, Andresen B, Zapletalova P, Wartberg L, Nebeling B, Schmoldt A (2003). Mood, cognition and serotonin transporter availability in current and former ecstasy (MDMA) users. *Psychopharmacology (Berl).* 167:85-96.
- 701.** Thomasius R, Zapletalova P, Petersen K, Buchert R, Andresen B, Wartberg L, Nebeling B, Schmoldt A (2006). Mood, cognition and serotonin transporter availability in current and former ecstasy (MDMA) users: the longitudinal perspective. *J Psychopharmacol.* 20:211-25.
- 702.** Thompson MR, Li KM, Clemens KJ, Gurtman CG, Hunt GE, Cornish JL, McGregor IS (2004). Chronic fluoxetine treatment partly attenuates the long-term anxiety and depressive symptoms induced by MDMA ("Ecstasy") in rats. *Neuropsychopharmacology.* 29:694-704.
- 703.** Timár J, Gyarmati S, Szabó A, Fürst S (2003). Behavioural changes in rats treated with a neurotoxic dose regimen of dextrorotatory amphetamine derivatives. *Behav Pharmacol.* 14:199-206.
- 704.** Topp L, Hando J, Dillon P, Roche A, Solowij N (1999). Ecstasy use in Australia: patterns of use and associated harm. *Drug Alcohol Depend.* 55:105-15.
- 705.** Tóth G, Fekete M (1986). 5-Hydroxyindole acetic excretion in newborns, infants and children. *Acta Paediatr Hung.* 27:221-6.
- 706.** Touriño C, Maldonado R, Valverde O (2007). MDMA attenuates THC withdrawal syndrome in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 193:75-84.
- 707.** Touriño C, Ledent C, Maldonado R, Valverde O (2008). CB1 cannabinoid receptor modulates 3,4-methylenedioxymethamphetamine acute responses and reinforcement. *Biol Psychiatry.* 63:1030-8.

- 708.** Trifunović RD, Brodie MS (1996). The effects of clomipramine on the excitatory action of ethanol on dopaminergic neurons of the ventral tegmental area in vitro. *J Pharmacol Exp Ther.* 276:34-40.
- 709.** Trigo JM, Panayi F, Soria G, Maldonado R, Robledo P (2006). A reliable model of intravenous MDMA self-administration in naïve mice. *Psychopharmacology (Berl).* 184:212-20.
- 710.** Trigo JM, Renoir T, Lanfumey L, Hamon M, Lesch KP, Robledo P, Maldonado R (2007). 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration is abolished in serotonin transporter knockout mice. *Biol Psychiatry.* 62:669-79.
- 711.** Trigo JM, Cabrero-Castel A, Berrendero F, Maldonado R, Robledo P (2008). MDMA modifies active avoidance learning and recall in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 197:391-400.
- 712.** Tucker GT, Lennard MS, Ellis SW, Woods HF, Cho AK, Lin LY, Hiratsuka A, Schmitz DA, Chu TY (1994). The demethylation of methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") by debrisoquine hydroxylase (CYP2D6). *Biochem Pharmacol.* 47:1151-6.
- 713.** Tye NC, Everitt BJ, Iversen SD (1977). 5-Hydroxytryptamine and punishment. *Nature.* 268:741-3.
- 714.** Tye NC, Iversen SD, Green AR (1979). The effects of benzodiazepines and serotonergic manipulations on punished responding. *Neuropharmacology.* 18:689-95.
- 715.** Uhl GR, Hall FS, Sora I (2002). Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry.* 7:21-6.
- 716.** van Eden CG, Kros JM, Uylings HB (1990). The development of the rat prefrontal cortex. Its size and development of connections with thalamus, spinal cord and other cortical areas. *Prog Brain Res.* 85:169-83.
- 717.** Verheyden SL, Hadfield J, Calin T, Curran HV (2002). Sub-acute effects of MDMA (+/-3,4-methylenedioxymethamphetamine, "ecstasy") on mood: evidence of gender differences. *Psychopharmacology (Berl).* 161:23-31.
- 718.** Verheyden SL, Henry JA, Curran HV (2003). Acute, sub-acute and long-term subjective consequences of "ecstasy" (MDMA) consumption in 430 regular users. *Hum Psychopharmacol.* 18:507-17.
- 719.** Verkes RJ, Gijsman HJ, Pieters MS, Schoemaker RC, de Visser S, Kuijpers M, Pennings EJ, de Bruin D, Van de Wijngaart G, Van Gerven JM, Cohen AF (2001). Cognitive performance and serotonergic function in users of ecstasy. *Psychopharmacology (Berl).* 153:196-202.

Bibliografia

- 720.** Verrico CD, Miller GM, Madras BK (2007). MDMA (Ecstasy) and human dopamine, norepinephrine, and serotonin transporters: implications for MDMA-induced neurotoxicity and treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 189:489-503.
- 721.** Vollenweider FX, Gamma A, Liechti M, Huber T (1998). Psychological and cardiovascular effects and short-term sequelae of MDMA ("ecstasy") in MDMA-naïve healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology*. 19:241-51.
- 722.** von Geusau NA, Stalenhoef P, Huizinga M, Snel J, Ridderinkhof KR (2004). Impaired executive function in male MDMA ("ecstasy") users. *Psychopharmacology (Berl)*. 175:331-41.
- 723.** von Sydow K, Lieb R, Pfister H, Höfler M, Wittchen HU (2002). Use, abuse and dependence of ecstasy and related drugs in adolescents and young adults-a transient phenomenon? Results from a longitudinal community study. *Drug Alcohol Depend*. 66:147-59.
- 724.** Waelti P, Dickinson A, Schultz W (2001). Dopamine responses comply with basic assumptions of formal learning theory. *Nature*. 412:43-8.
- 725.** Walker EF, Walder DJ, Reynolds F (2001). Developmental changes in cortisol secretion in normal and at-risk youth. *Dev Psychopathol*. 13:721-32.
- 726.** Walker QD, Williams CN, Jotwani RP, Waller ST, Francis R, Kuhn CM (2007). Sex differences in the neurochemical and functional effects of MDMA in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 189:435-45.
- 727.** Walters CL, Kuo YC, Blendy JA (2003). Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. *J Neurochem*. 87:1237-44.
- 728.** Wallace TL, Gudelsky GA, Vorhees CV (2001). Alterations in diurnal and nocturnal locomotor activity in rats treated with a monoamine-depleting regimen of methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*. 153:321-6.
- 729.** Wang JQ, McGinty JF (1996). D1 and D2 receptor regulation of preproenkephalin and prodynorphin mRNA in rat striatum following acute injection of amphetamine or methamphetamine. *Synapse*. 22:114-22.
- 730.** Wang X, Baumann MH, Xu H, Rothman RB (2004). 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) administration to rats decreases brain tissue serotonin but not serotonin transporter protein and glial fibrillary acidic protein. *Synapse*. 53:240-8.

- 731.** Wang X, Baumann MH, Xu H, Morales M, Rothman RB (2005). (+/-)-3,4-Methylenedioxyamphetamine administration to rats does not decrease levels of the serotonin transporter protein or alter its distribution between endosomes and the plasma membrane. *J Pharmacol Exp Ther.* 314:1002-12.
- 732.** Wang X, Baumann MH, Dersch CM, Rothman RB (2007). Restoration of 3,4-methylenedioxyamphetamine-induced 5-HT depletion by the administration of L-5-hydroxytryptophan. *Neuroscience.* 148:212-20.
- 733.** Ward J, Hall K, Haslam C (2006). Patterns of memory dysfunction in current and 2-year abstinent MDMA users. *J Clin Exp Neuropsychol.* 28:306-24.
- 734.** Wareing M, Fisk JE, Murphy PN (2000). Working memory deficits in current and previous users of MDMA ("ecstasy"). *Br J Psychol.* 91:181-8.
- 735.** Wareing M, Murphy PN, Fisk JE (2004). Visuospatial memory impairments in users of MDMA ("ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl).* 173:391-7.
- 736.** Wareing M, Fisk JE, Murphy P, Montgomery C (2005). Visuo-spatial working memory deficits in current and former users of MDMA ("ecstasy"). *Hum Psychopharmacol.* 20:115-23.
- 737.** Warner EA (1995). Is your patient using cocaine? Clinical signs that should raise suspicion. *Postgrad Med.* 98:173-6, 180.
- 738.** Waters NS, Klintsova AY, Foster TC (1997). Insensitivity of the hippocampus to environmental stimulation during postnatal development. *J Neurosci.* 17:7967-73.
- 739.** Weir E (2000). Raves: a review of the culture, the drugs and the prevention of harm. *CMAJ.* 162:1843-8.
- 740.** Weiss F (2005). Neurobiology of craving, conditioned reward and relapse. *Curr Opin Pharmacol.* 5:9-19.
- 741.** Weiss RD, Mirin SM, Bartel RL (1994). Cocaine. American Psychiatric Press. Washington D.C.: pp 1-204.
- 742.** Whitaker-Azmitia PM, Aronson TA (1989). "Ecstasy" (MDMA)-induced panic. *Am J Psychiatry.* 146:119.
- 743.** White NM, Hiroi N (1998). Preferential localization of self-stimulation sites in striosomes/patches in the rat striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6486-91.

Bibliografia

- 744.** White SR, Duffy P, Kalivas PW (1994). Methylenedioxyamphetamine depresses glutamate-evoked neuronal firing and increases extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens in vivo. *Neuroscience*. 62:41-50.
- 745.** White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ (1996). The effects of methylenedioxyamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. *Prog Neurobiol*. 49:455-79.
- 746.** Wichems CH, Hollingsworth CK, Bennett BA (1995). Release of serotonin induced by 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and other substituted amphetamines in cultured fetal raphe neurons: further evidence for calcium-independent mechanisms of release. *Brain Res*. 695:10-8.
- 747.** Wilson MA, Ricaurte GA, Molliver ME (1989). Distinct morphologic classes of serotonergic axons in primates exhibit differential vulnerability to the psychotropic drug 3,4-methylenedioxyamphetamine. *Neuroscience*. 28:121-37.
- 748.** Wilson B, Cockburn J, Baddeley A (1990). *Test di Memoria Comportamentale di Rivermead (Manuale)*. Organizzazioni Speciali : Firenze.
- 749.** Wilz KJ, Bolton RL (1971). Exploratory behavior in response to the spatial rearrangement of familiar stimuli. *Psychon Sci*. 24:117-18.
- 750.** Williams MT, Morford LL, Wood SL, Rock SL, McCrea AE, Fukumura M, Wallace TL, Broening HW, Moran MS, Vorhees CV (2003). Developmental 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) impairs sequential and spatial but not cued learning independent of growth, litter effects or injection stress. *Brain Res*. 968:89-101.
- 751.** Wills TA, Vaccaro D, McNamara G (1994). Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse*. 6:1-20.
- 752.** Windle M, Windle RC (1993). The continuity of behavioral expression among disinhibited and inhibited childhood subtypes. *Clin Psychol Rev*. 13:741-61.
- 753.** Winstock AR, Wolff K, Ramsey J (2001). Ecstasy pill testing: harm minimization gone too far?. *Addiction*. 96:1139-48.
- 754.** Wise RA, Rompre PP (1989). Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol*. 40:191-225.
- 755.** Wish ED, Fitzelle DB, O'Grady KE, Hsu MH, Arria AM (2006). Evidence for significant polydrug use among ecstasy-using college students. *J Am Coll Health*. 55:99-104.

- 756.** Witt ED (1994). Mechanisms of alcohol abuse and alcoholism in adolescents: a case for developing animal models. *Behav Neural Biol.* 62:168-77.
- 757.** Wu D, Otton SV, Inaba T, Kalow W, Sellers EM (1997). Interactions of amphetamine analogs with human liver CYP2D6. *Biochem Pharmacol.* 53(11):1605-12.
- 758.** Xie T, Tong L, McLane MW, Hatzidimitriou G, Yuan J, McCann U, Ricaurte G (2006). Loss of serotonin transporter protein after MDMA and other ring-substituted amphetamines. *Neuropsychopharmacology.* 31:2639-51.
- 759.** Yamaguchi K, Kandel DB (1984a). Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: II. Sequences of progression. *Am J Public Health.* 74:668-72.
- 760.** Yamaguchi K, Kandel DB (1984b). Patterns of drug use from adolescence to young adulthood: III. Predictors of progression. *Am J Public Health.* 74:673-81.
- 761.** Yamamoto BK, Spanos LJ (1988). The acute effects of methylenedioxyamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur J Pharmacol.* 148:195-203.
- 762.** Yamamoto BK, Nash JF, Gudelsky GA (1995). Modulation of methylenedioxyamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. *J Pharmacol Exp Ther.* 273:1063-70.
- 763.** Yang XM, Gorman AL, Dunn AJ, Goeders NE (1992). Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacol Biochem Behav.* 41:643-50.
- 764.** Yap JJ, Miczek KA (2007). Social defeat stress, sensitization, and intravenous cocaine self-administration in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 192:261-73.
- 765.** Yuan J, Cord BJ, McCann UD, Callahan BT, Ricaurte GA (2002). Effect of depleting vesicular and cytoplasmic dopamine on methylenedioxyamphetamine neurotoxicity. *J Neurochem.* 80:960-9.
- 766.** Zaczek R, Culp S, De Souza EB (1990). Intrasyaptosomal sequestration of [3H]amphetamine and [3H]methylenedioxyamphetamine: characterization suggests the presence of a factor responsible for maintaining sequestration. *J Neurochem.* Jan;54(1):195-204.
- 767.** Zakzanis KK, Campbell Z (2006). Memory impairment in now abstinent MDMA users and continued users: a longitudinal follow-up. *Neurology.* 66:740-1.

Bibliografia

- 768.** Zakzanis KK, Young DA (2001a). Memory impairment in abstinent MDMA ("Ecstasy") users: a longitudinal investigation. *Neurology*. 56:966-9.
- 769.** Zakzanis KK, Young DA (2001b). Executive function in abstinent MDMA ("ecstasy") users. *Med Sci Monit*. 7:1292-8.
- 770.** Zakzanis KK, Young DA, Campbell Z (2003). Prospective memory impairment in abstinent MDMA ("Ecstasy") users. *Cognit Neuropsychiatry*. 8:141-53.
- 771.** Zecevic N, Bourgeois JP, Rakic P (1989). Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Brain Res Dev Brain Res*. 50:11-32.
- 772.** Zehr JL, Todd BJ, Schulz KM, McCarthy MM, Sisk CL (2006). Dendritic pruning of the medial amygdala during pubertal development of the male Syrian hamster. *J Neurobiol*. 66:578-90.
- 773.** Zemishlany Z, Aizenberg D, Weizman A (2001). Subjective effects of MDMA ("Ecstasy") on human sexual function. *Eur Psychiatry*. 16:127-30.
- 774.** Zhang P, Anglade P, Hirsch EC, Javoy-Agid F, Agid Y (1994). Distribution of manganese-dependent superoxide dismutase in the human brain. *Neuroscience*. 61:317-30.
- 775.** Zhang L, Shirayama Y, Shimizu E, Iyo M, Hashimoto K (2006). Protective effects of minocycline on 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity in serotonergic and dopaminergic neurons of mouse brain. *Eur J Pharmacol*. 544:1-9.
- 776.** Zheng YW, Laverty R (1993). Neurotoxic effects of MDMA in different strains of mice. *Proc Univ Otago Med Sch*. 71:5-6.
- 777.** Zinkernagel C, Naef MR, Bucher HC, Ladewig D, Gyr N, Battegay M (2001). Onset and pattern of substance use in intravenous drug users of an opiate maintenance program. *Drug Alcohol Depend*. 64:105-9.
- 778.** Zuckerman M (1994). Behavioral expressions and biosocial bases of sensation seeking. Cambridge University Press. Cambridge MA:1-480.
- 779.** Zuckerman M (1996). The psychobiological model for impulsive unsocialized sensation seeking: a comparative approach. *Neuropsychobiology*. 34:125-9.