

Interacció dels derivats amfetamínics amb els receptors nicotínics: Aspectes moleculars i funcionals

Sara Garcia Ratés

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

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

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

Interacció dels derivats amfetamínics amb els
receptors nicotínics: Aspectes moleculars i
funcionals.

Sara Garcia Ratés

2011



FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA I QUÍMICA TERAPÈUTICA

PROGRAMA DE DOCTORAT: RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DEL
MEDICAMENT
BIENNI 2007-2008

Interacció dels derivats amfetamínics amb els receptors nicotínics: Aspectes moleculars i funcionals.

Memòria presentada per **Sara Garcia Ratés** per optar al títol de doctor de la
Universitat de Barcelona.

Directors

David Pubill Sánchez Elena Escubedo Rafa

Doctorand

Sara Garcia Ratés

Durant la realització d'aquesta tesi l'autor ha gaudit d'una beca de doctorat associada a projectes subvencionats per l'AGAUR (2005SGR00793) i el Plan Nacional sobre Drogas (2008I003).

Publicacions derivades d'aquesta tesi:

1. Garcia-Ratés S, Camarasa J, Escubedo E, Pubill D. *Methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine interact with central nicotinic receptors and induce their up-regulation*. Toxicol Appl Pharmacol. 2007 Sep 15; 223(3):195-205.
2. Chipana C, García-Ratés S, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E. *Different oxidative profile and nicotinic receptor interaction of amphetamine and 3,4-methylenedioxy-methamphetamine*. Neurochem Int. 2008 Feb; 52(3):401-10.
3. Escubedo E, Camarasa J, Chipana C, García-Ratés S, Pubill D. *Involvement of nicotinic receptors in methamphetamine- and MDMA-induced neurotoxicity: pharmacological implications*. Int Rev Neurobiol. 2009; 88:121-66.
4. Camarasa J, Ratés SG, Pubill D, Escubedo E. *The involvement of nicotinic receptor subtypes in the locomotor activity and analgesia induced by methamphetamine in mice*. Behav Pharmacol. 2009 Sep 5.
5. Garcia-Ratés S, Camarasa J, Sánchez-García AI, Gandía L, Escubedo E, Pubill D. *The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on nicotinic receptors: intracellular calcium increase, calpain/caspase 3 activation, and functional upregulation*. Toxicol Appl Pharmacol. 2010 May 1; 244(3):344-53.
6. Pubill D, Garcia-Ratés S, Camarasa J, Escubedo E. *Neuronal nicotinic receptors as new targets for amphetamine derivatives*. Pharmaceuticals (Enviat).

Comunicacions en Congressos:

1. "Methamphetamine and methylenedioxyamphetamine interact with and upregulate alpha-7 nicotinic receptors in NGF-differentiated PC 12 cells". IUPHAR XVth World Congress of Pharmacology 2006, Pekín, China.

2. *"MDMA binds to nicotinic receptors and induces their upregulation"*. Congreso de la Sociedad Española de Farmacología 2007, Alcalá de Henares.
3. *"Modulación farmacológica de la neurotoxicidad por derivados amfetamínicos"*. Reunión científica de la Red de Transtornos Adictivos 2008, Madrid.
4. *"Efectes de l'MDMA sobre els receptors nicotínics en cèl·lules PC12" ("Effects of the MDMA on the PC12 cells by interaction on the nicotinic receptors".)* Simposi de Neurobiologia 2008, Societat Catalana de Biologia, Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.
5. *"Efecto de la MDMA sobre los niveles de calcio citosólico en células PC12. Papel de los receptores nicotínicos"*. Reunión científica de la Red de Transtornos Adictivos 2009, Tarragona.
6. *"Involvement of nicotinic receptors in MDMA-induced toxicity and cytosolic calcium increase in PC12 cells"*. 15th International Symposium on Chromaffin Cell Biology 2009, Mérida, México.
7. *"Effect of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on cytosolic calcium levels in PC 12 cells. Role of nicotinic receptors."* Worldpharma 2010, Copenhagen, Denmark.

“Un cop vaig entrar en la jungla del sistema nerviós vaig quedar tan captivada per la seva bellesa que vaig decidir dedicar-li tot el meu temps, tota la meva vida”.

Rita Levi-Montalcini, Premi Nobel de Medicina 1986.

Als meus padrins, Luis, Josep Marc i Teresa

En primer lloc, aquesta tesi no hauria estat possible sense l'ajut i la direcció del Dr. David Pubill i la Dra. Elena Escubedo. A ells, juntament amb el Dr. Jordi Camarasa, els dono les gràcies per oferir-me l'oportunitat de treballar en la seva línia d'investigació, i dedicar tant esforç i temps en la meva formació com a científica. Sense la seva constància i motivació no hauria aconseguit ser una bona "especialista en cèl·lules PC12". Estic orgullosa d'haver format part d'aquest grup de recerca i de que hagin estat els meus Mestres en l'inici del meu camí com a investigadora.

A vosaltres moltes gràcies.

En segon lloc, m'agradaria donar les gràcies al Dr. Antonio García, director del Instituto Teófilo Hernando de Madrid, i al grup de recerca del Dr. Luis Gandía per donar-me la oportunitat de realitzar una estada al seu laboratori. No em puc oblidar de l'Anabel, durant un mes ella no em va deixar ni un moment sola i em va ensenyar detalladament la tècnica d'electrofisiologia i com manipular "oosito". També vull agrair a tots els companys del ITH i el departament de Farmacologia de la Universitat Autònoma de Madrid per la bon acollida que em van donar, l'Alberto, la Marta, la Elena, la Juliana, la Alicia, l'Angela i el Juan.

A tots vosaltres moltes gràcies.

Agraeixo de manera molt especial el suport, l'ajuda i ,sobretot, els moments divertits dels meus companys de grup, en Carlos amb el seu optimisme i les seves bromes, la Loli i els seus embolics a l'hora d'aparcar el cotxe a prop de la Facultat, la Mònica amb els seus altibaixos, la Sònia amb els seus moments de crisi, la Iris coneguda com a "shakiris", la Clara Ros la més experta en punció cardíaca, en Jose i en Raül experts en síntesi de noves drogues i de tots els "peques" que han format part del grup dels "Amfetes" en algun període de la seva carrera universitària, la Cristina i les nostres converses sobre música catalana, la Tamara agradable i dolceta, el Dani i els experiments de neurites, el Lucas amb el seu "no lo entiendo", l'Angela i les seves classes de portuguès, l'Aris i els seus apunts amb grec, la Maria i els "cotilleos" de Farmàcia, el Jordi i la Ruth sempre animats amb els primers hits del verano, la Clara Estany i els seus detalls, la Esther i la seva responsabilitat, el Marc sempre voleiant pel

seu món, la Sònia Niubó promovent la incorporació d'alumnes de les terres de Ponent, la Maria Imani i els protocols amb anglès i l'Andrés, un cas a part.

A tots vosaltres moltes gràcies.

La meva línia d'investigació forma part d'un departament que m'ha acollit cordialment i ha posat a la meva disposició tots els medis necessaris per a realitzar de forma satisfactòria aquest treball, així doncs, agraeixo aquesta disposició a tot el personal de la Unitat, als que en formaven part quan jo vaig entrar i als que s'han incorporat recentment. Tan en les hores de treball com en les hores de lleure he disposat d'una gran companyia que no es troba en qualsevol Unitat. La preparació ben acurada de celebracions de la Unitat per part de la Mar, els dinars distesos amb converses interessants en companyia dels professors de la Unitat, la resolució de problemes tècnics amb la Teresa i la experta Silvia.

A tots vosaltres moltes gràcies.

No em puc oblidar d'agrair el suport i, sobretot, els bons moments que m'han fet passar, tots els meus companys, fora i dins del laboratori; els de la poiata del davant: Dani, Javi, Marc Yeste, Marta, Pizarro, Aureli, Sergi i Ester, ningú em pot explicar més coses sobre Western blot que vosaltres; els de la poiata del costat: Laia Vilà, Pou, Alba, Miguel, cada cop que us miro em venen ganes de no veure coca cola gaire sovint, i, encara que sigui professora sempre present en la poiata, no em puc oblidar la Nuri, qui millor que ella m'explicaria el que és el pipeteig invers?; els del laboratori de farmacognòsia: Mercè, Carol, Hadi, Renato, Enric i Simona, sempre deixant anant "bons flaires" de tot tipus; els del laboratori dels "palestins": Teresa, Natalia, David Álvarez, Laia, Luisa, Fèlix, David Porquet, sempre concentrats treballant ja que el Dr. Xevi no us treu l'ull de sobre; i els del laboratori de més enllà: Richi, Emma i Lucía, encarregats de recollir tots els paquets que arribaven a la Unitat ja que tots estaven a nom d'Emma Barroso; i també a tots els que van fer màsters, treballs dirigits o petites estades al laboratori i que vaig conèixer i ja han marxat, sense tots vosaltres el repte de aconseguir els millors resultats disfrutant de la feina cada dia no hauria estat possible.

A tots vosaltres moltes gràcies.

Finalment, la meva disposició per a realitzar aquesta tesi no hagués estat una realitat sense la comprensió, l'empenta i el suport constant de la meva família. Els agraeixo aquesta oportunitat que m'han donat i que ha permès dedicar-me al difícil i complex món de l' investigació.

Així doncs, gràcies a tots.

Índex

Abreviacions	V
Introducció i objectius	1
Revisió teòrica	7
1. LA METILEN-3,4-DIOXIMETAMFETAMINA (MDMA)	9
Origen	9
Estructura i característiques químiques	10
Propietats farmacològiques	11
Mecanisme d'acció	13
2. LA METAMFETAMINA (METH)	14
Origen	14
Estructura i característiques químiques	14
Propietats farmacològiques	16
Mecanisme d'acció	17
3. NEUROTOXICITAT DE LES AMFETAMINES	18
Amfetamines, DAT i SERT	18
Amfetamines i MAO	20
Amfetamines i hipertèrmia	21
Producció d'espècies reactives d'oxigen induïda per amfetamines	22
Excitotoxicitat en els terminals dopaminèrgics i serotoninèrgics	25
Alteració de la funció mitocondrial i del reticle endoplasmàtic	26
Amfetamines i inflamació	28
4. ELS RECEPTORS NICOTÍNICS	29
Estructura	30
Lloc d'unió dels lligands	31
Entrada de ions	33
Estats del receptor	34
Implicació dels nAChR en les vies de transducció de senyal neuronals	35
Expressió i regulació dels nAChR	38
Regulació a l'alça dels nAChR	38
Implicació dels nAChR en malalties neurodegeneratives	40
Receptors nicotínics i excitotoxicitat per amfetamines	41

5. LES CÈL·LULES PC12	42
Creixement i resposta a l'NGF	42
Metabolisme de les catecolamines	44
La línia PC12 com a model d'investigació	44
Els receptors nicotínics i les cèl·lules PC12	45
Les cèl·lules PC12 i les amfetamines	46
6. OVÒCITS COM A SISTEMA D'EXPRESSION DE PROTEÏNES	47
Avantatges d'utilització dels ovòcits	48
Material i mètodes	51
1. CULTIUS DE CÈL·LULES PC12	53
Manteniment del cultiu	53
Diferenciació de les cèl·lules PC12	54
Col·lagenació de plaques	55
Congelació-descongelació	55
Comptatge cel·lular en càmera de Neubauer	55
Reactius	56
2. CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES CORTICALS DE RATOLÍ	56
Protocol de preparació dels cultius	56
Reactius	57
3. TRACTAMENT <i>in vivo</i>	58
Tractament dels animals per determinar la regulació a l'alça dels nAChR	58
Tractament dels animals amb deleció dels nAChR $\alpha 7$ (<i>Knockout $\alpha 7$</i>)	60
Processat del teixit	61
4. OBTENCIÓ DELS SUBSTRATS PER ALS DIFERENTS ASSAIGS	61
Preparació de membranes de cèl·lules PC12	61
Preparació crua de cervell	62
Solubilització de receptors	62
Extracció citoplasma-nucli-mitocondri	63
5. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ PROTÈICA PEL MÈTODE DE BRADFORD	64
6. ASSAIG DE FIXACIÓ DE RADIOLLIGANDS	64
Fixació de l' [³ H]MLA, [³ H]EB, [³ H]Paroxetina i [³ H]WIN35428	66

Saturació de l' [³ H]MLA i [³ H]EB	68
Competició de l' [³ H]MLA i [³ H]EB	68
Anàlisi de dades	69
Reactius	69
7. IMMUNOPRECIPITACIÓ	69
Reactius	70
8. MESURA DE L'ENTRADA DE CALCI I SODI PER FLUORIMETRIA	71
Reactius	73
9. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEINA PER WESTERN BLOT	73
Electroforesi	73
Electrotransferència	74
Immunodetecció	75
Reactius	77
10. ELECTROFISIOLOGIA	77
Preparació dels ARNm de les subunitats del receptor nicotínic humà i expressió en ovòcits de <i>Xenopus</i>	77
Registre dels corrents iònics	78
11. COMPOSTOS	79
Resultats	81
1. ASSAIGS DE COMPETICIÓ	83
Desplaçament de l' [³ H] MLA per MDMA i METH	83
Desplaçament de l' [³ H]Epibatidina	84
Increment en la densitat de receptors nicotínics <i>in vitro</i>	87
2. ASSAIGS DE SATURACIÓ	90
Determinació de la B _{max} i la K _D	90
3. INCREMENT EN LA DENSITAT DE RECEPTORS NICOTÍNICS <i>in vivo</i>	93
Efecte del tractament en la ganància de pes	93
Efecte del tractament en la densitat del transportador de serotonina	94
Efecte del tractament en la unió d' [³ H]EB	95
Efecte del tractament en la unió d' [³ H]MLA	97
Expressió de les subunitats α4 i α7	98
Immunoprecipitació de les subunitats α4 i β2	99

4. MECANISMES IMPLICATS EN LA REGULACIÓ A L'ALÇA DELS RECEPTORS NICOTÍNICS	101
Paper de la síntesi proteica i el tràfic del receptor	101
Paper de les Cinases de proteïna en la regulació a l'alça dels nAChR	104
5. ASSAIGS FUNCIONALS	109
L'increment de calci induït per ACh, nicotina i PNU282987	109
L'MDMA actua com agonista parcial dels nAChR	110
L'MDMA es comporta com agonista parcial en ovòcits que expressen el nAChR $\alpha 7$ humà i com antagonista sobre els nAChR $\alpha 4\beta 2$ nAChR	112
Vies implicades en l'increment de Ca^{2+} induït per MDMA	113
L'MDMA es comporta com antagonista dels nAChR $\alpha 4\beta 2$	115
6. EFECTES A MITJÀ I LLARG TERMINI SOBRE EL Ca^{2+} I VIES RELACIONADES	116
El pretractament amb MDMA incrementa els nivells basals de Ca^{2+}	116
Regulació a l'alça funcional	117
L'MDMA indueix la fragmentació de l'espectrina mitjançant l'activació de calpaïna i caspasa	119
7. ENANTIÒMERS DE L'MDMA I LA METH	124
Diferències d'afinitat dels enantiòmers d'MDMA i de la METH vers els nAChR	124
Entrada de Calci induïda pels enantiòmers de la METH i l'MDMA	126
Entrada de sodi i els enantiòmers de l'MDMA i la METH	129
Taules resum	131
8. EXPERIMENTS REALITZATS EN RATOLINS AMB DELECIÓ DEL RECEPTOR $\alpha 7$	133
Fixació de l' $[^3H]$ MLA	133
Efecte del tractament en l'increment de temperatura	133
Degeneració dels terminals dopaminèrgics	134
Degeneració dels terminals serotoninèrgics	135
Discussió i conclusions	137
Annex: Articles	157
Bibliografia	182

ABREVIACIONS

2-APB: 2-aminoetil difenil borat.

3-NT: 3-nitrotirosina.

5-HIAA: Àcid 5-hidroxiindolacètic.

5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina.

ACh: Acetilcolina

AD: Malatia d'alzheimer.

ADN: Àcid desoxiribonucleic.

AIF: Factor inductor d'apoptosi.

AMF: Amfetamina.

AMPA: Receptor de glutamat α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionic àcid.

Ara-C: Arabinosilcitosina.

ARNc: Àcid ribonuclèic codificant.

ARNm: Àcid ribonuclèic missatger.

α -Bgtx: α -Bungarotoxina.

Bh-IPn: Via habenulo-interpeduncular.

BiP: Proteïna d'unió a immunoglobulina.

BFA: Brefeldina A.

BSA: Albúmina de sèrum boví.

DNAc: Àcid desoxiribonucleic codificant.

RNAc: Àcid ribonucleic codificant.

CHOP: Proteïna homòloga de la proteïna d'unió al promotor CCAAT.

CHX: Cicloheximida.

CO₂: Diòxid de carboni.

Cpu: Caudat-putamen.

CsA: Ciclosporina A.

CYP2D6: Citocrom 2D6.

DA: Dopamina.

DANT: Dantrolè.

DAT: Transportador de dopamina.

DH β E: Dihidro- β -eritroidina.

DIC: Coagulació intravascular disseminada.

DMEM: Dulbecco's modified medium.

DMSO: Dimetil sulfòxid.

DMXB: Anabaseina 3-(2,4)-dimetoxibenzilidina.

DOPAC: Àcid 3,4- dihidroxifenilacètic.

DTT: Ditiotreitòl.

ECD: Domini extracel·lular.

EB: Epibatidina.

EDTA: Àcid etilen diamino tetraacètic.

EGTA: Etilen glicol bis (β -aminoetilèter).

ERAD: Degradació associada al reticle endoplasmàtic.

FCS: Fetal calf sèrum.

GABA: Àcid γ -amino butíric.

GAPDH: Gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa.

GF: 2-[1-(3-Dimetilaminopropil) indol-3-il]-3-(indol-3-il)-maleimida.

GLU: Glutamat.

GRP78: Proteïna 78 regulada per glucosa.

H₂O₂: Peròxid d'hidrogen.

HS: Horse serum.

IPn: Interpeduncular.

LSD: Àcid lisèrgic.

LTD: Depressió a llarg termini.

MAO: Monoamino oxidasa.

MDA: Metil dopamina.

MDMA: 3,4- Metilendioximetamfetamina.

METH: Metamfetamina.

MLA: metillicaconitina.

α -MpT : α -Metil-p-tirosina.

ARNm: Àcid ribonucleic missatger.

mGLUR5: Receptor metabotròpic de glutamat del subtipus 5.

nAChR: Receptor nicotínic neuronal.

NA: Noradrenalina.

nAc: Nucli accumbens.

NDP: Nitrendipí.

NE: Norepinefrina.

NET: Transportador de Noradrenalina.

NeuN: Proteïna nuclear neuronal.

NGF: Factor de creixement neuronal.

NIC: Nicotina.

nNOS: Nítric òxid sintasa.

NO: Òxid nítric.

NT: Neurotransmissor.

O₂⁻: Anió superòxid.

OH⁻: Radical hidroxil.

ONOO⁻: Peroxinitrit.

PC12: Cèl·lules de feocromocitoma.

PD: Malatia de Parkinson.

PDB: Protein data bank.

PKA: Proteïna quinasa A.

PKC: Proteïna quinasa C.

PLA₂: Fosfolipasa-A.

PMSF: Fluorur de fenilmetilsulfonil.

ROS: Espècies reactives d'oxigen.

SBDP: Fragments producte de la fragmentació de la espectrina

SERT: Transportador de serotonina.

SIADH: Síndrome d'hipersecreció inadequada d'hormona antidiurètica.

SIDA: Síndrome d'immunodeficiència adquirida.

smac/DIABLO : Factor mitocondrial activador de la caspasa/inhibidor directe de la proteïna d'unió d'apoptosi.

SN: Substància negra.

SOD: Superòxid dismutasa.

TM: Segments transmembrana.

TMD: Domini transmembrana.

TO: Tubercle olfactori.

TPH: Triptòfan hidroxilasa.

VMAT-2: Transportador de dopamina vesicular.

VOCC: Canals de calci depenents de voltatge.

VTA: Àrea ventral tegmental.

Introducció i objectius

La realitat de les drogues d'abús com la societat és variable. Així és que, en les dues últimes dècades, sobretot a la dècada dels anys 90, ha hagut un augment significatiu del consum de les drogues de síntesi, associades a determinats ambients, i amb unes connotacions que les fan anomenar de disseny.

Pel que fa al patró de consum, un element comú és el seu ús recreatiu. En gran nombre, aquestes drogues sintètiques són consumides en moments d'oci, sempre amb un marcat caràcter grupal, quasi tribal i facilitador de relacions, essent en moltes ocasions un consum experimental i associat gairebé sempre a la població jove que es troba en fase de desenvolupament, el qual agrava el problema. Segons informe del *Plan Nacional sobre drogas* de 2010, durant els últims anys s'ha detectat un fort increment del consum dels derivats amfetamínics (com també de la cocaïna i el cànnabis) que es comercialitzen en forma de càpsules i comprimits que poden tenir diverses formes, mides i colors, i poden presentar diferents tipus de gravats. L'estètica i la via de consum d'aquest tipus de drogues fa que no siguin tan mal vistes com per exemple la heroïna.

Les amfetamines exerceixen potents efectes estimulants a través de l'activació de les neurones dopaminèrgiques i serotoninèrgiques. Entre elles estan la metilendioximetamfetamina (MDMA), coneguda comunament com a "èxtasi", i la metamfetamina (METH), coneguda com a "speed" o "ice" en la seva forma fumable; aquestes són els derivats més populars utilitzats com a drogues recreatives en els països desenvolupats.

Malgrat el seu consum, s'ha demostrat que l'MDMA provoca neurotoxicitat serotoninèrgica en rates i primats (Ricaurte i col., 1988; De Souza i col., 1990; Green i col., 2003). D'altra banda, estudis neurotoxicològics han establert que certes pautes d'administració de METH provoquen la degeneració de les fibres estriatals dopaminèrgiques i serotoninèrgiques en els cervells de varies espècies: rata, ratolí, i primats no humans (Wrona i col., 1997; Davidson i col., 2001). Per tant, la possibilitat de que aquestes drogues produeixin efectes neurotòxics en consumidors humans és ben real i el seu estudi és, per tant, d'elevat interès.

L'"speed" (METH) és la droga de síntesi més consumida després de l'"èxtasi"(MDMA) (Royo-Isach i col., 2004). La percepció de ser una droga "segura", de fàcil obtenció i de preu assequible, són variables rellevants que contribueixen a

l'extensió del seu consum. Des de l'àmbit d'atenció primària es recomana que s'adoptin programes de disminució de danys i riscos.

S'ha comprovat que en l'administració d'amfetamines, un factor determinant en la degeneració dels terminals neuronals és l'estrès oxidatiu, mitjançant la producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) (Cubells i col., 1994; Cadet i col., 1995; Yamamoto i Zhu, 1998; Imam i col., 1999). De tota manera, encara queden punts a aclarir sobre els mecanismes pels quals les amfetamines provoquen aquesta neurodegeneració.

Degut a la complexitat dels models *in vivo*, resulta interessant el fet de disposar de models experimentals *in vitro* que permetin l'estudi d'aquests mecanismes sota condicions ben controlades. El nostre grup de recerca va posar a punt un model *in vitro*, basat en sinaptosomes d'estriat de rata, on l'addició de METH produïa l'aparició de ROS de forma dependent de calci extracel·lular, de l'activació de la proteïna cinasa C (PKC) i de l'òxid nítric-sintasa (nNOS). Alhora, un antagonista dels receptors nicotínics neuronals $\alpha 7$, la metillicaconitina (MLA), inhibia la producció de ROS (Pubill i col., 2005). En un treball posterior (Escubedo i col., 2005) es confirmà l'efecte de la metillicaconitina (un antagonista específic dels receptors α -7) com a neuroprotector front la METH en ratolins. També s'ha demostrat que en sinaptosomes de ratolí, els ROS induïts per METH són inhibits en presència d'MLA (Pubill i col., 2005), i en experiments recents s'ha demostrat el mateix per a l'MDMA (Chipana i col. 2006). Per tant, l'efecte neuroprotector de l'MLA permet ampliar les eines farmacològiques disponibles per a estudiar els efectes aguts i a llarg termini induïts per la metamfetamina i, per extensió, l'MDMA.

Aquest model, també corrobora una de les hipòtesis existents per la qual, dins els terminals sinàptics, la METH i l'MDMA en ratolins desplacen la dopamina (DA) vesicular, on és protegida de reaccions de degradació, deixant-la desprotegida al citoplasma. Aquestes amines són oxidades a espècies reactives d'oxigen com el peròxid d'hidrogen, superòxid, hidroxil i peroxinitrit (Sulzer i col., 1995; Deng i Cadet, 1999; Larsen i col., 2002). L'activació concomitant dels receptors α -7 afavoriria l'entrada de Ca^{2+} a través d'aquests i l'activació per aquest catió d'enzims dependents de Ca^{2+} com la PKC i l'nNOS.

El receptor $\alpha 7$ ($\alpha 7nAChRs$) és un homo-oligòmer format per 5 subunitats $\alpha 7$. És el receptor nicotínic homomèric d'acetilcolina més abundant en el sistema nerviós, es troba fonamentalment a l'hipocamp: en els terminals colinèrgics i en les interneurons GABAèrgiques. De tots els nAChR, els $\alpha 7$ són, amb gran diferència, els més permeables al calci. El paper fonamental que juga el calci en la supervivència i el desenvolupament de la neurona, la modulació de la seva activitat i, finalment, la mort, situa aquests receptors en una posició privilegiada i per tant, la implicació d'aquests receptors nicotínics $\alpha 7$ en els efectes de la metamfetamina i l'èxtasi, obre una línia d'investigació en la que ens plantejarem i estudiarem els diferents llocs d'acció i modulació d'aquest receptor.

Malgrat els bons resultats obtinguts en l'estudi dels sinaptosomes, aquests presentaven l'inconvenient de ser una preparació extemporània que comprenia només els terminals nerviosos, principal diana de les amfetamines, però no permetia realitzar estudis a temps llargs, ni sobre la viabilitat ni sobre respostes adaptatives de les neurones. Per tant, degut a la complexitat i llocs de modulació del receptor $\alpha 7$, era necessari disposar d'un model *in vitro* que expressés aquests receptors i, per tant, fes possible l'estudi de l'efecte dels derivats amfetamínics sobre aquests, tant pel que fa a la interacció física amb el receptor, com la seva traducció a nivell funcional o toxicològic. Per tant, era necessari poder disposar d'un model on es mantingués la integritat de la cèl·lula permetent així una acció sobre la totalitat del conjunt cel·lular.

Les cèl·lules PC12 són una línia que prové de feocromocitoma de rata i sintetitzen, emmagatzemen i secreten dopamina (DA) i noradrenalina (NA). L'addició del factor de creixement neuronal (NGF) indueix la diferenciació d'aquestes cèl·lules a un fenotip neuronal. L'NGF estimula les cèl·lules PC12 per a que detinguin la seva divisió, estenguin les seves neurites, expressin marcadors específics neuronals, així com el receptor $\alpha 7$ (Blumenthal i col., 1997; Madhok i col., 1995), i esdevinguin elèctricament excitables (Klesse i Parada, 1999). Donat que ambdós derivats amfetamínics actuen a nivell de sistema dopaminèrgic esdevingueren un model cel·lular idoni per al nostre estudi.

OBJECTIUS

1- Determinar l'afinitat de la METH i l'MDMA pels receptors nicotínics mitjançant assajos de competició i determinar si el tractament de les cèl·lules amb METH i MDMA provoquen, de manera anàloga a com fa la nicotina, alteracions en la densitat de receptors nicotínics tant *in vitro* com *in vivo*.

2- Explorar la participació de determinades vies en la regulació de receptors $\alpha 7$ i heteromèrics induïda per METH i MDMA. Concretament s'estudiarà la seva participació utilitzant inhibidors selectius.

3- Determinar l'efecte de l'MDMA i la METH sobre la funcionalitat dels receptors nicotínics mitjançant tècniques de fluorescència i avaluar els mecanismes implicats.

4- Determinar els efectes a llarg termini de l'MDMA sobre els receptors nicotínics.

5- Avaluar les diferències entre els enantiòmers tant de la METH com de l'MDMA sobre l'afinitat i la funcionalitat dels receptors nicotínics.

6- Avaluar si la deleció dels receptors $\alpha 7$ té efectes neuroprotectors sobre la neurotoxicitat dopaminèrgica induïda per l'MDMA en ratolins.

Revisió teòrica

1. LA METILEN-3,4-DIOXIMETAMFETAMINA (MDMA)

Origen

L'any 1912, la metilen-3,4-dioximetamfetamina (MDMA) va ser una de les substàncies intermediàries resultat d'un nou procediment de síntesi per a una nova patent de l'agent coagulant hidrastinina (Bayer/Elberfeld) pel Dr. Anton Köllish de l'empresa farmacèutica alemanya Merck (Darmstad). El nou compost va ser la *metilhidrastinina* i va ser patentat a Alemanya amb el número 274350, però a l'MDMA no se li va donar cap importància en aquell moment (Freudenmann R.W. i col., 2006).

L'any 1927, el Dr. Max Oberlin (Merck) estava interessat en els composts similars a l'adrenalina i l'efetonina. Va redescobrir la patent de la metilhidrastinina i estudiant el procediment de síntesi hi va trobar un intermediari que tenia una estructura similar a les substàncies que l'interessaven, l'MDMA, llavors anomenat *safrii-metil-amina*. En l'*Annual Report for 1927* consten els primers assajos amb l'MDMA i els altres intermediaris que constaven en la patent com l'*eugenil-metil-amina* i la *metil-eugenil-metil-amina*. Oberlin va observar que l'efecte de l'MDMA en els nivells de glucosa del teixit muscular eren comparables a l'efecte d'una dosi elevada de efetonina, però conclouia que no tenia efectes purament simpàtics, a més, va comprovar que presentava molta més toxicitat que els altres compostos. Els seus estudis es van detenir donat l'alt preu que implicava sintetitzar els compostos, però va advertir que s'hauria de continuar investigant amb aquests donat que podrien ser composts terapèuticament actius.

Fins l'any 1952 no hi ha més documents on aparegui l'MDMA, en aquest cas, en la llibreta de laboratori del Dr. Albert Van Schoor es troben notes d'assajos toxicològics en mosques que aquest realitzà, concluint que les mosques abans de morir es col·locaven en posició supina.

Durant els anys 1954-1955 la Universitat de Michigan va dur a terme un estudi esponsoritzat per l'armada dels Estats Units on es comparava l'efecte de la mescalina amb diversos compostos de estructura similar en diferents models animals, però aquestes investigacions van ser confidencials fins l'any 1973 que es van publicar en la revista *Toxicology and applied pharmacology* (Hardman H.F. i col., 1973).

El Dr. Wolfgang Fruhstorfer (Merck) estava interessat en la producció de nous estimulants, i l'any 1959 va treballar amb l'MDMA en col·laboració amb l' Institut de medicina de l'aviació.

L'any 1960 va aparèixer el primer article en el qual es descrivia la síntesi de l'MDMA. (Biniecki S. i col., 1960).

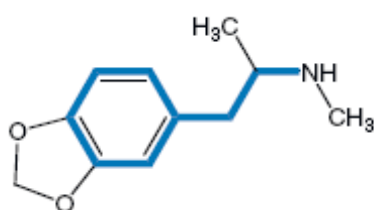
L'any 1978 es publica un estudi rellevant on es defineixen les característiques farmacològiques i farmacocinètiques de l'MDMA en humans.

A partir dels anys 70 ja es detecten pastilles per a ús psicoestimulant en els carrers de Chicago. Però el nom comú d'*Ecstasy* no apareix fins el principi dels anys 80 a Califòrnia.

És a finals dels anys 80 quan l'MDMA es classifica com a substància controlada en els Estats Units i prohibida en aquest i molts altres països.

Estructura i característiques químiques

L'MDMA (3,4-metilendioxi-N-metamfetamina) és un derivat de la fenilisopropilamina amb un anell substituït d'estructura similar a la metamfetamina i la mescalina, el que li confereix alhora propietats estimulants i d'alteració de les percepcions. Forma part del grup de substàncies entactògenes, paraula derivada del grec *en* (dintre) i del llatí *tactus* (tacte).



3,4-metilendioximetamfetamina

Quan es troba com a base lliure és de color blanc, i és insoluble en aigua però soluble en la majoria de solvents orgànics (Shulgin i col. 1986). L'MDMA és una substància liposoluble que té un pKa de 9.8, i per tant és una base dèbil.

salicilats, efedrina, dextrometorfà, etc. El consum és de un cop cada 1-2 setmanes, i la mitjana és de 2.8 pastilles per sessió.

Farmacodinàmica

L'MDMA és un potent agent serotoninèrgic (Rothman i col., 2001), interacciona amb els transportadors que alliberen i recapten neurotransmissors, com la serotonina, en el sistema nerviós central, encara que també interacciona amb més baixa afinitat amb el transportador de noradrenalina i dopamina. Alhora inhibeix l'enzim de degradació de neurotransmissors monoamino oxidasa A i B. També inhibeix l'enzim tirosina hidroxilasa, enzim limitador de la síntesi de serotonina. Els seus efectes simpaticomimètics són més dèbils que els de la METH i l'amfetamina a dosis baixes.

Farmacocinètica

Un 35% del seu metabolisme és hepàtic subjecte al polimorfisme genètic del citocrom CYP2D6 (90% expressió del fenotip de ràpid metabolitzador en caucàsics). Un 65% és eliminat via renal. La vida mitjana és de 7-9 hores. El metabòlit actiu és 3,4-metilendioxiampfetamina. L'efecte psicoestimulant es dona als 30-60 minuts, amb una durada de 3.5 hores.

Efectes desitjats

Provoca eufòria, pau interna, facilita les relacions socials, incrementa el desig sexual, incrementa la sensibilitat sensorial, sobretot visual i tàctil, i, en alguns casos de dosis altes, pot provocar al·lucinacions.

Manifestacions clíniques

Psicosi, atacs de pànic, ansietat, insomni, bruxisme, hipertèrmia que pot donar lloc a una fallada multiorgànica, atàxia, confusió, hiponatrèmia (SIADH) que pot donar lloc a un edema cerebral, hepatitis, rigidesa muscular, rabdomiòlisi, coagulació intravascular disseminada (DIC), fallo renal, hipotensió, síndrome serotoninèrgic i problemes de l'estat d'ànim i pèrdua de memòria. Provoca tolerància a llarg termini amb un increment de la dosi progressiu (de 0.5 fins 3 pastilles per sessió), però no és una substància altament adictiva.

Mecanisme d'acció

L'MDMA afecta al SNC i perifèric, actuant principalment sobre el sistema serotoninèrgic. S'han descrit les seves propietats simpaticomimètiques i de modulació del sistema psicomotor i endocrí. Actua com a simpaticomimètic indirecte del receptor adrenèrgic α_2 , del receptor serotoninèrgic 5-HT₂, del receptor muscarínic M-1 i del receptor d'histamina H-1. S'uneix també, amb menor afinitat, als receptors de dopamina i noradrenalina, als receptors muscarínics i als α_1 -adrenoreceptors.

Estudis neuroquímics *in vitro* en animals de laboratori revelen que l'MDMA bloqueja la recaptació de serotonina i produeix l'alliberació massiva de serotonina de les vesícules presinàptiques (Schmidt i col., 1987), seguida d'una disminució ràpida dels nivells de 5-HT, d'àcid 5-hidroindolacètic (5-HIAA) i de l'activitat de la triptòfan hidroxilasa (TPH). Les principals vies serotoninèrgiques afectades per l'MDMA són les presents a l'escorça frontal, les de l'hipocamp i les àrees del sistema límbic com l'amígdala.

A més també s'ha observat que provoca una alliberació de dopamina (McKenna i col., 1991; Crespi i col., 1997) dosi-dependent a l'estriat, nucli acumbents, caudat i hipocamp. Aquest mecanisme d'acció explicaria els seus efectes psicoestimulants i part dels seus efectes neurotòxics. Tots aquests efectes impliquen canvis fisiològics com són: hipertèrmia, hiperactivitat i, la síndrome serotoninèrgica conductual caracteritzada per hiperactivitat del sistema locomotor, estirament de les extremitats, moviment de cap repetitiu, piloerecció, proptosi, atàxia i portat a l'extrem, convulsions i mort (Green i col. 1995).

L'experimentació en rates posa de manifest l'efecte neurotòxic de l'MDMA sobre el sistema serotoninèrgic. En canvi, en ratolins, es veu més afectat el sistema nigroestriatal dopaminèrgic (Frith i col., 1987; Battaglia i col., 1988; Malpass i col., 1999). En rates, l'administració de l'MDMA produeix una reducció dels marcadors serotoninèrgics consistent en: disminució dels nivells de 5-HT i del seu metabòlit principal (5-HIAA), del transportador i de l'enzim limitant de la seva síntesi (TPH). Aquests efectes es produeixen en l'escorça, l'estriat i en l'hipocamp. En preparacions sinaptosomals d'estriat de rata, l'MDMA també és capaç de provocar canvis en el

transportador de dopamina que condueixen a una disminució de la seva funcionalitat (Metzger i col., 1998).

Pel que fa als ratolins, l'MDMA es comporta com una neurotoxina selectiva del sistema dopaminèrgic. La seva administració provoca una reducció considerable de les concentracions de dopamina (DA) a l'estriat (Stone i col., 1987; O'Shea i col., 2001). Aquesta pèrdua reflexa una degeneració neurotòxica dels terminals nerviosos dopaminèrgics similar a la que produeix la metamfetamina tant en rates com en ratolins.

Tant en el cas de rates com en ratolins, l'MDMA provoca la peroxidació dels lípids que dona lloc a la producció de ROS (Colado i col., 1997).

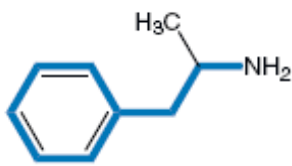
2. LA METAMFETAMINA (METH)

Origen

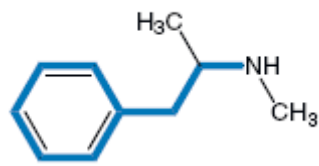
L'Efedrina és un alcaloid que va ser aïllat i caracteritzat per primera vegada l'any 1885 pel químic japonès Nagayoshi Nagai. L'any 1920 es va comercialitzar pel seu ús clínic pel tractament de l'asma (Lee, 2011). El 1983 Nagai va sintetitzar la Metamfetamina a partir de la efedrina. Posteriorment, l'any 1919, el químic japonès Akira Ogata va cristal·litzar la metamfetamina que ser amplament consumida els anys 1940 durant la Segona guerra Mundial on els militars dels exèrcits de Alemanya, França, Amèrica i Japó la consumien per a millorar l'alerta i superar la fatiga de la lluita. L'any 1971, la METH va ser classificada com a substància adictiva.

Estructura i característiques químiques

L'addició d'un grup metil en l'àtom de nitrogen de l'amfetamina dona lloc a la metamfetamina.

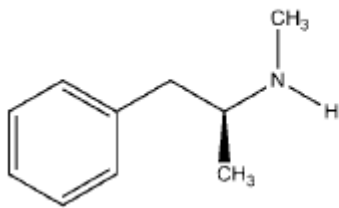


Amfetamina

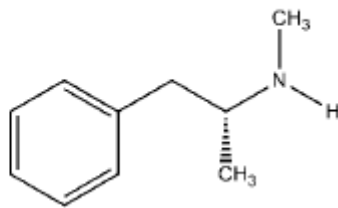


metamfetamina

El clorhidrat de metamfetamina és un pols blanc que pot trobar-se en forma de pols o en comprimits o càpsules de 10 a 15 mg. Es pot administrar via oral o nasal, però també per via intravenosa, dissolta en aigua destil·lada seguint el mateix procediment que la heroïna. La metamfetamina base, en canvi, forma cristalls amb l'aspecte de cubs de gel (ice). S'administra per via inhalatòria, els cristalls es calenten i es fuma en pipes de manera anàloga al crack.



S-(+)-metamfetamina



R-(-)-metamfetamina

L'isòmer S-(+)-METH és biològicament més actiu que l'isòmer R-(-)-METH (Sulzer i col., 2005).

Nom	Metamfetamina
Nom químic	(S)-N,a-Dimetilbenzè-etanamina; d-N-metilamfetamina
Noms químics alternatius	d-deoxiefedrina; d-disoxiefedrina; 1-fenil-2-metilaminopropà; d-fenilisopropilmetil-amina
Fórmula química	C10H15N
Pes molecular	149.24

Propietats farmacològiques

Farmacodinàmica

Presenta acció simpaticomimètica. És el derivat amfetamínic que provoca el més potent efecte cardiovascular. A nivell del sistema nerviós central, els efectes de la METH són més potents que els de l'amfetamina. La METH té afinitat per el transportador de dopamina (DAT), el de serotonina (SERT), el de noradrenalina (NET) i el transportador vesicular de monoamines tipus 2 (VMAT-2).

Farmacocinètica

El volum de distribució és de 3-7 L/Kg. El metabolisme és hepàtic. Un 40-50% d'eliminació és renal. La vida mitja és de 8-12 hores. Els metabòlits actius són l'amfetamina i la norefedrina. L'efecte màxim s'aconsegueix als 15 minuts en el cas d'administració intravenosa, fumada i intranasal i a les 3 hores en el cas d'administració oral, i la duració dels efectes després d'una dosi moderada de 5 a 30 mg és de 8 hores. Les dosis baixes van dels 5 als 10 mg, les mitjanes de 20 a 40 mg, i les altes de 50 a 90 mg. Dosis majors poden resultar letals entre consumidors sense tolerància.

Efectes desitjats

Eufòria, increment de l'energia, disminució de l'ansietat i estat d'ànim positiu, concentració, desinhibició i desig sexual, disminució de la gana, acceleració del pols, pressió elevada, increment de la temperatura i dilatació de les pupil·les.

Associació clínica

Bruxisme, agitació, paranoia, comportament violent, activitat sexual desmesurada, taquicàrdia, dispnea, i en casos extrems de sobredosi, alteració de l'estat mental amb intent de suïcidi i psicosi aguda, i fallida cardíaca, renal i hepàtica. Provoca pèrdua de memòria i disminució de l'atenció. Alhora, la pèrdua d'aigua i electròlits per la sudoració per contrarestar l'hipertèrmia, acompanyada d'un consum excessiu d'aigua, pot comportar un desequilibri hidroelectrolític que porti a una fallida multiorgànica i a la mort. És difícil determinar les dosis tòxiques que produeixen

aquests efectes, ja que es desenvolupa tolerància a aquests. En el tractament de la intoxicació aguda per metamfetamina, al ser una base feble, s'acidifica l'orina amb clorur d'amoni per a facilitar-ne la eliminació. Per als casos de gran estimulació central, s'utilitzen fàrmacs sedants. La METH és adictiva i provoca la síndrome d'abstinència amb depressió i intent de suïcidi en usuaris habituals que la deixen de consumir.

Mecanisme d'acció

La metamfetamina pot entrar en el terminal nerviós a través del transportador de dopamina (DAT), encara que molts autors estableixen que la entrada també es pot donar per difusió passiva degut a la seva liposolubilitat.

A una dosi baixa i en els primers moments hi ha una reversió ràpida del DAT, alliberant DA a la sinapsi de forma massiva (Haughey i col., 2000; Sandoval i col., 2001). Aquesta DA prové de dipòsits citoplasmàtics, ja que en el interior del terminal, la metamfetamina (substància bàsica) queda atrapada, alterant el pH basal del terminal. És això el que provoca l'alliberament de la DA de dipòsits citoplasmàtics vesiculars que consegüentment s'alliberarà a l'exterior per reversió del funcionament de DAT. Després d'una exposició més continuada a la metamfetamina, es bloqueja el DAT, que no permet ni l'entrada ni la sortida de DA i per tant, la DA intracel·lular s'acumula (Leviel, 2001). Aquesta DA queda desprotegida al citosol i pot patir reaccions químiques que comportaran la generació d'espècies reactives d'oxigen.

A dosis més altes, la metamfetamina facilita la transmissió dopaminèrgica i apareix un comportament estereotipat (realització repetida de determinades accions sense cap finalitat concreta) que es correlaciona amb un gran alliberament de dopamina en l'estriat.

3. NEUROTOXICITAT DE LES AMFETAMINES

L'exposició a METH i MDMA provoca en un primer moment uns efectes a curt termini que tenen repercussió en el temps induint uns efectes a llarg termini.

Els efectes a curt termini són els següents:

- Increment de DA i 5-HT extracel·lular i intracel·lular.
- Increment de Glutamat extracel·lular
- Hipertèrmia

Els efectes a llarg termini són els següents:

- Estrés oxidatiu
- Excitotoxicitat
- Disfunció mitocondrial

Amfetamines, DAT, SERT i VMAT

Com ja s'ha descrit anteriorment, els derivats amfetamínics són substrats pels transportadors neuronals encarregats de la recaptació de les amines biogèniques com la dopamina (DA), la norepinefrina (NE) i la serotonina (5-HT). Les amfetamines s'introdueixen per difusió passiva, degut a la seva liposolubilitat, dins el terminal neuronal o bé utilitzen el transportador, i subseqüentment reverteixen el transportador de manera que provoquen el transport revers de les monoamines que prèviament han desplaçat de les vesícules sinàptiques, del citosol a l'espai sinàptic. Aquest efecte agut de les amfetamines provoca finalment un increment en la neurotransmissió de DA, NE i 5-HT.

Estudis demostren que la METH afecta més intensament els terminals dopaminèrgics de l'estriat que del nucli accumbens, el bulb olfatori, l'escorça frontal o l'hipocamp (Ricaurte i col., 1980).

La raó d'aquestes diferències podria estar relacionada amb les diferències en la densitat del DAT. En canvi, els terminals serotoninèrgics d'aquestes zones es troben d'igual manera afectats. L'MDMA és selectivament neurotòxic sobre els terminals serotoninèrgics de totes aquestes zones cerebrals en rates i primats no humans, però en el cas de ratolins, induïx dèficits de DA.

Una reducció de marcadors de DA, com el VMAT, i de 5-HT, com el SERT, ha estat observada en consumidors habituals de METH, i en el cas de consumidors de MDMA s'ha observat disminució de SERT (McCann i col., 2005).

Amfetamines i MAO

La MAO és l'enzim encarregat de l'oxidació de monoamines i de neurotransmissors monoaminèrgics (NT) com la serotonina, la dopamina i la noradrenalina. Es troba situada en la membrana externa del mitocondri. En el cervell de mamífer existeixen 2 subtipus de MAO: la MAO-A que es troba en neurones catecolaminèrgiques i la MAO-B situada en neurones serotoninèrgiques, en astròcits i en la glia (Shih i Thompson, 1999). La oxidació de NT per la MAO produeix H_2O_2 que pot ser convertit a un dels radicals d'oxigen més reactius, el $\cdot OH$. Està descrit que l'MDMA inhibeix la MAO induint un increment en la concentració sinàptica del NT. Alhora que l'MDMA inhibeix la MAO-A i provoca una alliberació massiva de DA, la DA és recaptada per el SERT de la neurona serotoninèrgica deplecionada de 5-HT, que serà oxidada per la MAO-B i contribuirà a la producció de ROS en el terminal serotoninèrgic (Sprague i Nichols, 1995). Articles recents del nostre grup (Chipana i col., 2008) en sinaptosomes d'estriat de ratolí demostren que concentracions baixes d'MDMA induïxen la producció de ROS, el qual podria ser conseqüència de la inhibició de la MAO-A però no la MAO-B, el qual dona lloc a oxidació de la DA i per tant increment en els ROS. L'exposició a dosis més elevades de la droga induïx una inhibició d'ambdós MAO.

En el cas de la METH, està descrit que la MAO-B participa en la neurotoxicitat induïda per aquesta droga en neurones dopaminèrgiques (Wei i col., 1997).

Amfetamines i hipertèrmia

La desregulació de la temperatura esdevé un factor important relacionat amb la resposta tòxica per METH i MDMA. El tractament amb aquestes drogues provoca un increment de la temperatura d'1.5 °C. En treballs recents s'ha observat que inhibint l'increment de temperatura induït per METH s'aconsegueix inhibir l'efecte oxidatiu d'aquesta substància. Mantenir els animals tractats amb la droga a baixa temperatura bloqueja l'oxidació de DA i, per tant, la producció d'espècies reactives d'oxigen, i a la vegada disminueix la captació de METH pel DAT potenciada per l'elevada temperatura, efectes que caracteritzen la neurotoxicitat d'aquesta substància.

L'increment de la temperatura es dona per l'activació dels receptors de dopamina D1 i D2. Tan en el cas de la METH com l'MDMA, l'alliberació massiva de DA provoca l'activació d'aquests receptors i per tant l'hipertèrmia. Animals tractats amb antagonistes d'aquests receptors no presenten una pujada tan elevada de la temperatura després del tractament amb les drogues (Cole i Sumnall, 2003; Krasnova i Cadet, 2009).

Un altre mecanisme pel qual la METH provoca hipertèrmia és l'increment de la interleucina-1 β en d'hipotàlem (Bowyer i col., 1994). Aquesta molècula és un pirogen endogen i s'ha observat tan en rates com en ratolins l'increment de mRNA d'interleucina-1 β en d'hipotàlem. Alhora, la proteïna mitocondrial UCP-3 del múscul esquelètic podria estar implicada en la termoregulació, ja que animals deficients en aquesta proteïna i tractats amb METH no presenten resposta tèrmica (Sprague i col., 2004). L'alliberació de acetilcolina per METH també està implicada en la termoregulació (Crawshaw, 1973).

En el cas del tractament amb MDMA, l'hipertèrmia pot potenciar la depleció de glutatió induïda per aquesta substància incrementant el risc d'exposició hepàtica a prooxidants (Carvalho i col., 2001).

Recentment també s'ha associat la hipertèrmia amb el trencament de la barrera hematoencefàlica i l'increment de permeabilitat d'aquesta (Bowyer i Ali, 2006;

Kiyatkin i Sharma, 2009). El tractament amb METH o MDMA induïx una degeneració de les cèl·lules endotelials del plexe coroide, element crític de la barrera hematoencefàlica en ratolins i rates.

Producció d'espècies reactives d'oxigen induïda per amfetamines

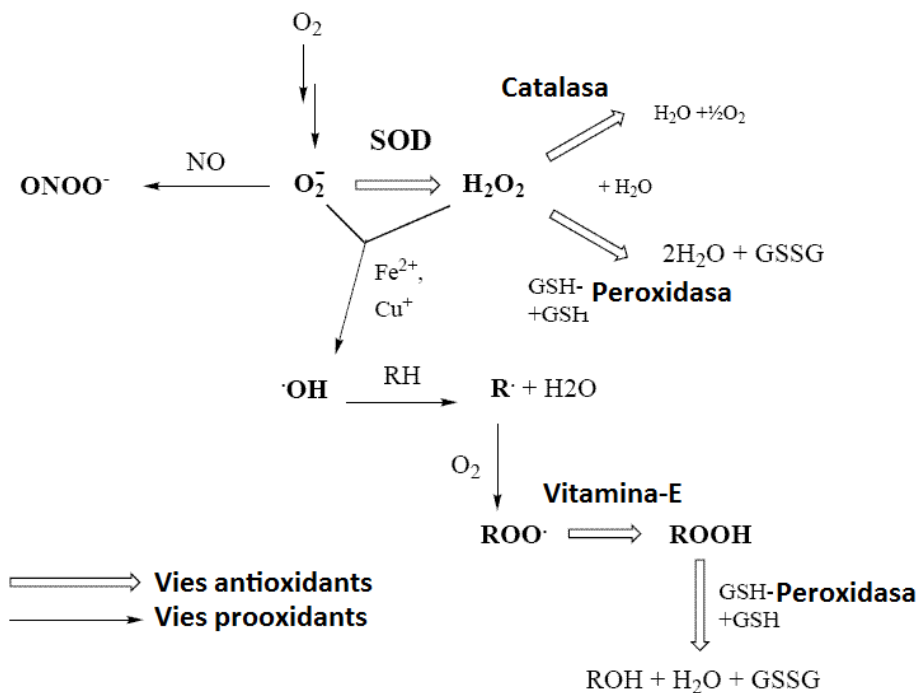
L'estrès oxidatiu és el resultat del desequilibri entre la producció d'espècies reactives d'oxigen i la defensa de la cèl·lula contra ells. Estudis en humans i en models experimentals demostren que l'estrès oxidatiu és una de les principals causes de degeneració neuronal en malalties com el Parkinson, l'Alzheimer o l'Esclerosi lateral amiotròfica, i en addicions a drogues d'abús com la metamfetamina o l'MDMA (Cadet i col., 2007; Fleckenstein i col., 2007; Yamamoto i Raudensky, 2008).

El metabolisme oxidatiu del mitocondri, l'òxid nítric, els metabolisme dels fosfolípids i les vies proteolítiques són les principals vies de producció d'espècies reactives d'oxigen. L'alteració dels sistemes de defensa en front d'aquests afavoreix aquestes vies. Conseqüentment, aquesta producció d'espècies reactives d'oxigen produirà dany cel·lular alterant lípids, proteïnes i ADN, induint a la cèl·lula necrosi o apoptosi.

Per tant, definir les vies de producció d'espècies reactives d'oxigen i els sistemes de defensa cel·lulars, pot esdevenir una diana farmacològica important per a evitar la degeneració neuronal. Els tipus principals d'espècies reactives d'oxigen són:

- L'anió superòxid (O_2^-).
- El peròxid d'hidrogen (H_2O_2).
- El radical hidroxil ($\cdot OH$).
- Peroxinitrit ($ONOO^-$).

El peròxid d'hidrogen no és estrictament un radical lliure d'oxigen, ja que no té un electró lliure, però es considera així per la capacitat de donar ions hidroxils.



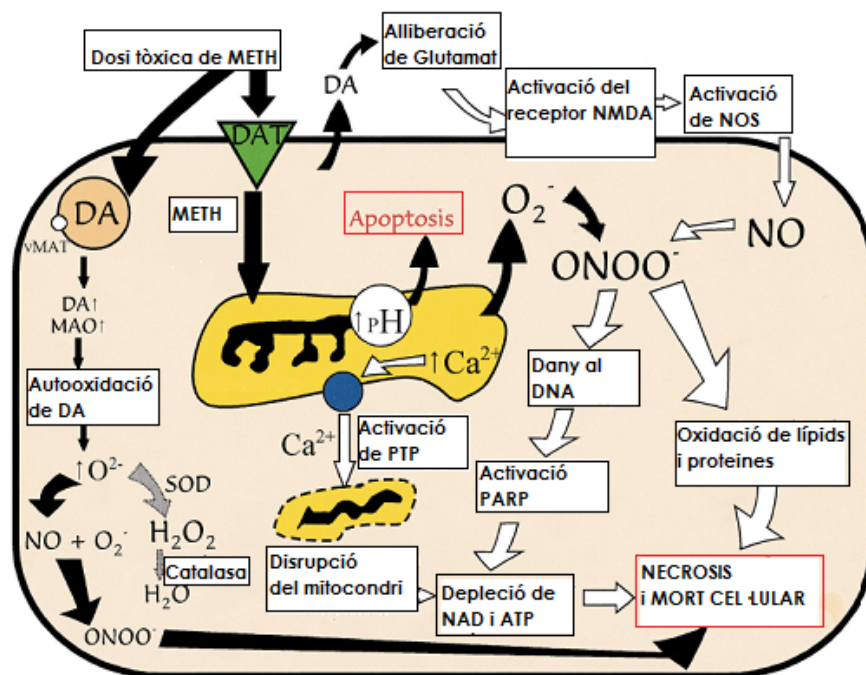
Les espècies reactives d'oxigen i el seu sistema de detoxificació. La inhibició de les vies antioxidants o la potenciació de les vies prooxidants dona lloc a l'estrès oxidatiu. SOD: Superòxid dismutasa; GSH: Glutatió peroxidasa.

Les espècies reactives d'oxigen, sobretot $\cdot OH$ i $ONOO^-$, produeixen alteracions funcionals en lípids, proteïnes i ADN.

L'oxidació i la peroxidació dels lípids produeix una progressiva pèrdua de la fluïdesa de la membrana produint així la reducció del potencial de membrana i incrementant la permeabilitat dels ions com el Ca^{2+} , que podrien activar enzims dependents Ca^{2+} com l'nNOS o la PLA_2 , que participarien en la producció de noves espècies reactives com l'NO i el superòxid. Nombrosos treballs apunten a que la neurotoxicitat de la metamfetamina ve donada per la producció d'espècies reactives d'oxigen. En treballs realitzats pel grup de Yamamoto i Zhu (1998) es mesura la peroxidació dels lípids en estriat de rata després del tractament amb METH. El malonildialdeid és producte d'aquesta peroxidació i la seva producció i, conseqüentment el dany en els terminals dopaminèrgics, es veu atenuada mitjançant una sèrie d'antioxidants com la desferoxamina, quelant de ferro, involucrant al ferro en els processos oxidatius. La METH també provoca la sobreexpressió de l'nNOS en estriat i en hipocamp de ratolí (Deng i Cadet, 1999) ja que a la 1 i 24 hores de tractament amb METH es veu un augment en la producció de NO. Aquest NO pot patir

oxidació i donar lloc al radical molt més llesiu peroxinitrit (ONOO^-) (Demiyurek i col., 1998). Tant la METH com l'MDMA donen lloc a un augment molt significatiu de l'activitat dels enzims antioxidants com la superòxid dismutasa (SOD), això fa pensar que la ràpida i massiva producció de ROS per part dels derivats amfetamínicos produeix un estrés oxidatiu que condueix a l'increment d'activitat d'aquests enzims.

Cadet i col. (1995) comparen, el tractament amb METH en l'estriat de ratolins control i en ratolins transgènics que expressen el gen CuZnSOD humà. El resultat és la disminució de DA i de DOPAC en els terminals dopaminèrgics dels ratolins control i no observen dany en els terminals dels ratolins transgènics ja que la SOD permet la protecció en front dels radicals superòxid produïts per la METH. Per tant, amb aquesta sèrie d'experiments s'evidencia que la neurotoxicitat de la METH ve donada per la producció de ROS en neurones dopaminèrgiques.



Vies neurotòxiques de la Metamfetamina. La METH entra al terminal neuronal dopaminèrgic a través del DAT o per difusió passiva i indueix l'alliberació de la DA de les vesícules sinàptiques al citosol. Aquesta DA s'autooxida i es oxidada per la MAO donant lloc a l'espècie reactiva d'oxigen O_2^- . Aquest ROS reacciona amb el òxid nítric (NO) i forma peroxinitrit (ONOO^-), una espècie reactiva molt reactiva que pot induir la necrosi de la neurona. La METH desestabilitza la membrana mitocondrial i s'allibera calci al citosol. Alhora, s'activen vies mediades per glutamat. DA: dopamina; DAT: transportador de dopamina; METH: metamfetamina; MAO: monoamino oxidasa; PTP, Porus de permeabilitat transitòria; NOS: Òxid nítric sintasa; NMDA: N-metil-D-aspartat (Davidson i col., 2001).

Excitotoxicitat en els terminals dopaminèrgics i serotoninèrgics

En el procés d'excitotoxicitat té lloc l'alliberació massiva de glutamat, l'activació dels receptors de glutamat, increment en els nivells de calci intracel·lular, activació d'enzims calci-dependents, producció d'espècies reactives d'oxigen i òxid nítric, i activació de vies apoptòtiques que donen lloc a la degeneració d'òrgans cel·lulars com són el mitocondri i el reticle endoplasmàtic, i el dany a proteïnes del citoesquelet i el DNA. L'excitotoxicitat juga un paper important en el dany de les neurones dopaminèrgiques i serotoninèrgiques del estriat i està implicada en el dany a llarg termini del estriat com a resultat de l'exposició a METH (Staszewsky i Yamamoto, 2006). El tractament amb dosis altes de METH provoca alliberació de glutamat en l'estriat de rata (Nash i Yamamoto, 1992). Els agonistes dels receptors metabotrópic mGLUR5 i els inhibidors de l'NO sintasa atenuen la toxicitat de la METH en els terminals dopaminèrgics. Alhora, aquestes dosis altes de METH provoquen un increment en els nivells de NO i la fragmentació de proteïnes del citoesquelet com l'espectrina i la proteïna tau en estriat i escorça de rata. En el cas de l'MDMA la excitotoxicitat és un mecanisme de toxicitat més desconegut, però igual que passa amb la METH, la producció d'NO associada als terminals dopaminèrgics i serotoninèrgics esdevé el principal mecanisme d'excitotoxicitat.

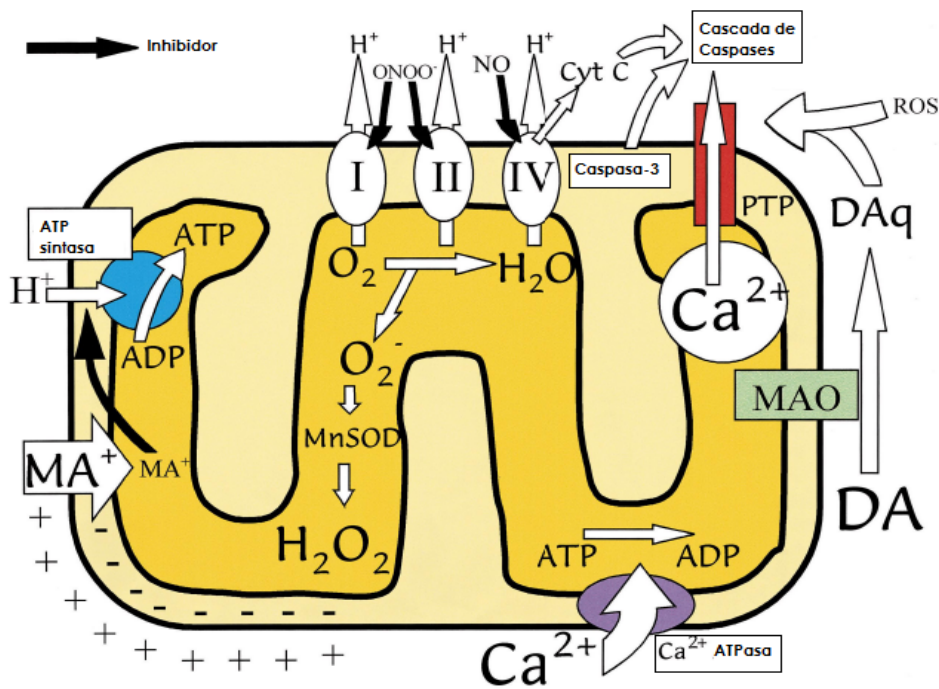
Alteració de la funció mitocondrial i del reticle endoplasmàtic

El mitocondri és l'òrganul cel·lular més sensible, és a dir, en el cas d'una lesió cel·lular és el primer que en resulta afectat.

Una dosi tòxica de METH dona lloc a la inhibició dels complexos de la cadena de transport d'electrons, el complex I, II-III, i el complex IV, tan en l'estriat com en les àrees cerebrals que contenen neurones dopaminèrgiques. En el cas de l'MDMA, dosis altes provoquen la disminució del complex mitocondrial I-II en estriat de rata i el complex IV en estriat de rata, nucli accumbens i substància negra (Burrows i col., 2000). Alhora, l'MDMA indueix estrès oxidatiu en el mitocondri i deleccions en l'ADN que codifica pel complex I i IV de les diferents zones cerebrals. El mecanisme pel qual els derivats amfetamínicos provoquen la inhibició dels complexos mitocondrials no està

clara, però hi estan implicats tant la producció d'espècies reactives d'oxigen com l'increment de calci intracel·lular. La METH indueix disfunció del reticle endoplasmàtic provocant una ràpida activació d'enzims calci dependents com la calpaina i les caspases (9, 3), així com l'increment en l'expressió de GRP78, BiP i CHOP indicatives de disfunció del reticle. Alhora la METH provoca l'alliberació de citocrom C, smac/DIABLO i factor induït per apoptosi (AIF) del mitocondri al citosol, resultat del dany mitocondrial (Cregan i col., 2002; Jayanthi i col., 2004).

La convergència de l'alliberació de glutamat i l'activació de vies apoptòtiques dependents i independents de calci que impliquen el mitocondri i el reticle endoplasmàtic esdevenen clau en la inducció de la degeneració per METH de les neurones estriatals.



Efecte de la Metamfetamina en el mitocondri. La METH entra en el mitocondri i incrementa el pH de la matriu mitocondrial. Aquesta variació de pH redueix l'activitat de l'ATP-sintasa. Alhora, es redueix la capacitat per mantenir el potencial de membrana. La METH bloqueja la bomba de protons i provoca l'alliberació de la DA i el conseqüent increment de quinones derivades de la DA que indueixen l'obertura del PTP. L'alliberació de glutamat per la METH provoca l'activació dels receptors NMDA i dona lloc a l'increment de NO el qual inhibeix el complex IV mitocondrial i activa la cascada apoptòtica de les caspases. El NO i el O_2^- donen lloc al peroxinitrit que inhibeix el complex mitocondrial I i II. PTP: Porus de permeabilitat transitòria; MAO: Monoamino oxidasa; MA: Metamfetamina; DAq: Dopamina-O-quinona; ROS: Espècies reactives d'oxigen; Cyt C: Citocrom c (Davidson i col., 2001).

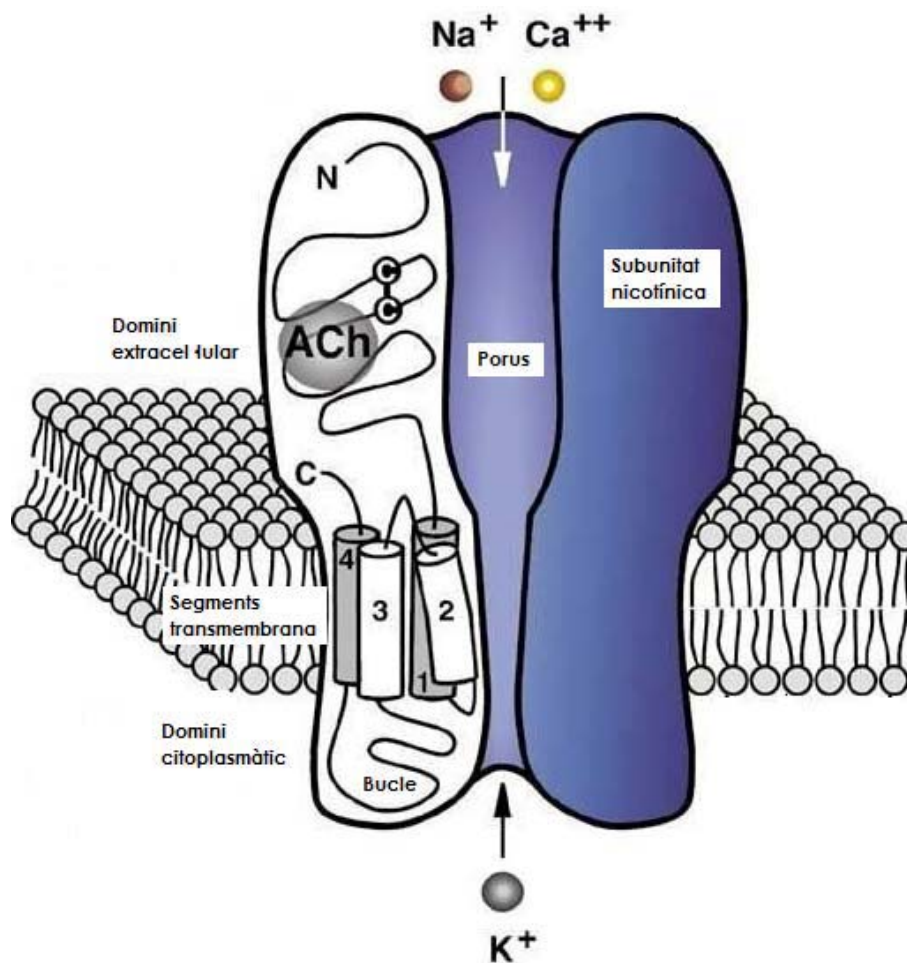
Amfetamines i inflamació

La microglia són les cèl·lules del sistema immunitari del sistema nerviós central. Com a resposta de dany cerebral o d'inflamació, les cèl·lules de la microglia incrementen la seva mida, migren cap al lloc on s'ha produït el dany i fagociten les cèl·lules danyades. La seva activació és una defensa per a la supervivència neuronal, però la seva sobreactivació pot esdevenir neurotòxica i donar lloc a malalties neurodegeneratives com són l'Alzheimer, el Parkinson, Huntington o efectes secundaris relacionats amb la SIDA.

Tant la METH com l'MDMA indueixen inflamació, i per tant, l'activació de la microglia, en les zones cerebrals que contenen terminals DA i 5-H, en estriat de ratolí i de rata (Pubill i col., 2004) i en hipocamp. També ha estat detectada activació de la microglia en cervells d'humans consumidors de METH i en primats no humans als quals se'ls ha administrat la droga. Ambdós derivats amfetamínics provoquen l'alliberació massiva de glutamat que estimula els receptors de glutamat provocant una activació de la microglia. L'activació dels receptors de glutamat indueix la producció de citocines inflamatores com són la interleucina-1 β , el factor de necrosis tumoral α i la interleucina 6 (Goncalves i col., 2008). Alhora, les citocines provoquen un increment dels nivells de glutamat per inhibició de la recaptació de glutamat, cicle que promourà la neurotoxicitat. Per altra banda, les quinones de DA són activadors molt potents de la microglia, però l'activació és independent de la formació de espècies reactives d'oxigen (Khun i col., 2006).

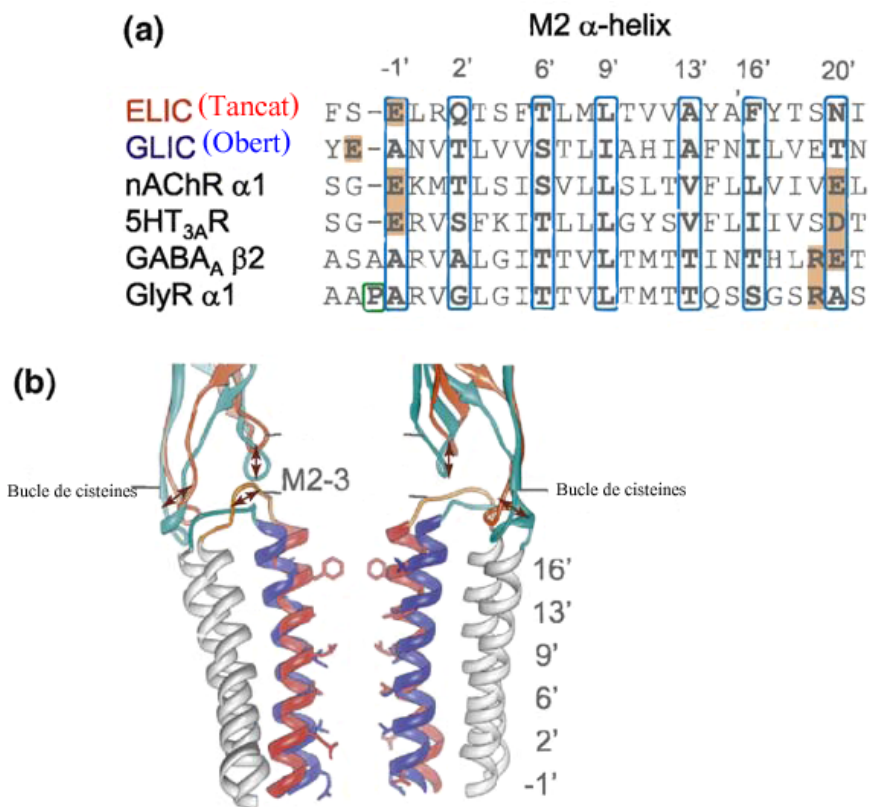
4. ELS RECEPTORS NICOTÍNICS

El receptor nicotínic neuronal (nAChR) és una proteïna de membrana amb una massa molecular de $\approx 290\text{kDa}$, formada per 5 subunitats disposades simètricament formant un canal iònic central. En els mamífers existeixen diferents tipus de nAChRs que es diferencien per la seva composició de subunitats i la seva localització.



Esquema de l'estructura del receptor nicotínic (Llibre Lippincott Williams & Wilkins, 2007).

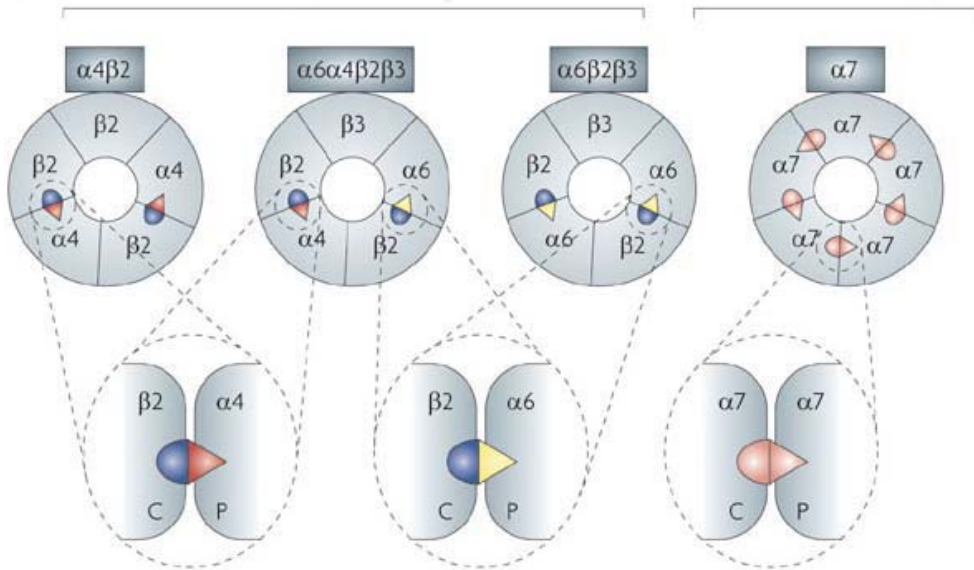
Formen part de la superfamília de receptors lligats a canals iònics coneguda com família Cys-Loop, donat que totes les subunitats dels receptors d'aquesta família contenen, en l'extrem aminoterminal, un bucle unit per 2 cisteïnes, separades per 13 residus, formant un pont disulfur. A aquesta família també pertanyen el receptor de serotonina tipus 3 (5-HT_3), el receptor γ -aminobutíric tipus A (GABA_A) i el receptor de glicina.



Estructura del canal iònic de la Família Cys-loop. (a) Alineament de la seqüència d'aminoàcids del segment transmembrana M2 dels diferents receptors de la família. Aminoàcids que es troben en el lumen del canal (blau), els aminoàcids carregats (taronja) i les prolines i glicines importants (verd). (b) Comparació d'una estructura amb el porus obert (blau) i una amb el porus tancat (vermell) d'un homòleg bacterià de la família Cys-Loop. S'observa el desplaçament del bucles β 1- β 2 i M2-M3. (Review Miller i Smart, 2010)

Estructura

Les subunitats dels receptor nicotínic estan codificades per 17 gens; d'aquests s'expressen en el cervell dels vertebrats 9 subunitats α (α 2- α 10) i 3 subunitats β (β 2- β 4). La combinació de les diferents subunitats dona lloc a propietats cinètiques i farmacològiques diferents. Les subunitats α 7, α 8 i α 9 formen homopentàmers funcionals a diferència de les subunitats α 2- α 6 que necessiten associar-se a una subunitat β .



Diferents subtipus de nAChR neuronals i els llocs d'unió dels lligands. La variabilitat en l'efecte farmacològic sobre els nAChR depèn de la combinació de les subunitats. Els triangles representen el lloc principal (P) d'unió del lligand i els semicercles el lloc complementari (C). (Gotti i col., 2006).

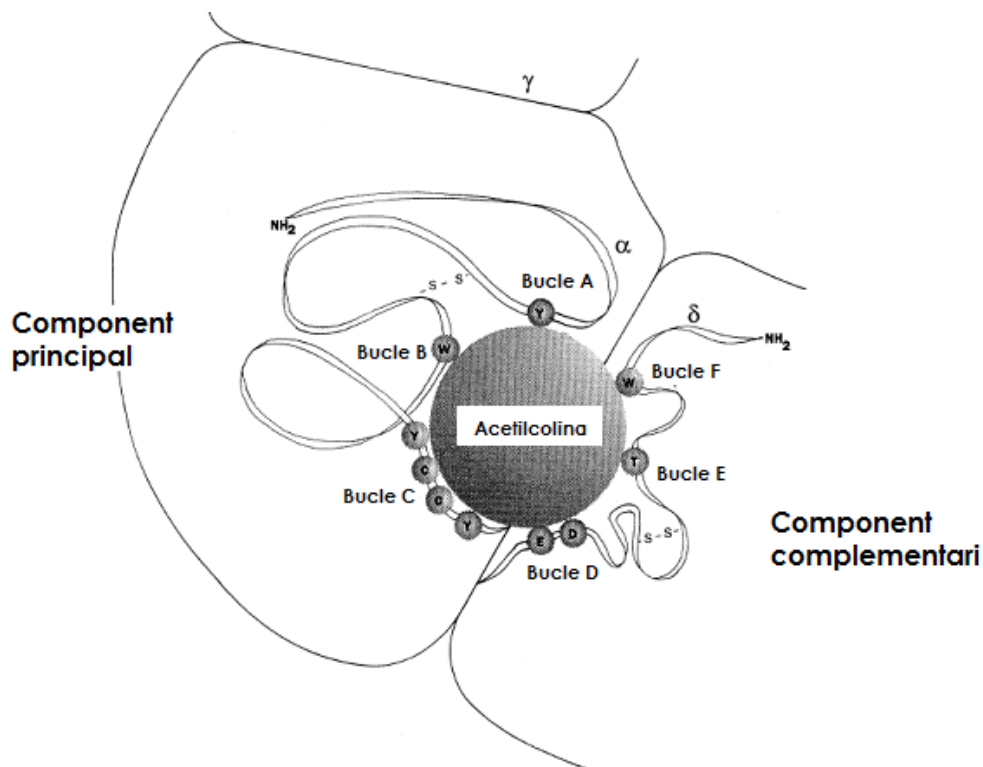
L'estructura atòmica del nAChR ha estat ben caracteritzada (Unwin, 2005; codi PDB: 2BG9). Cada subunitat està formada per un domini extracel·lular amb un grup amino terminal (ECD), un domini transmembrana (TMD) format per 4 segments (TM1-TM4) i un domini citoplasmàtic variable.

Lloc d'unió dels lligands

Els llocs d'unió del nAChR es troben en la interfase entre una subunitat α i una subunitat no- α , excepte en el cas dels receptors nicotínics homomèrics com el nAChR $\alpha 7$. El nombre de llocs d'unió depèn de la composició del nAChR, desde 2, com en el cas del nAChR $2\alpha:1\beta:1\gamma:1\delta$, fins a 5, com en el homopentàmer $\alpha 7$.

Aquest lloc d'unió es troba en el ECD i està format per unes estructures anomenades bucles: A, B (component principal), D, E i F (component complementari) conformant una butxaca que es tanca mitjançant el bucle C. Els residus que conformen aquesta butxaca, i que es conserven en tots els subtipus de nAChR, són aminoàcids aromàtics: Y93 (bucle A), W149 i Y151 (bucle B), Y190 i Y198 (bucle C), W55 i W57 (bucle D), també el pont de cisteïnes (bucle C) en el cas de les subunitats α . Està

demostrat que aquest residus aminoacídics interaccionen amb el lligands nicotínic (Arias, 1997).

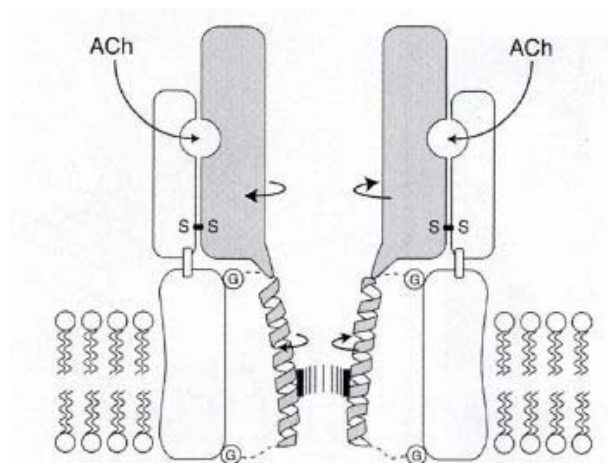
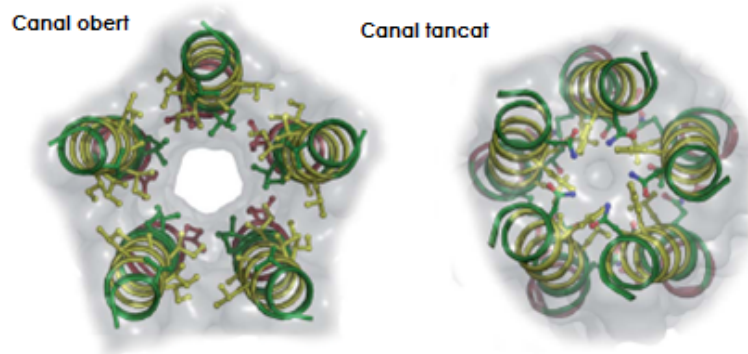


Model del lloc d'unió de l'acetilcolina al receptor nicotínic de *Torpedo Marmorata*. Els residus aminoacídics implicats en la unió pertanyen al component principal (subunitat α) i al component complementari (δ). Y: Tirosina; W: Triptòfan; C: Cisteïna; E: Àcid glutàmic; D: Àcid aspàrtic (Arias, 1997).

La cristal·lització i la determinació de l'estructura de l'AChBP (proteïna homomèrica soluble sobre la qual l'acetilcolina s'uneix de la mateixa manera que sobre el nAChR $\alpha 7$) del cargol *Lymnaea stagnalis* (Ihara i col., 2008; codi PDB: 2ZJU) del mol·lusc *Aplysia californica* (Celie i col., 2005; codi PDB: 2BR7) i del peix *Torpedo marmorata* (Unwin, 2005; codi PDB: 2BG9), ha permès determinar a nivell molecular el lloc d'unió del nAChR. Recentment la cristal·lització de receptors lligats a canals iònics procarïotes com el de *Erwinia chrysanthemi* (Hilf i Dutzler, 2008; codi PDB: 2VLO) i la conformació oberta del canal de *Gloeobacter violaceus* (Bocquet i col., 2009; codi PDB: 3EAM) ha permès conèixer més detalladament l'estructura del receptor.

Entrada de ions

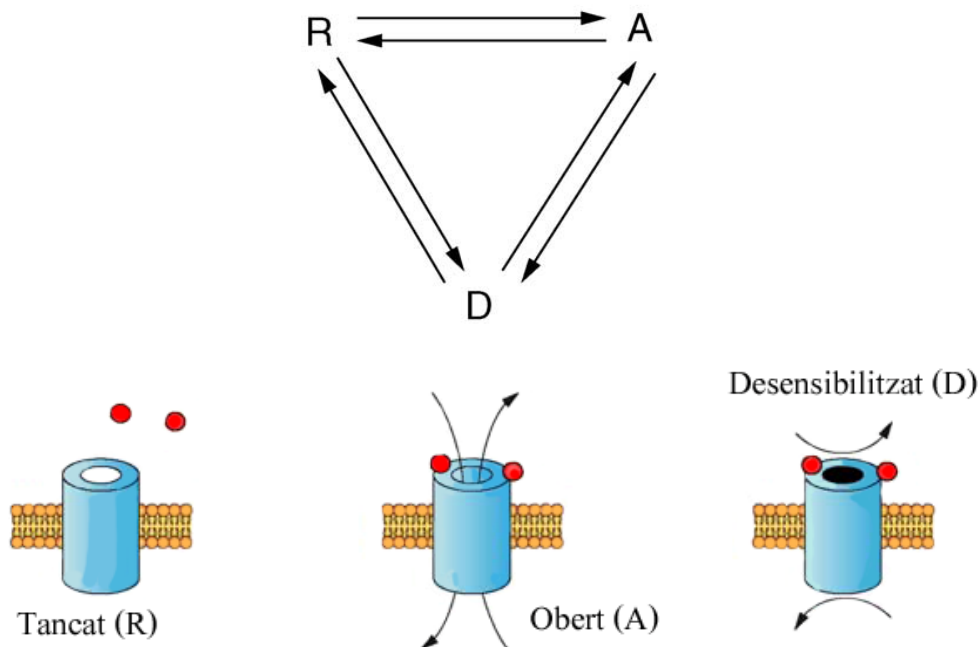
El porus del canal constitueix el filtre de selecció d'entrada dels ions a través del canal. L'activació del nAChR implica una reorganització estructural que modifica la conformació d'aquesta comporta provocant l'obertura del porus i la consegüent entrada de ions, monovalents com Na^+ i K^+ o divalents com Ca^{2+} . A la vegada modifica l'estructura de llocs d'unió per a possibles efectors al·lostèrics. La reorganització estructural ve donada per la rotació de 15° dels segments $\beta 1$ - $\beta 2$ units per un pont disulfur en el segment transmembrana TM2 de les subunitats α i l'obertura dels bucles d'aquests segment que permeten l'eixamplament del canal iònic i l'entrada d'ions (Miyazawa i col, 2003).



Model d'obertura del receptor nicotínic. L'Acetilcolina indueix la rotació de les hèlix del segment M2 disposant-les en una configuració permeable als ions. Les hèlix es poden moure ja que estan unides mitjançant bucles flexibles que contenen residus de glicina. Alhora, el pont disulfur del domini extracel·lular també està implicat (Miyazawa i col., 2003).

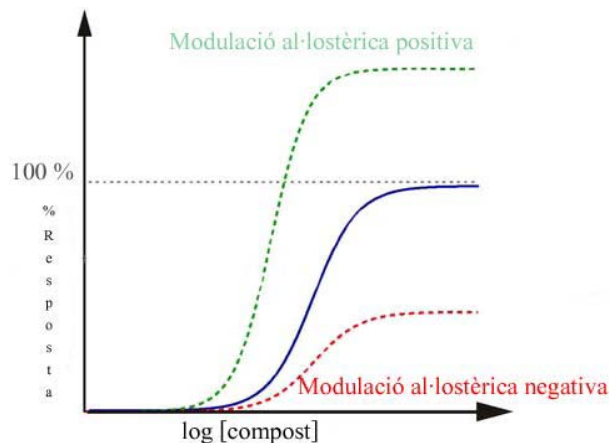
Estats del nAChR

El nAChR és un receptor oligomèric i al·lostèric, és a dir, conté diversos llocs d'unió per a agonistes, per antagonistes no competitius i una comporta que es modifica a conseqüència de canvis en l'estructura quaternària de la proteïna. Una teoria que descriu el seu comportament és el model Monod-Wyman-Changeux (MWC) o Teoria de la regulació al·lostèrica (Monod i col. 1965), en la qual es descriuen 3 estats dels receptors lligats a un canal iònic (LGICs) on s'inclou el receptor nicotínic: repòs R (canal tancat), actiu A (canal obert) i desensibilitzat D (canal tancat).



Model dels tres estats dels receptors lligats a un canal iònic (LGIC) segons Monod-Changeux-Wyman 1965: tancat, actiu (obert) i desensibilitzat (tancat) (Araud i col., 2010).

Recentment Changeux va refinar el model (Changeux i col. 2005) descrivint una sèrie de estats inactius intermitjos del receptor els quals expliquen la variable eficiència entre molècules. La unió d'agonistes afavoreix l'estat actiu del receptor, mentre que la unió de antagonistes competitius estabilitza l'estat desensibilitzat. Els agonistes parcials mostren una baixa eficiència en l'obertura del canal mentre que els moduladors al·lostèrics s'uneixen en llocs diferents de l'agonista influenciant la transició entre els diferents estats del receptor.



Representació esquemàtica de les corbes concentració-resposta que il·lustren l'efecte d'un lligand dels LGICs en presència d'un modulator al·lostèric positiu o negatiu (Araud i col., 2010).

Existeixen diverses hipòtesis sobre el nombre d'estats funcionals del nAChR. Per una banda, hi ha autors que descriuen 4 estats funcionals dels nAChR (Yamodo i col. 2010) mitjançant l'observació de diferències en el lumen del canal. Descriuen la Teoria de les 2 comportes demostrant que hi ha 2 comportes diferents que duen a terme la transició a receptor actiu i a receptor desensibilitzat. Els estats del receptor són: en repòs (comporta d'activació tancada-comporta de desensibilització oberta), actiu (les 2 comportes obertes), desensibilització ràpida (comporta d'activació oberta-comporta de desensibilització tancada) i desensibilització lenta (les 2 comportes tancades). El receptor en repòs és l'estat més estable en absència de l'agonista, i l'estat de desensibilització lenta és l'estat més estable en presència de l'agonista.

Per altra banda, hi ha autors que defensen la idea que només hi ha un estat de desensibilització i que la diferència entre desensibilització lenta i ràpida ve donada per el nombre de subunitats desensibilitzades (Prince i Sine, 1999).

Implicació dels nAChR en les vies de transducció de senyal neuronals

Mitjançant tècniques d'immunoprecipitació i immunopurificació s'han identificat quines subunitats nicotíniques es troben en les diferents zones del cervell de rata i ratolí. La majoria dels nAChR es troben a nivell presinàptic modulants l'alliberació de neurotransmissors, encara que també es poden trobar a nivell postsinàptic en el sistema somadendrític.

Els subtipus de nAChR més abundants en el sistema nerviós mamífer són el nAChR homomèric $\alpha 7$ i els nAChR heteromèrics que solament contenen un subtipus de subunitat α i un de β . El nAChR $\alpha 4\beta 2$ representa un 90% dels receptors d'alta afinitat en el cervell a diferència del nAChR $\alpha 3\beta 4$ que predomina en la medul·la adrenal i els ganglis del sistema nerviós autònom, així com en nuclis de neurones de la habènula medial, el nucli interpeduncular, la medul·la dorsal, la glàndula pineal i la retina, encara que en aquests casos el nAChR $\alpha 3\beta 4$ es troba associat a d'altres subunitats (Gotti i col., 2009).

Els nAChR es troben en diferents vies del sistema nerviós com són la via mesoestriatal dopaminèrgica i la via habènulo-interpeduncular. La via mesoestriatal dopaminèrgica està subdividida en dos components principals:

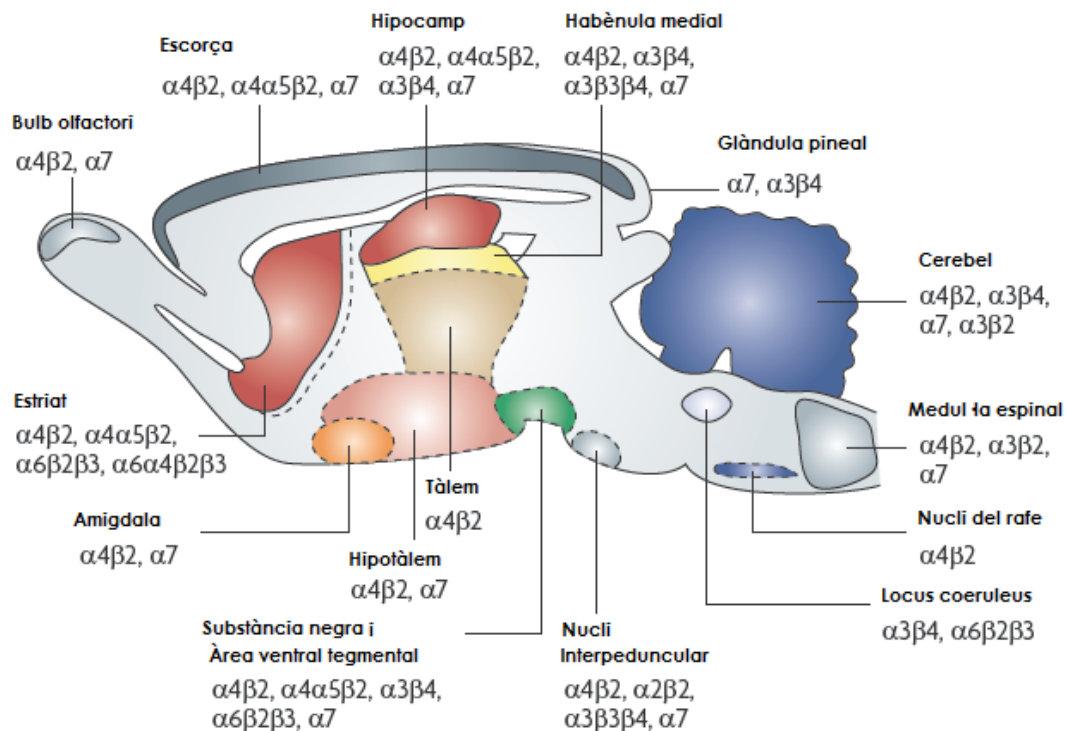
- 1- La via ventral mesolímbica amb cossos cel·lulars en l'àrea ventral tegmental (VTA) i terminals en el nucli accumbens (nAc) i el tubercle olfatori (TO).
- 2- La via dorsal nigroestriatal amb cossos cel·lulars en la substància negra (SN) i terminals en el caudat-putamen (Cpu).

Els nAChR que es troben en les neurones dopaminèrgiques de la via mesoestriatal dopaminèrgica tenen un paper important en el control de la locomoció i el desenvolupament de adaptacions a llarg plaç associades al consum de nicotina. Estudis de comportament amb ratolins amb deleció genètica de la subunitat $\beta 2$ han demostrat que els nAChR localitzats en les neurones dopaminèrgiques de la VTA són necessaris pels efectes de recompensa induïts per la nicotina, ja que l'activació d'aquests en la VTA provoca una alliberació de dopamina en el nAc.

En la via habènulo-interpeduncular (Bh-IPn) s'expressen majoritàriament les subunitats $\beta 2$, $\alpha 4$ i $\alpha 6$. L'Habènula és una estructura que rep senyals provinents del sistema límbic i comunica amb el nucli interpeduncular (IPn) mitjançant el fascicle retroflex. Aquesta via està implicada en el processos de recompensa, aprenentatge i memòria, estrés, son i ingesta. En l'habènula es troben els nAChR $\alpha 4\beta 2$ i $\alpha 3\beta 2$, i en el nucli interpeduncular $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ i $\alpha 3\beta 2$, però també hi trobem, en alguns casos, la subunitat $\beta 3$ associada.

Experiments en sinaptosomes d'habènula han demostrat que solament els receptors que contenen la subunitat $\beta 2$ són funcionals a nivell presinàptic mitjançant l'alliberació de neurotransmissors dels terminals dopaminèrgics, gabaèrgics i noradrenèrgics que es troben en el nucli interpeduncular.

Els receptors nicotínics $\alpha 7$ es troben en gran nombre en l'escorça, hipocamp i el sistema límbic de la regió subcortical, i en uns nivells inferiors, en el tàlem i els ganglis basals. Estan situats a nivell presinàptic participant en l'alliberació de glutamat en l'hipocamp i la VTA, en l'alliberació d'àcid excitatori en l'escorça prefrontal, indirectament en l'alliberament de dopamina de l'estriat a l'escorça prefrontal i noradrenalina del hipocamp; com també a nivell postsinàptic mitjançant l'entrada de calci al citosol activant processos de transducció de senyal calci dependents.

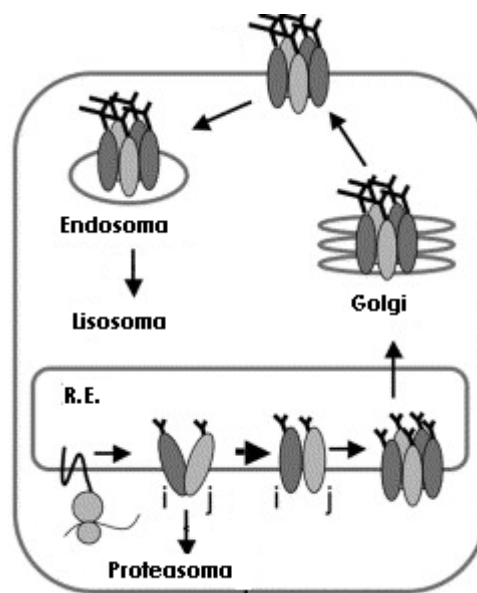


Esquema de la distribució dels diferents subtipus de nAChR en el cervell murí. (Gotti i col., 2006)

Expressió i regulació dels nAChR

Cada subunitat nicotínica és sintetitzada per polisomes localitzats en la membrana i glicosilat amb manosa. En el reticle endoplasmàtic, les subunitats són ensamblades en forma receptors pentamèrics; els encarregats del correcte

ensamblament són les xaperones. Solament els receptors ensamblats correctament seran transportats del reticle endoplasmàtic a l'aparell de Golgi. L'expressió de una sèrie de residus hidrofòbics en el domini citoplasmàtic determina la selecció dels receptors (Ren i col., 2005). En l'aparell de Golgi, els sucres són processats esdevenint carbohidrats complexos abans d'assolir la membrana. Alhora, es manté l'equilibri de receptors en la membrana ja que la síntesi és contrarestada per la internalització dels receptors de la membrana en endosomes o lisosomes i la seva degradació (Gaimarri i col., 2007).



Esquema de la regulació dels nAChR en la cèl·lula. En el reticle endoplasmàtic (RE) les subunitats del receptor són sintetitzades i ensamblades en receptors pentamèrics. Les subunitats que no han estat ben plegades són degradades pel proteasoma. En l'aparell de Golgi els sucres dels receptors són processats, i a continuació els receptors pentamèrics són transportats a la membrana. En el moment del seu reciclatge, els receptors de membrana són internalitzats pels endosomes i processats pels lisosomes (Corringer i col., 2006).

Regulació a l'alça dels nAChR

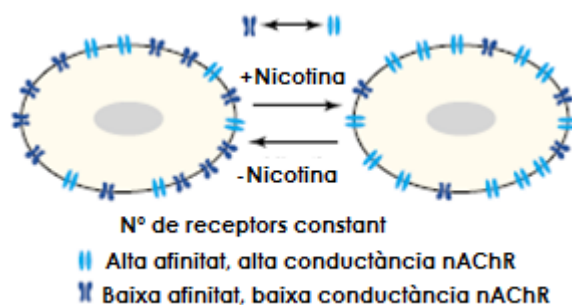
La regulació a l'alça dels nAChR és l'increment en els lloc d'unió d'alta afinitat del receptor. L'exposició crònica dels nAChR a un lligand com la nicotina provoca un canvi entre dos estats actius del receptor (baixa i alta afinitat). Aquest mecanisme de regulació està implicat en mecanismes adaptatius com és la plasticitat sinàptica. En el sistema mesolímbic, la regulació a l'alça funcional en el sistema dopaminèrgic indueix

un increment en l'alliberació de dopamina, el qual podria modular la depressió a llarg termini (LTD) que és un mecanisme ben conegut de plasticitat sinàptica (Buisson i Bertrand, 2002).

Mitjançant experiments d'electrofisiologia en ovòcits de *Xenopus* que expressaven el nAChR $\alpha 4\beta 2$, Coverton i Connolly (1997) van observar que la corba dosi-resposta per aquest subtipus de receptor s'ajustava millor a dos equacions de Hill, el qual indicava la existència de dues poblacions de receptors del mateix subtipus o afinitats diferents per una mateixa població. Aquests resultats van ser observats també per Buisson i Bertrand (2002) en línies cel·lulars de mamífers. Van proposar dos hipòtesis com a mecanismes de regulació a l'alça: la hipòtesi de l'equilibri conformacional i la hipòtesi del receptor bloquejat per lligand.

1-Hipòtesi de l'equilibri conformacional

Aquest model proposa 2 estats funcionals del receptor, interconvertibles que tenen afinitats i conductivitats diferents. En absència de lligand, la proporció entre la població d'alta afinitat i la de baixa afinitat és de 25:75. L'exposició crònica a una baixa concentració de nicotina provoca un increment de la població de receptors d'alta afinitat però sempre mantenint constant el nombre total de receptors. Mecanismes fosforil·lació-defosforil·lació estan implicats en aquesta conversió, de la mateixa manera que succeeix amb els receptors AMPA de glutamat.

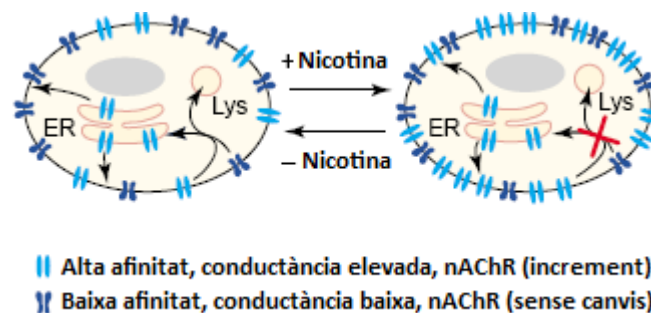


Model de l'hipòtesi de l'equilibri conformacional (Imatge: Buisson i Bertrand, 2002).

2-Hipòtesi del receptor bloquejat pel lligand

Aquest model està bastat en un ràpid equilibri entre els receptors que estan en la membrana extracel·lular, els que es troben en fase d'ensamblament en el reticle endoplasmàtic i Golgi, i els que es degraden en els lisosomes.

L'exposició crònica al lligand provoca l'estabilització dels receptors a la membrana i bloqueja en reciclatge i degradació en els lisosomes. En aquesta hipòtesi la població de receptor incrementa i les noves subunitats que arriben a la membrana cel·lular provinent d'una subpoblació intracel·lular tenen la conformació d'alta afinitat.



Model de l' hipòtesi del receptor bloquejat pel lligand (Imatge: Buisson i Bertrand, 2002).

Implicació dels nAChR en malalties neurodegeneratives

L'alteració dels nAChR neuronals ha estat observada en moltes malalties neurodegeneratives. En diferents tipus de demència s'observa una disminució en els llocs d'unió d'alta afinitat de la nicotina en les neurones de la regió cortical-hipocampal.

Maskos i col. (2005) observen que animals knockouts $\beta 2$ tenen dèficits de comportament i pèrdua neuronal més greus com a resposta a dany excitotòxic induït en l' hipocamp respecte als animals que contenen aquesta subunitat; a més tenen bloquejat l'aprenentatge i remodelació de l' hipocamp induïts per un entorn ric en estímuls. Per tant, es demostra, que l'absència de nAChR potencia la neurotoxicitat, el qual suporta la idea que la pèrdua de nAChR contribueix a la patogènesi de molts tipus de neurodegeneració com en el cas de l'Alzheimer (AD), Parkinson (PD) i la malaltia de Lewy.

Receptors nicotínics i excitotoxicitat per amfetamines

Recentment, s'ha implicat el receptor nicotínic $\alpha 7$ en la excitotoxicitat induïda per METH en les neurones dopaminèrgiques de l'estriat (Escubedo i col., 2005; Northrop i col., 2010). La METH provoca dany tan en neurones dopaminèrgiques com en serotoninèrgiques, però en el cas de les dopaminèrgiques el grup de Yamamoto (Northrop i col., 2010) descriu que l'alliberació de glutamat responsable de la neurotoxicitat de la METH es dona a través de l'activació dels nAChR $\alpha 7$ així com també està descrita la implicació del nAChR $\alpha 7$ en l'alliberació de glutamat en el còrtex prefrontal per colina i nicotina (Konradsson-Geuken i col., 2009). Però el receptor nAChR $\alpha 7$ no està implicat en la hipertèrmia induïda per METH. La implicació del nAChR $\alpha 7$ està demostrada ja que el bloqueig per metillicaonitina (MLA), antagonista específic $\alpha 7$, provoca una disminució dels marcadors de dany dopaminèrgic. Treballs del nostre grup (Chipana i col., 2006) demostren que l' MLA no protegeix de la toxicitat serotoninèrgica. Yamamoto explica que el fet que el nAChR $\alpha 7$ no estigui implicat en la toxicitat per METH sobre els terminals serotoninèrgics es dona perquè la METH actua mitjançant altres mecanismes de neurotoxicitat diferents de l'alliberació de glutamat com són la inflamació mitjançant l'activació de microglia, la disfunció mitocondrial o la hipertèrmia.

5. LES CÈL·LULES PC12

La línia cel·lular denominada PC12 és una línia cel·lular que respon reversiblement al factor de creixement neuronal (NGF), ha estat establerta a partir d'un feocromocitoma de medul·la suprarenal de rata. Després d'uns dies d'exposició a l'NGF, les cèl·lules PC12 detenen el seu creixement i comencen a estendre les neurites, procés similar a els cultius primaris de neurones simpàtiques. Sintetitzen i emmagatzemen catecolamines com la dopamina i la noradrenalina.

L'homogeneïtat i la quasi bé diploidia (40 cromosomes: 38 autosomes i el parell de cromosomes sexuals) del nombre de cromosomes ens suggereix que aquesta línia cel·lular podrà ser mantinguda genotípicament i fenotípicament estable durant moltes generacions "in vitro".

Creixement i resposta a l'NGF

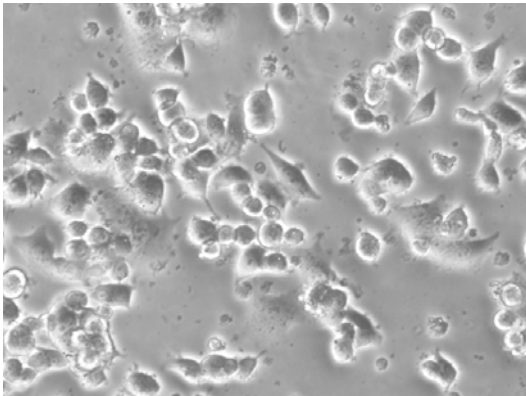
Les cèl·lules PC12 es mantenen en un medi de manteniment adequat, en el qual la seva morfologia és arrodonida i amb tendència a formar petits agregats. Es va comprovar mitjançant injeccions subcutànies en rates que les cèl·lules en aquest estat mantenen les seves propietats tumorals (Greene i col., 1976).

Les PC12 responen a l'NGF; en aquest estadi, com les neurones simpàtiques, no s'adhereixen adequadament quan se sembren directament a les plaques de cultiu no tractades, però sí a les plaques de cultiu col·lagenades. Després de set dies tractades amb l'NGF, la divisió cel·lular es deté; en el cas de neurones simpàtiques en cultiu, aquest procés esdevé de la mateixa manera, al ser tractades amb l'NGF detenen el seu creixement. En el moment que detenen el seu creixement comencen a diferenciar-se i extenen les seves neurites. Aquest procés de diferenciació induït per l'NGF és reversible; s'ha observat que la privació de l'NGF durant 24 hores produeix la degeneració de les neurites, que es podran tornar a formar en el moment que es torni a afegir NGF, però no la dels cossos cel·lulars.

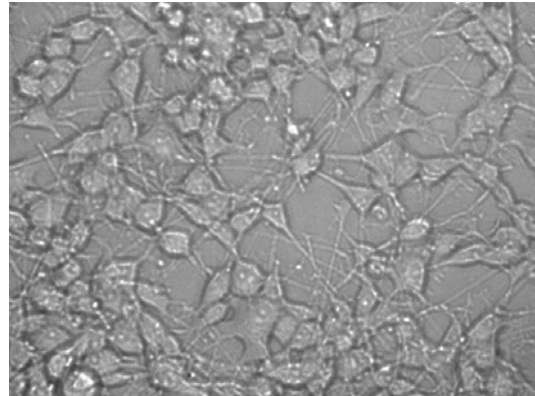
Les cèl·lules cromafins suprarenals no necessiten l'NGF per a esdevenir el que són, en canvi, les neurones simpàtiques necessiten tant "in vivo" com "in vitro" l'NGF

(Levi-Montalcini i Cohen, 1956) per a la seva supervivència. Aquestes dos consideracions ens porten a l'origen d'aquestes dos tipus de cèl·lules, els quals provenen d'una cèl·lula mare comú en la cresta neural. És evident que factors extracel·lulars permeten la diferenciació per dos vies diferents en aquests dos tipus cel·lulars. Basant-nos en aquests fets, podríem considerar la cèl·lula PC12 com una cèl·lula mare pluripotencial, que pot esdevenir cèl·lula cromafí o, mitjançant la diferenciació neuronal amb l'NGF, neurona simpàtica.

A



B



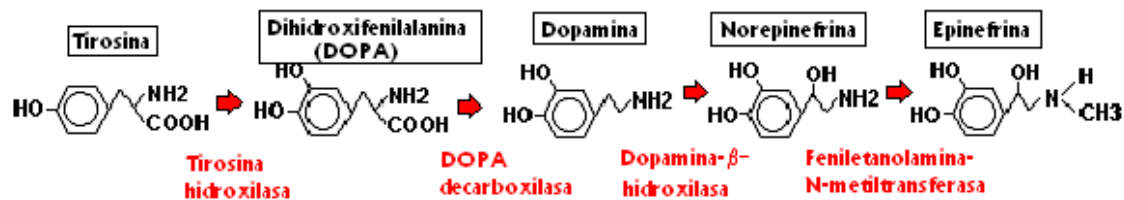
Cèl·lules PC12 de rata en medi de manteniment (A) no diferenciades i (B) diferenciades amb el factor de creixement neuronal (NGF) (200X, Microscopi d'Epifluorescència Nikon Eclipse TE200).

Els cossos cel·lulars de les cèl·lules PC12, tant tractades com no tractades amb NGF, contenen uns grànuls rodons, ovoides i alguns irregulars, densos i d'unes dimensions de 40 a 350 nm. En la rata, aquests tipus de grànuls han estat descrits en les cèl·lules cromafins suprarenals (50-350nm), en les cèl·lules dels ganglis simpàtics (80-200 nm), i en les neurones simpàtiques (90-100 nm). En canvi, en les cèl·lules PC12 tractades amb l'NGF, a part de contenir aquests tipus de grànuls descrits, observem unes petites vesícules rodones, poc denses, de 20-70 nm de diàmetre. Aquestes vesícules es troben majoritàriament en el terminal de les neurites alternades amb les vesícules denses. Ha estat comprovat que aquests dos tipus de vesícules alternats es troben també en les neurones noradrenèrgiques (Grillo, 1966; Geffen i Livett, 1971; Holtzman i col., 1973) i també en les cèl·lules cromafins de la medul·la adrenal (Coupland, 1965).

Metabolisme de les catecolamines

La tècnica histoquímica de Falck-Hillarp (Carlsson i col.,1961), utilitzada pels primers investigadors que treballaven amb la línia PC12, indica que les cèl·lules PC12 contenen magatzems de catecolamines. La posterior anàlisi enzimàtica de les cèl·lules indica activitat específica dels enzims de síntesi com la tirosina hidroxilasa, la dopa decarboxilasa, i la dopamina β -hidroxilasa, i també d'enzims de degradació com la monoamino oxidasa i la catecol-O-metiltransferasa. Tots aquests enzims es trobem en la mateixa magnitud o similar en les cèl·lules de la glàndula adrenal.

Les dades presentades per Greene i col. (1976), demostren que les cèl·lules PC12 sintetitzen i emmagatzemen els neurotransmissors noradrenalina i dopamina, però no adrenalina; per tant, en aquest aspecte, les PC12 són similars a les cèl·lules cromafins noradrenèrgiques de la medul·la adrenal i a les neurones simpàtiques. Però a diferència d'aquests dos tipus cel·lulars, les cèl·lules PC12 contenen quantitats més elevades de dopamina que de noradrenalina; una explicació per aquest fet podria ser la baixa taxa de síntesi de noradrenalina limitada pels nivells de dopamina β -hidroxilasa.



La línia PC12 com a model d'investigació

La línia PC12 esdevé doncs, un model per a investigar nombrosos aspectes de neurobiologia i neuroquímica com poden ser: els mecanismes d'acció de l'NGF i el seu paper en el desenvolupament i la diferenciació de les cèl·lules mare neuronals; la iniciació i la regulació del desenvolupament de les neurites; i el metabolisme, tan l'emmagatzament com la recaptació, de les catecolamines. Aquesta línia també pot ser utilitzada per a l'estudi de tractaments de tumors.

En el nostre treball d'investigació la línia PC12 és utilitzada per a l'estudi dels mecanismes d'acció de la metamfetamina i l'MDMA, com a neurotoxines dopaminèrgiques.

Els receptors nicotínics i les cèl·lules PC12

La primera indicació de la presència de receptors $\alpha 7$ nicotínics sensibles a l' α -Bungarotoxina en cèl·lules PC12 prové d'estudis realitzats per Chan i Quik (1993) on s'observa que la toxina bloqueja els efectes de la nicotina sobre el creixement de les neurites. Posteriors treballs com el de Blumenthal i col. (1997) demostren que la presència de ARNm per la subunitat $\alpha 7$ no implica necessàriament la presència de receptors funcionals en la membrana, sinó que són necessàries diverses modificacions post-traduccionals per a que això es produeixi. En aquest treball es comparen diferents soques de PC12 amb diferents graus d'expressió de receptors funcionals. Per tant, és necessari verificar fins a quin punt arriba l'expressió d'aquests receptors a l'hora d'afrontar estudis sobre aquests. Alhora, les PC12 diferenciades amb NGF presenten una major densitat de receptors nicotínics $\alpha 7$ que les no diferenciades (Henderson i col., 1994). Altres experiments sobre la regulació de l'expressió dels receptors $\alpha 7$, com el de Madhok i col. (1995), presenten una regulació a l'alça d'aquests receptors després del pretractament amb nicotina. L'assaig d'unió de [3 H]nicotina resulta concentració dependent i presenta el valor màxim d'expressió dels receptors a una concentració de nicotina de 10^{-4} M.

Treballs sobre les vies implicades en l'activació del receptor $\alpha 7$ demostren que una activació continuada dels receptors $\alpha 7$ provoca l'entrada massiva de calci i la seva acumulació en l'interior de la cèl·lula, donant lloc a l'activació de vies dependents de calci que provoquen la mort cel·lular; autors com Li i col. (2000) i Ren i col. (2005), relacionen la mort cel·lular induïda per l'etanol amb aquesta entrada massiva de calci que bloquegen mitjançant l'agonista parcial específic d' $\alpha 7$, 2,4-metoxibenzilide anabaseina (DMXB) i donant lloc així a la neuroprotecció de la cèl·lula.

Tot i tractar-se d'un altre tipus cel·lular, encara que molt similar a les PC12, Liu i col. (2003) demostren en cultius primaris de cèl·lules cromafins bovines que la d-

amfetamina augmenta la concentració intracel·lular de calci mitjançant un efecte agonista sobre els receptors nicotínics, possiblement $\alpha 7$.

A més de subunitats $\alpha 7$, dependent de la soca, les cèl·lules PC12 poden expressar altres tipus de subunitats: $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ i $\beta 4$ (Virginio i col., 2002).

Les cèl·lules PC12 i les amfetamines

Alguns dels efectes de les amfetamines sobre les cèl·lules PC12 ja han estat estudiats per diferents grups d'investigació, els quals coincideixen en que la degeneració dels terminals implica la via neuronal dopaminèrgica. També coincideixen amb la producció de ROS com a principal conseqüència del tractament amb amfetamines.

Wei i col. (1997) realitzen un treball en cèl·lules PC12 amb elevada expressió de l'enzim MAO-B; les cultiven en presència d'NGF i les tracten amb METH (100 μ M; 4 dies). L'elevada expressió de MAO-B juntament amb l'efecte de la METH dona lloc a un augment en la peroxidació de lípids i la disminució en el nombre i en la mida de les neurites. La implicació de la MAO-B en aquests resultats es demostra revertint els efectes amb el deprenil, un inhibidor de la MAO-B. Aquestes dades indiquen que el metabolisme de la dopamina per la MAO-B i la subsegüent producció de ROS són elements claus en la degeneració dels terminals dopaminèrgics per la METH.

Imam i col. (2002) fan un estudi on avaluen la neurotoxicitat induïda per la METH (100-1000 μ M) en cultiu de PC12, en absència i presència d'NGF. L'efecte de l'amfetamina s'avalua mitjançant un marcador, 3-NT (3-nitrotirosina) resultat de la producció de peroxinitrit. Respecte els resultats, a les 24 hores, en absència d'NGF la METH no provoca alteracions en la viabilitat cel·lular ni canvis significants en la producció de 3-NT; en canvi, en presència d'NGF, disminueix la viabilitat cel·lular en un 45% i hi ha variacions dosi-dependents de la producció de 3-NT.

Estudis previs realitzats pel grup d'investigació d'Imam i col.(2000, 2001) demostren que l'addició de METH (200 μ M) en cèl·lules PC12, a les 24 hores provoca l'augment de ROS i la disminució de dopamina citoplasmàtica. Per a demostrar que l'efecte neurotòxic de la METH vé donat per la producció de ROS, s'utilitzen substàncies antioxidants com el seleni, i s'observa que protegeixen la cèl·lula de la

formació de 3-NT i de la disminució de dopamina citoplasmàtica, per tant, es confirma que la neurotoxicitat de la METH ve donada per la producció de ROS. Els autors proposen que seria interessant treballar amb aquests antioxidants ja que poden tenir un potencial terapèutic en el tractament de les addiccions per amfetamines.

Fornai i col. (2004) descriuen l'aparició d'inclusions en el sistema nigroestriatal i en PC12 com a resultat del tractament tant amb MDMA (100µM; 4, 12, 24, 72, 168 hores) com amb METH (1µM; 12, 24, 72 hores). L'evidència que aquestes inclusions són resultat de l'efecte de les amfetamines sobre el sistema dopaminèrgic es demostra amb la inhibició de l'enzim de síntesis de dopamina, α -MpT (α -metil-p-tirosina) que atenua la producció de inclusions. Al tractar les cèl·lules amb L-Dopa, es reverteix l'efecte de la substància anterior.

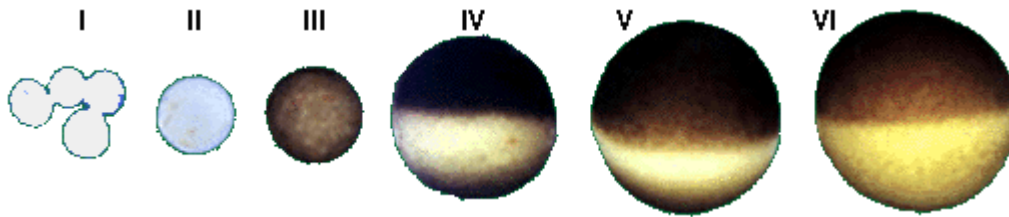
6. OVÒCITS COM A SISTEMA D'EXPRESSION DE PROTEÏNES

El gripau *Xenopus laevis* és d'origen africà i pertany a la família *Pipidae* la subfamília *Xenopidae*. Es caracteritza per la seva capacitat d'iniciar cicles sexuals a qualsevol època de l'any presentant una ovulació asincrònica dels ovòcits, presentant diferents estats embrionaris.

La primera observació que un ARN exogen injectat en ovòcits podia traduir-se a proteïna va ser realitzada a principis dels anys 70 per Gurdon i col·laboradors (1971). A partir de llavors, aquest sistema va ser pioner en l'expressió de receptors i canals iònics (Gundersen i col., 1983; Miledi i col., 1983) amb tal èxit que actualment és un mètode indispensable per a l'expressió i estudi de receptors, canals i transportadors de membrana.

Els ovòcits tenen 6 estadis embrionaris, qualsevol estadi es pot utilitzar per a l'expressió de receptors, però la seva mida determina la metodologia a utilitzar. Els estadis embrionaris més utilitzats són els 4, 5 i 6, essencialment per la seva mida, 1.2-1.5 mm. L'estadi embrionari 6 és fàcil d'identificar ja que apareix una banda pigmentada que permet diferenciar els 2 pols del oòcit, el pol clar, vegetal amb al contingut de ARN missatger, i el pol fosc, animal, ple melanosomes i el nucli cel·lular. El

pol animal té una gran mobilitat lipídica ja que és la zona per on penetra l'espermatozou.



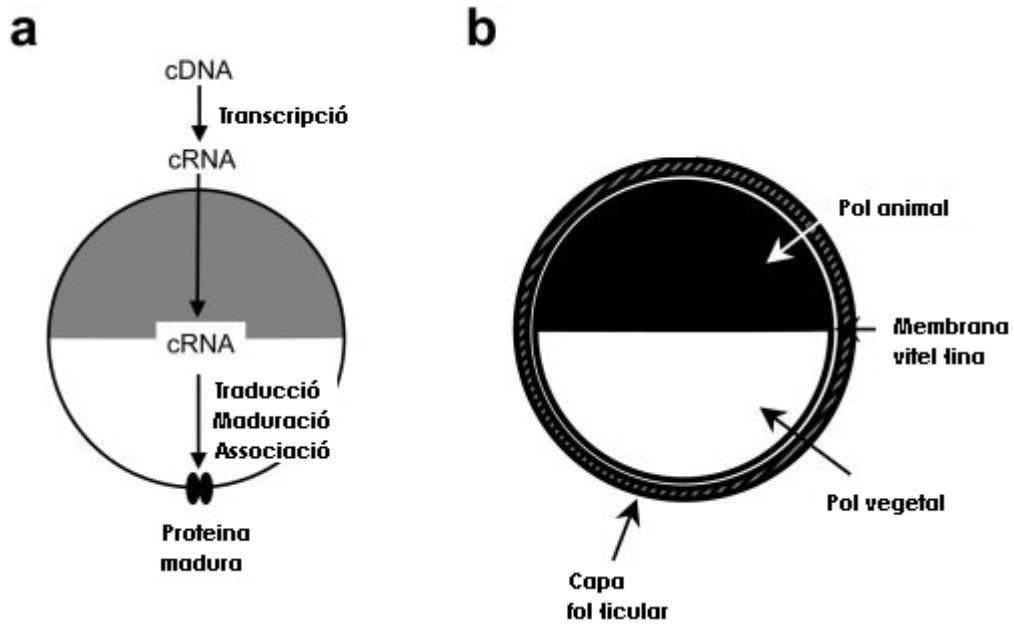
Estats embrionaris dels ovòcits de *Xenopus laevis*.

Avantatges d'utilització dels ovòcits

Una de les principals avantatges és la possibilitat d'obtenir una gran quantitat de cèl·lules de cada donant sense la necessitat de sacrificar el gripau a cada operació. Un mateix donant pot donar múltiples vegades.

El cultiu d'aquestes cèl·lules és senzill, sense grans requeriments nutricionals en el medi, mantenint el oòcits sans en medi de cultiu fresc, el qual facilita l'expressió i el posterior estudi de les proteïnes que requereixin un període llarg per a la seva expressió en membrana. El gran tamany de les cèl·lules facilita la injecció de la informació genètica (ADN o ARN) que serà transcrita, traduïda a proteïna i posteriorment la seva associació per formar receptors funcionals en la membrana. Es pot realitzar la coexpressió de diferents subunitats, fet que facilita l'estudi de receptors heteromèrics com $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$. Alhora, la gran mida permet la introducció de 2 electrodes per a l'estudi electrofisiològic de doble electrode.

La presència de pocs canals endògens elimina artefactes i simplifica l'anàlisi. Però sí que s'ha de considerar el canal de clorur activat per Ca^{2+} , ja que l'activació d'aquest canal, quan es treballa amb un medi que conté el ió calci, pot distorsionar els resultats ja que s'activen els corrents de clor i varia el potencial de membrana. Una de les estratègies utilitzades per eliminar l'efecte d'aquests Canals és la substitució del ió calci per un altre ió semblant que pugui passar a través del canal d'estudi, Ba^{2+} o el Sr^{2+} . Altres canals presents en els oòcits són els canals de calci i de sodi voltatge depenents, però indueixen corrents molt petits que no solen interferir.



(a) Esquema de l'expressi3 dels receptors nicotinics de membrana en els ov3cits de *Xenopus laevis*. (b) Esquema d'un ov3cit de *Xenopus laevis* on s'observen el pol animal i el pol vegetal envoltats per la fina membrana vitel·lina que alhora 3s envoltada per la gruixuda capa fol·licular que 3s alliberada quan els ov3cits s3n tractats amb col·lagenasa (Bianchi i Driscoll, Llibre Wormbook, 2006)

Material i mètodes

1. CULTIU DE CÈL·LULES PC 12

Les cèl·lules de feocromocitoma de rata (PC12) varen ser una donació del Dr. Serratosa (Departament de Neuroquímica, Farmacologia i Toxicologia, CSIC-IDIBAPS, Barcelona). Aquestes cèl·lules es fan créixer dins un incubador a 37°C, en atmosfera de 5% de CO₂ i 95% d'aire, en plaques de cultiu col·lagenades i en un medi de manteniment que té la següent composició :

Medi de manteniment

Medi DMEM (Dulbecco's Modified Essential Médium) suplementat amb:

- Glutamina/HEPES: 2mM/10mM.
- Sèrum de cavall (HS): 10%.
- Sèrum fetal de bou (FCS): 5%.
- Penicil·lina-Estreptomicina : 25 UI/ml-25µg/ml

Aquest medi es prepara extemporàniament en un flascó estèril i es conserva a la nevera fins una setmana.

Manteniment del cultiu

Les cèl·lules PC12 es congelen en medi de manteniment amb un 10% de DMSO, sotmetent-les a una disminució gradual de la temperatura (gel, 3h a -20°C; 18h a -80°C, i resta en nitrogen líquid (N₂)). La línia cel·lular es manté congelada en criotubs dins de N₂ líquid fins la seva utilització.

En placa, quan les cèl·lules arriben a un nivell considerable de confluència cal dispersar-les en un volum de medi més gran i a continuació sembrar en noves plaques; aquest procediment s'anomena passatge i es realitza setmanalment. Es canvia el medi de manteniment cada 2 dies.

Ja que s'ha descrit que les cèl·lules PC12 sotmeses a molts passatges poden generar diferents variants que poden presentar característiques diferents, tots els

experiments d'aquest treball s'han realitzat entre els passatges 12 i 21, entre els quals no hem detectat diferències significatives de comportament o resposta.

Diferenciació de les cèl·lules PC12

Les cèl·lules PC12 adquireixen un fenotip neuronal quan són exposades al factor de creixement neuronal (NGF; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) i un medi de cultiu adequat. En determinats experiments, en el moment en que les cèl·lules en medi de manteniment arriben a la semiconfluència es canvia aquest per medi de diferenciació, de manera que en el moment de realitzar l'experiment totes les cèl·lules estaran completament diferenciades.

Medi de diferenciació

Medi DMEM suplementat amb:

- HEPES/Glutamina: 10mM/2mM.
- Sèrum de cavall: 1%.
- Penicil·lina/estreptomicina: 25UI/ml/25µg/ml.
- NGF: 50 ng/ml.

Cal renovar el medi de diferenciació a les 48 hores.

Preparació de l'NGF

L'NGF liofilitzat es ressuspèn en 1 ml de DMEM i s' alíquota en eppendorfs estèrils i a volums necessaris per a un sol ús, a fi i efecte d'evitar la recongelació. Les alíquotes es conserven a -80°C fins a un màxim de 2 mesos.

Tots els components dels medis de cultiu procedeixen de GIBCO-BRL Life Technologies, excepte la glutamina i l'HEPES que eren de Sigma.

Col·lagenació de plaques

Les plaques de cultiu es tapissen amb col·lagen, a una densitat de $2\mu\text{g col·lagen/cm}^2$ dil·luit en $\text{H}_2\text{O miliQ}$ i 0.05 M d'àcid acètic.

Congelació-descongelació

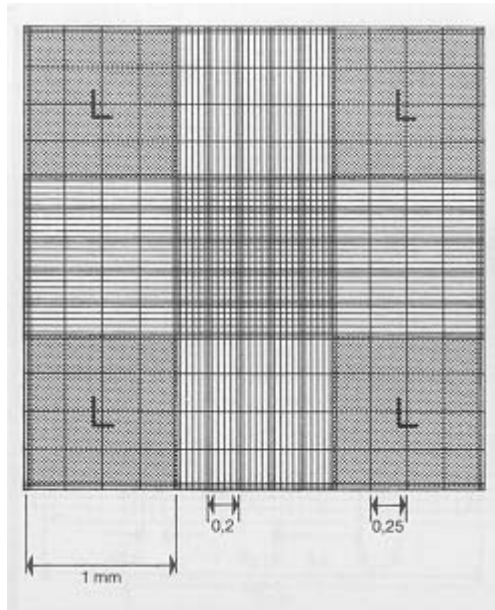
Les cèl·lules es mantenen en criovials en una solució de medi de manteniment i DMSO, que evita la formació de cristalls, a una temperatura de $-195,8\text{ }^\circ\text{C}$ en nitrogen líquid (N_2). En el moment que es vol realitzar un experiment es descongelen les cèl·lules retirant, mitjançant centrifugació, el medi amb DMSO ja que resulta tòxic per les cèl·lules quan es troba en estat líquid. Les cèl·lules descongelades es deixen en placa dins l'incubador a $37\text{ }^\circ\text{C}$ durant una setmana.

Comptatge cel·lular en cambra de Neubauer

En determinats experiments és necessari conèixer la concentració de cèl·lules que tenim en un pou. En aquests casos s'utilitza la cambra de comptatge de Neubauer. La cambra de Neubauer és una cambra de comptatge adaptada al microscopi de camp clar o al de contrast de fase. És un portaobjectes amb una depressió central en el fons de la qual marcat amb l'ajuda d'un diamant hi ha una quadrícula. És un quadrat de $3*3\text{ mm}$, amb una separació entre 2 línies consecutives de 0.25 mm . L'àrea de comptatge té una superfície de 1 mm^2 (L). La depressió central del portaobjectes està enfonsada 0.1 mm respecte a la superfície, de manera que quan es cobreix amb un cobreobjectes el volum resultant és de 0.1 mm^3 , és a dir, $0.1\text{ }\mu\text{l}$.

Per tant, contant el nombre de cèl·lules (x) en el total de les 4 àrees de comptatge, la concentració de la suspensió cel·lular és:

$$10000*(x/4) = \text{Concentració en la suspensió cel·lular (Cèl·lules/ml)}$$



Esquema de la cambra de Neubauer amb les 4 àrees de comptatge (L).

Reactius

El DMEM, els sèrums de cultiu i l'antibiòtic provenen de GIBCO (Invitrogen Corp. Paisley, U.K.). El col·lagen i el DMSO provenen de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). L'NGF prové de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY).

2. CULTIU PRIMARI DE CÈL·LULES CORTICALS DE RATOLÍ

El cultius primaris de cèl·lules corticals embrionàries de ratolí es van realitzar a partir l'escorça del cervell d'embrions de ratolí ICR- (CD-1) (Harlan Iberica, Barcelona) en l'estat embrionari E-13-14.

Protocol de preparació dels cultius

Les cèl·lules es mantenen en medi de manteniment complet en plaques amb poli-L-lisina.

Preparació de les plaques

Les plaques de cultiu es tapissen amb poli-L-lisina (10 mg/L en H₂O miliQ) durant 1 hora a 37°C. A continuació s'aspira i es deixa secar a T^a ambient.

Medi de manteniment complet

Medi neurobasal suplementat amb:

- Penicil·lina-Estreptomicina (100UI /ml-0.1 mg/ml).
- Bicarbonat de sodi (0.04%).
- L-Glutamina (0.5 mM).
- Sèrum de cavall (10%).
- B-27 (suplement pel creixement i manteniment de la viabilitat cel·lular).

Es sacrifica el ratolí mitjançant dislocació cervical i s'extreuen els embrions en el dia 13-14 (Estat embrionari 13-14). Els embrions extrets es mantenen en una placa amb PBS-glucosa 0.6% a 4°C. La decapitació i dissecció de l'animal es realitza sota la lupa on es durà a terme la separació de l'escorça del cervell. És important separar amb molt compte les meninges i no fer malbé l'escorça. A continuació l'escorça es diposita en un tub amb tripsina 1x (diluïda en PBS-glucosa 0.6% estèril) i es deixa 30 minuts en el bany a 37°C. L'acció de la tripsina es deté afegint el mateix volum de sèrum fetal boví i mitjançant una pipeta Pasteur es disgrega el teixit. El tractament amb tripsina facilita la disgregació mecànica. A continuació es realitza una centrifugació i les cèl·lules obtingudes es ressuspenen en medi complet i es duu a terme el comptatge en la cambra de comptatge Neubauer. Les plaques es sembren a una densitat de 500.000 cèl·lules/ml. Per tal d'inhibir el creixement de la glia, al cap de 24 hores de la sembra s'afegeix arabinosilcitosina (Ara-C) (6µM). Cada 3-4 dies es fa un canvi de medi complet.

Reactius

El medi neurobasal i el B-27 prové de Invitrogen (Paisley, U.K.). La poli-L-lisina, el bicarbonat de sodi i l'Ara-C provenen de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

3. TRACTAMENT *in vivo*

Tractament dels animals per determinar la regulació a l'alça dels nAChR

Per tal de determinar la regulació a l'alça dels nAChR *in vivo* es van utilitzar rates mascle Sprague-Dawley (Harlan Ibérica, Barcelona) de 200-230 gr. Es van mantenir individualment en gàbies grans durant tot el tractament, a 22 ± 1 °C sota cicles de llum/penombra de 12 hores i amb accés lliure al menjar i l'aigua. El tractament es va dur a terme durant 10 dies, amb grups de 6 animals per tractament, amb el següent protocol (veure esquema):

Grup Control: Sèrum fisiològic 1 ml/Kg per via subcutània (s.c.), 2 vegades al dia durant 10 dies.

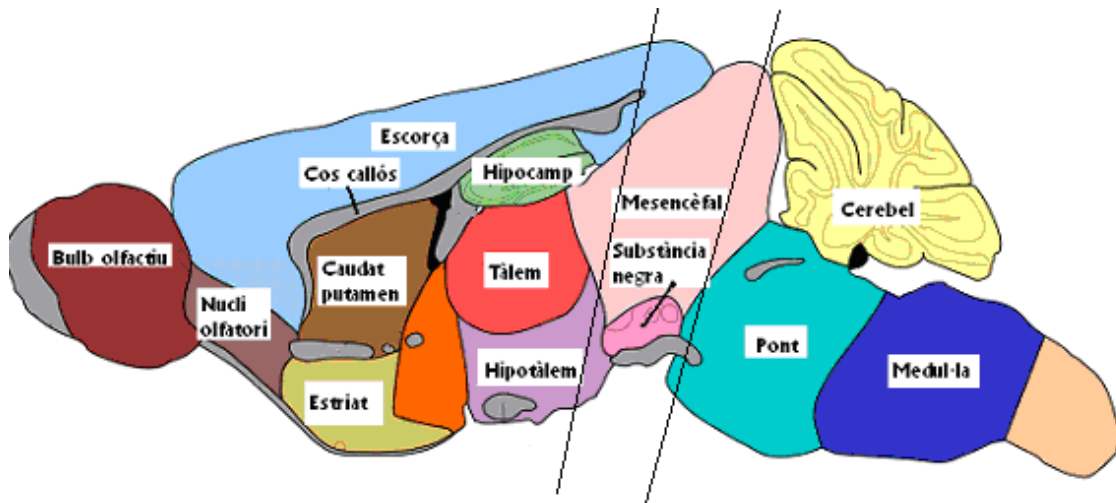
Grup Nicotina: Nicotina bitartrat dihidrat 2 mg/Kg per via s.c., 2 vegades al dia amb 7 hores de diferència durant 10 dies (Flores i col., 1992).

Grup MDMA: En primer lloc, s.f. per via s.c. 2 vegades al dia del dia 1 al 6. Del dia 7 al 10, 20 mg/Kg d'MDMA per via s.c., 2 vegades al dia amb un interval de 7 hores (O'Callaghan i Miller, 1994).

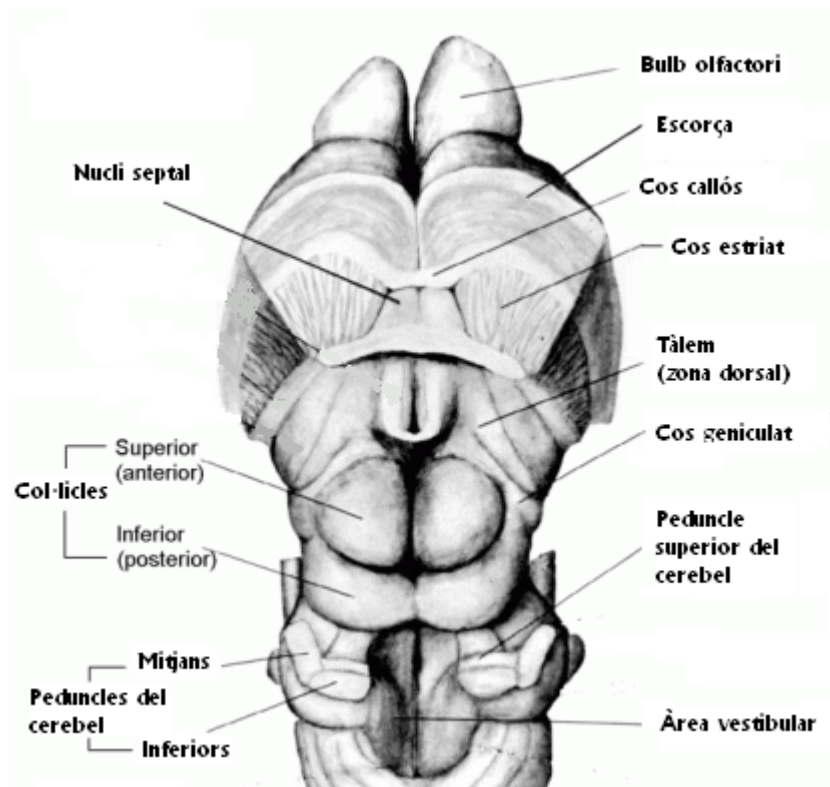
Grup NIC+MDMA: Es va tractar amb nicotina durant els 10 dies de la mateixa manera que el grup nicotina, i els últims 4 dies es va tractar també amb MDMA amb la mateixa dosi que el grup MDMA 15 minuts abans de la nicotina i en un lloc de punció diferent.

El pes de les rates es va mesurar els dies 1, 4, 6 i 11, i es va calcular el percentatge d'increment durant el tractament. El dia 11 es van sacrificar les rates mitjançant decapitació després d'haver anestesiat els animals amb isoflurà. El protocol de manipulació dels animals està aprovat pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona supervisat i el Govern de Catalunya d'acord amb les recomanacions del Consell de la Comunitat Europea (86/609/ECC). Els cervells es van extreure ràpidament del crani i es van disseccionar en una superfície refrigerada. Es van extreure l'hipocamp, l'estriat, l'escorça prefrontal i parietal, el cerebel i una secció coronal que

contenia els col·licles superiors i el mesencèfal adjacent, i a continuació es van congelar immediatament en neu carbònica i guardats a -80°C fins a la seva utilització.

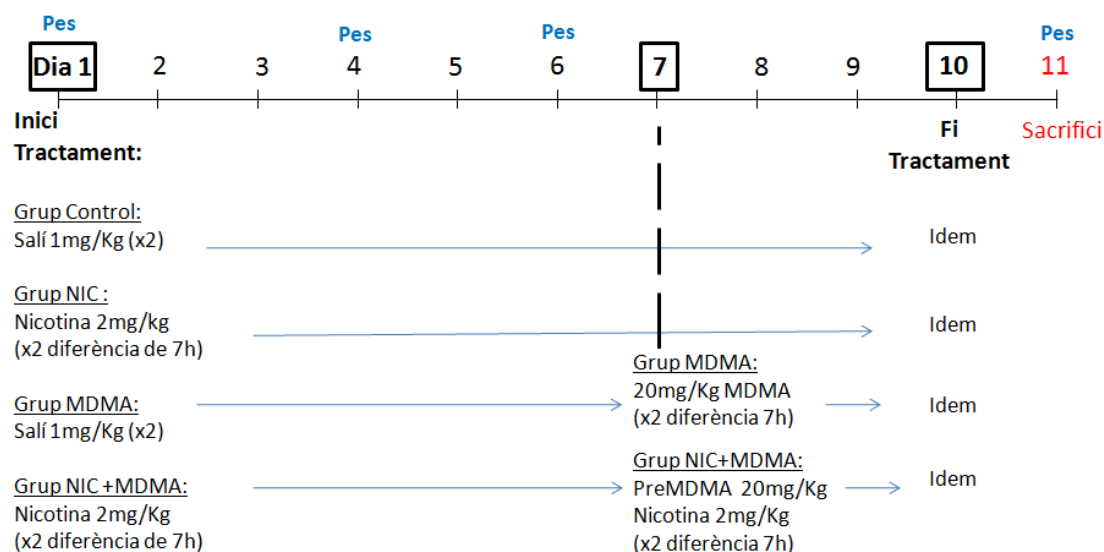


Esquema d'una secció sagital de cervell murí. Les línies indiquen la secció coronal que permet la separació dels col·licles i el mesencèfal adjacent. (Gene expression nervous system atlas).



Representació de la vista dorsal d'un cervell murí.

Esquema protocol tractament:



Tractament dels animals amb deleció del nAChR $\alpha 7$ (*Knockout $\alpha 7$*)

Per tal de determinar la neurotoxicitat de l'MDMA associada als receptors nicotínics $\alpha 7$ *in vivo*, es van utilitzar ratolins mascles C57-BL6, amb deleció d'aquest receptor. Aquests ratolins, d'uns 4 mesos d'edat, van ser donació del Dr. Luis Gandia (Departament de Farmacologia, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Madrid). Per tal d'establir una comparació, es van utilitzar ratolins salvatges (wild-type) de l'espècie C57-BL6 (Harlan Ibérica, Barcelona) mascles i femelles d'edats similars. El pes dels ratolins era de 20 a 30 kg. El protocol de manipulació dels animals està aprovat pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona supervisat i el Govern de Catalunya d'acord amb les recomanacions del Consell de la Comunitat Europea (86/609/ECC).

Els animals es van mantenir en gàbies de 5 ratolins, a 24 ± 1 °C sota cicles de llum/penombra de 12 hores i amb accés lliure al menjar i a aigua. El tractament es va dur a terme el mateix dia, amb grups de 5 animals per tractament. Es va administrar sèrum fisiològic (Controls) o MDMA 25 mg/Kg, 3 cops amb 3 hores de diferència, en un volum d'administració de 5 ml/Kg.

Al cap d'1 hora després de la segona dosi es va mesurar la temperatura rectal amb una sonda acoblada a un termòmetre digital.

Als 7 dies es van sacrificar els ratolins mitjançant dislocació cervical. Els cervells es van extreure ràpidament del crani i es van disseccionar sobre una superfície refrigerada. Es van extreure l'hipocamp, l'estriat i l'escorça, i a continuació es van congelar immediatament en neu carbònica i guardats a -80°C fins a la seva utilització.

Processat del teixit

Els teixits es van descongelar i homogeneïtzar amb un Polytron a 4°C en 10 vegades el seu volum d'un tampó que contenia 5 mM de Tris-HCl, 320 mM de sacarosa i inhibidors de proteases (Aprotinina 4 µg/µl, 0.1 mM PMSF i 1 M d'ortovanadat sòdic) a pH 7.4. Els homogenats es van centrifugar a 15000 x g durant 30 min a 4°C. Els pellets obtinguts es van ressuspendre en tampó, es van incubar a 37°C durant 10 min per tal de degradar els lligands endògens restants, i es van tornar a centrifugar dos cops més. Els pellets finals es van ressuspendre en tampó Tris-HCl 50 mM i inhibidors i es van guardar a -80°C fins a la seva utilització en assajos de binding o per Western blot amb els receptors solubilitzats. Per tal de conèixer la concentració de proteïna extreta es va determinar mitjançant el reactiu de Bradford (BioRad Protein Reagent) seguint les instruccions dels fabricant.

4. OBTENCIÓ DELS SUBSTRATS PER ALS DIFERENTS ASSAIGS

Preparació de membranes de cèl·lules PC12

S'utilitzen plaques de 10 cm de diàmetre, amb cèl·lules PC12 no diferenciades o diferenciades durant 4 dies a semiconfluència. Al moment de l'experiment, es retira el medi i les cèl·lules de cada placa es desenganxen per pipeteig en 3 ml de tampó Tris-HCl 50 mM en fred, amb els inhibidors de proteases: PMSF 0.1 mM i Aprotinina 4.5 µg/µl. Les cèl·lules es recullen en un tub cònic i es recuperen, prèvia centrifugació (4

min a 1000 rpm) en 4 ml de tampó. Es decanta el sobrenedant i el pellet es resuspèn en 5 ml de Tris-HCl i es tritura al Polytron durant 10 sg. Es reparteix en tubs de centrífuga i es torna a centrifugar, 20 min a 13000 x g. Es decanta el sobrenedant dels tubs i s'hi afegeix 2.5 ml de Tris-HCl. Es torna a centrifugar igual que abans. Es decanta el sobrenedant i es resuspèn amb Tris-HCl segons el pellet. Es pot guardar en eppendorfs a -80°C.

Preparació crua de cervell

S'utilitzen ratolins adults C57-BL6 d'un pes entre 20-30 g o rates Sprague-Dawley d'entre 250-350 g. El protocol de manipulació dels animals està aprovat pel Comitè Ètic de la Universitat de Barcelona supervisat i el Govern de Catalunya d'acord amb les recomanacions del Consell de la Comunitat Europea (86/609/ECC).

El ratolins se sacrifiquen per dislocació cervical, es decapiten i s'obté el cervell. En rates la decapitació es fa prèvia anestèsia amb isoflurà. El cerebel es retira i la resta del cervell es guarda a -80°C fins la seva utilització. En el moment del processat, el cervell es manté a 4°C en gel i 10 vegades el seu volum d'un tampó que conté Tris-HCl 5 mM, sacarosa 320 mM i els inhibidors de proteases: PMSF 0.1mM, Aprotinina 4.5 µg/µl i ortovanadat sòdic 1mM, a pH 7.4. A continuació s'homogeneïtza utilitzant un homogeneïtzador Polytron, es reparteix en tubs i se centrifuga a 4°C durant 30 minuts a 15000 x g. Es descarta el sobrenedant i el pellet es resuspèn amb tampó i es deixa durant 10 min a 37°C per tal d'eliminar els neurotransmissors endògens. El procés de centrifugació es repeteix dos vegades més. El pellet final conté les membranes cel·lulars i es resuspèn en tampó Tris-HCl 50 mM i inhibidors de proteases. Es pot guardar en eppendorfs a -80°C fins la seva utilització.

Solubilització de receptors

Per tal d'obtenir els extractes totals de cèl·lules PC12, després del tractament de les cèl·lules al temps indicat, es desenganxen de la placa mitjançant pipeteig amb 3 ml de tampó fosfat salí (PBS), es recol·lecta en un tub i es centrifuga a 1000 x g. El pellet obtingut es resuspèn en tampó de lisi (20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 2

mM EDTA i 1% d'Igepal P-40) i s'incuba durant 2 h a 4 °C amb rotació i agitació suau per tal de solubilitzar la proteïna. A continuació es centrifuga la mostra a 15000 x g durant 30 min a 4°C; els sobrenedants obtinguts contenen les proteïnes solubilitzades, es determina la concentració proteica i s'emmagatzema a -80°C.

Extracció citoplasma-nucli-mitocondri

Per a la determinació de l'activació de determinades proteïnes és necessària la separació dels diferents compartiments cel·lulars: mitocondri, nucli i citoplasma.

S'utilitzen cultius de cèl·lules PC12 en plaques de 10 cm de diàmetre en semiconfluència tractades amb els composts d'interès. En primer lloc es desenganxen les cèl·lules, es centrifuguen per retirar el medi i es ressuspenen en el tampó A isotònic que conté: Hepes-NaOH 10 mM; MgCl₂ 1.5 mM; KCl 10 mM; EDTA 1 mM; inhibidors de proteases (DTT, PMSF i aprotinina) i Igepal P-40 0.05% que permet la ruptura de la membrana cel·lular. Es deixa 10 minuts en gel i a continuació s'homogeneïtza la mostra per assegurar la ruptura de la membrana cel·lular. Un cop homogeneïtzada la mostra es centrifuga 5 minuts a 500 x g la qual cosa permetrà la precipitació dels nuclis i les membranes cel·lulars. El sobrenedant es torna a centrifugar a 10000 x g durant 30 minuts a 4°C, per una banda, en el sobrenedant s'obté el citosol i en el pellet els mitocondris.

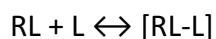
Per altra banda, la fracció de nucli i membranes es resuspèn en tampó B hipertònic: Hepes-NaOH 20 mM; Glicerol 25%; NaCl 420 mM; MgCl₂ 1.5 mM; EDTA 0.2 mM) i es deixa 20 minuts en gel per a que es trenqui la membrana nuclear i s'alliberi el contingut nuclear. A continuació es centrifuga la mostra a 24000 x g durant 20 minuts; el sobrenedant obtingut contindrà la fracció de contingut nuclear que ens interessa.

5. DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ PROTEICA PEL MÈTODE DE BRADFORD

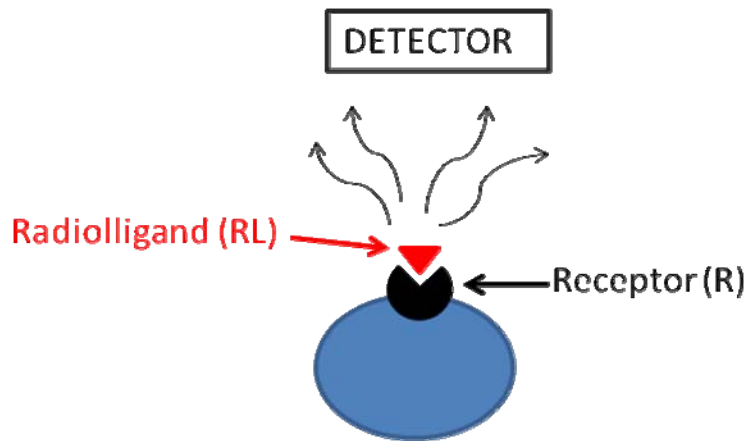
Aquesta tècnica s'utilitza per a determinar la concentració proteica, extrapolable al nombre de cèl·lules amb les que s'està treballant. Consisteix en una reacció colorimètrica amb el colorant BioRad protein reagent (Bio-Rad Labs. Inc., Hercules, CA, USA), el qual s'uneix a la proteïna al cap de 2 minuts. El complex colorant-proteïna provoca un canvi en la longitud d'ona de la màxima absorció del colorant de 465 nm a 596 nm. Es prepara una recta patró amb albúmina de sèrum boví (BSA) a concentracions que van de 1 a 5 µg/pou, i a partir de la mitjana de l'absorbància d'aquestes mostres es pot construir una recta de regressió a partir de la qual, interpolant-hi les absorbàncies de les mostres problema, podem obtenir el valor de la concentració proteica de cada una d'elles. L'absorbància es llegeix en un aparell de lector de microplaques Benchmarck PlusTM (Bio-Rad labs., Hercules, CA, USA) a 595 nm.

6. ASSAIGS DE FIXACIÓ DE RADIOLLIGANDS

Els assaigs de fixació de radiolligands es basen en la interacció entre un radiolligand (RL) i un receptor (R):



La radiació β emesa pel radiolligand unit al receptor és detectada per un detector de radioactivitat.



L'assaig d'unió de radiolligands permet determinar l'existència de determinats receptors, l'afinitat d'un compost pels receptors (K_D , K_i) i altres característiques intrínseques del receptor.

Segons l'objectiu a determinar s'han utilitzat 3 tipus diferents d'assajos de fixació de radiolligand:

Fixació a concentració fixa: S'utilitza una sola concentració de radiolligand, normalment saturant, per detectar i quantificar un receptor concret. En aquest treball, l'existència de receptors nicotínics en cèl·lules PC12 permet comparar la densitat de receptors després de determinats tractaments.

Competició: S'utilitza una concentració de radiolligand fixa en presència de diferents concentracions de compost competidor. Obtindrem la constant d'inhibició IC_{50} i aplicant la equació de Cheng i Prussof obtindrem la K_i del fàrmac.

Saturació: S'utilitzen concentracions creixents de radiolligand fins saturar el receptor. Mitjançant la representació d'Scatchard (Scatchard, 1976) obtindrem l'afinitat del radiolligand pel receptor (K_D) i la densitat de receptors ($B_{màx}$).

Els assajos de fixació de radiolligands es van dur a terme "*in situ*" en cultius en placa de cèl·lules PC12, en preparacions de membranes de cèl·lules PC12, en preparacions crues de cervell de ratolí i d'escorça o hipocamp de rata.

Fixació de l' [³H]MLA, [³H]EB, [³H]Paroxetina i [³H]WIN35428

La [³H]Metillicaconitina (MLA) és un radiolligand que s'utilitza per marcar específicament els receptors nicotínics $\alpha 7$ (Davies i col., 1999).

Per aquest experiment s'utilitzaren plaques de 24 pous sembrades amb cèl·lules PC12 i preparacions crues de cervell. En el cas de realitzar l'assaig de fixació *in situ* en placa sembrada de 24 pous, es retira el medi de cada pou, es fan 2 rentats amb 1 ml de PBS i la reacció s'inicia quan s'afegeix a cada pou 0.5 ml de medi de diferenciació que contenen 3nM de [³H]MLA (60Ci/mmol; American Radiolabeled Chemicals INC., St.Louis, MO). En el cas de la preparació crua de cervell, s'afegeix als tubs 0.25 ml que contenen 500 μ g de proteïna i la reacció de fixació s'inicia en el moment de l'adició del tampó MLA 2x(ja que la proteïna està dissolta només en Tris-HCl 50 mM) que conté 3nM de [³H]MLA. La incubació es duu a terme durant 1 hora passada la qual la reacció d'unió es fixa posant les plaques o els tubs sobre gel (4^o). En el cas de les plaques, immediatament les cèl·lules són desenganxades per pipeteig i filtrades a través de filtres de fibra de vidre (Whatman Intl. Ltd. Maidstone, U.K.) prèviament tractats amb polietilenimina al 0.5%. El pouet i el filtre són rentats 4 cops amb tampó Tris-HCl 50 mM fred i la radioactivitat retinguda al filtre es mesura per escintil·lació líquida després de l'addició de 7 ml de líquid d'escintil·lació (Ultima Gold MV, Perkin Elmer). En el cas de preparacions crues de cervell el tub es renta 4 vegades amb tampó Tris-HCl fred. La unió inespecífica es determina en pous o tubs que contenen 1 μ M d'MLA no marcada i aquest valor es resta dels totals obtinguts en les diferents condicions.

En el cas de determinació de receptors nicotínics heteromèrics que contenen la subunitat $\beta 2$, utilitzem com a radiolligand la [³H]Epibatidina (EB, 55.5 Ci/mmol; Perkin Elmer, Boston, MA), a una concentració final de 1 nM i com a inespecífica 300 μ M de nicotina. El protocol de l'experiment és anàleg al descrit per la [³H]MLA, però incubant durant 2 hores a 37^oC en el cas de l'assaig *in situ* amb PC12 i a 25^oC en membranes.

Per tal de determinar la densitat de transportadors de serotonina (SERT) en escorça i en hipocamp de rata indicatiu de la neurodegeneració dels terminals serotoninèrgics per part de l'MDMA, es va mesurar la unió específica del radiolligand [³H]Paroxetina (22.9 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) a una concentració de

0.05 nM en preparació crua d'escorça i hipocamp de rata. La incubació es va dur a terme durant 2 h a 25°C en un tub que contenia 150 µg de proteïna en un volum final de 1.6 ml de tampó Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) amb NaCl 120 mM i KCl 5 mM. Com a unió inespecífica es va utilitzar Clomipramina 100 µM.

Per tal de determinar la densitat de transportadors de dopamina (DAT) en estriat de ratolí, es va mesurar la unió específica del radiol·ligand [³H]WIN35428 (76 Ci/mmol, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) a una concentració de 5 nM en una preparació crua d'estriat de ratolí. La incubació es va dur a terme durant 2 h en gel 4°C en un tub que contenia 50 µg de proteïna en un volum final de 0.25 ml de tampó PBS/Sacarosa pH 7.9. Com a unió inespecífica es va utilitzar Bupropió 10 mM. Cada experiment es va realitzar un mínim de 2 vegades amb resultats similars, realitzant-se en cadascun cada condició per triplicat.

Tampó Tris-HCl 50mM (pH 7.4)

Es prepara a partir del tampó Tris-Cl 1M que conté Tris base dissolt en H₂O MilliQ i s'ajusta el pH a 7.4 amb HCl. Es conserva a 4°C.

Tampó MLA 2X

Aquest tampó conté NaCl 240 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 4 mM, MgSO₄ 2mM i BSA 0.2% i es dissolen en Tris-HCl 50 mM. Es conserva a 4°C.

Tampó Paroxetina

Es tracta d'un tampó Tris-HCl 50 mM que conté NaCl 120 mM i KCl 5mM. Es conserva a 4°C.

PBS/Sacarosa pH 7.9

Es tracta d'un tampó fosfat que conté Fosfat sòdic monobàsic 7mM, fosfat sòdic dibàsic 93.2 mM i sacarosa 320 mM. Els fosfats es mantenen a 4°C, però la preparació del tampó amb la sacarosa és extemporània.

Saturació de l' [³H]MLA i [³H]EB

La reacció de saturació es duu a terme en tubs de vidre que contenen 0,25 ml de proteïna (que contenen o 50µg de suspensió cel·lular PC12 o 200 µg d'extracte de membranes cerebrals), 50 µl de radiolligand a concentracions creixents i 200 µl de tampó. La reacció de saturació s'inicia per l'addició dels 250 µl de suspensió cel·lular i els tubs s'incuben amb gel a 4 °C durant 2,30h per l' [³H]MLA i a 25 °C durant 2 hores per l' [³H]EB. La unió inespecífica es determina en presència d'1 µM d'MLA no marcada per l'MLA i de 300µM de nicotina no marcada per l'EB en les mateixes condicions descrites i es resta de la unió total en cadascuna de les condicions. Finalitzada la incubació, el radiolligand unit se separa del lliure mitjançant filtració utilitzant filtres de fibra de vidre. Els filtres s'introdueixen en vials d'escintil·lació i s'afegeix 7 ml de líquid Ultima Gold MV (Perkin Elmer, Boston, MA, US), quantificant-ne la radioactivitat present en un comptador de centelleig. Tant la K_D com la B_{max} es van calcular mitjançant una regressió no lineal amb el programa EBDA (Biosoft).

Competició de l' [³H]MLA i [³H]EB

En aquest assaig, prèviament s'obtenen les membranes de cèl·lules PC12 o la preparació crua de cervell de ratolí (menys cerebel). L'assaig és anàleg a l'assaig de fixació, és a dir, s'utilitzen concentracions creixents del compost a estudiar que competiran pel mateix lloc d'unio amb una concentració de radiolligand. En el cas de la competició amb [³H]MLA la incubació es desenvolupa a 4°C durant 2.5 hores.

Havent obtingut la K_D de l'assaig de saturació, mitjançant aquest assaig podem obtenir la K_i del fàrmac aplicant l'equació de Cheng i Prussof (1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + RL/K_D}$$

on RL és la concentració total de radiolligand, K_D és la constant de dissociació del radiolligand. Els valors de la K_D per les PC12 varen ser els obtinguts en els nostres

experiments (0.5 nM i 0.12 nM, [H^3]MLA i [H^3]EB respectivament. Els valors de la K_D per el cervell de rata es van obtenir de la literatura on diferents autors utilitzaven el mateix protocol; 2.2 nM per [H^3]MLA (Whiteaker i col., 1999) i 18 pM per [H^3]EB (Marks i col., 1998).

Anàlisi de dades

Mitjançant el programa Graphpad InStat (GrapPAD software, San Diego, CA) es van realitzar diferents tipus de comparacions entre grups. En el cas de comparacions entre un grup i el seu control es va utilitzar el test de la *t*-student. La comparació de les diferències entre les mitjanes dels diferents grups experimentals es va realitzar mitjançant un ANOVA d'una via, seguit de comparacions entre grups pel test de Tukey, considerant-se diferències significatives a partir d'un valor de $P < 0,05$.

Les saturacions es van analitzar amb el programa informàtic Radlig 6.0 (Biosoft) que, mitjançant ajust no lineal a 1 o 2 llocs proporciona els valors de K_D i B_{max} per ambdós radiolligands. Les corbes de competició es van calcular mitjançant un ajust de regressió no lineal utilitzant el programa GraphPAD Prism (GrapPAD software, San Diego, CA).

Reactius

El Tris, els components del tampó MLA i els inhibidors de proteases provenen de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

7. IMMUNOPRECIPITACIÓ

La immunoprecipitació dels receptors $\alpha 4\beta 2$ es va dur a terme mitjançant el protocol de Turner i Kellar (2005) efectuant algunes modificacions. Per a dur a terme aquesta tècnica es van utilitzar mostres de receptors solubilitzats d'escorça.

La incubació es va realitzar en tubs eppenderdorfs d'un volum final de 180 μ l que contenien 300 μ g de proteïna, [H^3]EB 1.5 nM i alhora, o contenien l'anticòs

d'alguna de les subunitats a detectar o, en el cas de determinar la immunoprecipitació inespecífica, el mateix volum de sèrum normal de conill en el cas de la subunitat $\alpha 4$ i IgG normal de rata per la subunitat $\alpha 4$. La incubació es va realitzar durant tota la nit a 4°C en agitació suau. A continuació, s'afegia Proteïna A-agarosa o Proteïna G Plus-agarosa per tal de precipitar les subunitats $\alpha 4$ o $\beta 2$, respectivament. L'agitació es va continuar durant 1 hora més. A continuació es van centrifugar les mostres a 7000 x g durant 5 minuts i es van retirar els sobrenedant. Als pellets obtinguts se'ls hi va afegir 0.75 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 7.4) i es van tornar a centrifugar per tal de netejar la mostra. Els pellets immunoprecipitats obtinguts es van dissoldre en 100 μ l de NaOH 1 N, es van transferir a vials d'escintil·lació on es va afegir líquid de centelleig i es va mesurar la radioactivitat. Els valors de radioactivitat que es van obtenir dels tubs que contenien Proteïna A-agarosa o Proteïna G Plus-Agarosa i s'havien incubat amb sèrum es utilitzar com a control de immunoprecipitació inespecífica.

Paral·lelament es va realitzar mesurar la unió d' $[^3\text{H}]$ EB en mostres paral·leles incubades en les mateixes condicions però en absència de anticòs i de proteïna agarosa. Després de l' incubació durant tota la nit en agitació, es va filtrar la mostra a través del filtre Whatman GF-B mitjançant l'aparell de filtració Filter Harvester (Perkin Elmer, Boston, MA, US). A continuació, es va afegir líquid de centelleig en els vials que contenien els filtres i es va mesurar la radioactivitat. La unió inespecífica es va determinar en presència de Nicotina (300 μ M).

Reactius

L'Anticòs policlonal de conill contra la subunitat $\alpha 4$ prové de Abcam (Cambridge, UK) i l'anticòs monoclonal contra la subunitat $\beta 2$ (mAb290) és de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). El sèrum normal de conill va ser obtingut del servei d'estabulari de la Facultat de Farmàcia (Universitat de Barcelona). Les IgG de rata són de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA). La proteïna A-agarosa i la proteïna G Plus-Agarosa són de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

8. MESURA DE L'ENTRADA DE CALCI I SODI PER FLUORIMETRIA

Per dur a terme aquest experiment se van utilitzar plaques multipous de parets fosques de 96 pous (Corning-Costar, Schipjol-Rijk, Netherlands) col·lagenades en les quals se sembraren les cèl·lules PC12, en el cas de calci, i cèl·lules corticals de cultius primaris de ratolí en el cas del sodi, i es va realitzar el comptatge en cambra de Neubauer per tal de tenir una concentració de 300.000 cèl./ml que representaran 60000 cèl./pou normalment el dia abans de l'experiment. Es va retirar el medi de manteniment i es va afegir tampó Tyrode (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 0.86 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaH₂PO₄*1H₂O, Glucosa 5.5 mM, H₂O MilliQ q.s.p. 0.5 l.) que contenia probenecid 2 mM i el fluorocrom dissolt en una solució de DMSO/plurònic, a una concentració de 6 µM, durant 40 minuts. A continuació es va retirar el medi i es va afegir el medi de desesterificació que conté tampó Tyrode i probenecid, i si és necessari, el modul·lador al·lostèric α7, PNU120596. La fluorescència emesa per les cèl·lules es determina en un espectrofluorímetre Perkin Elmer-VICTOR3. Durant 10 segons es fa una lectura de la fluorescència basal del pou i a continuació, mitjançant un dispensador del Victor-3, es dispensa el fàrmac d'interès i es fa una lectura de 35 segons, temps en el qual la resposta es fa estable.

El Fluo-4 o el CoroNa Green (Molecular probes; Leiden, Netherlands) són fluorocroms indicadors de Ca²⁺ i Na⁺, respectivament, i es troben en forma d'acetoximetilèster inactiu, el qual és permeable i per tant travessa la membrana citoplasmàtica de les cèl·lules. Un cop és captat, es desesterifica per les esterases intracel·lulars i passa a la forma reactiva amb el Ca²⁺ o el Na⁺, la qual no és permeable, però que pot ser secretada a l'exterior a través d'un transportador (multidrug resistance transporter). Per evitar aquesta secreció, la càrrega i l'experiment es van fer en presència de probenecid en el medi, que bloqueja aquest transportador.

Per tal de poder normalitzar les dades obtingudes, s'obté de cada pou l'Fmàx i l'Fmín. Aquests dos paràmetres permeten conèixer la fluorescència màxima i mínima (respectivament) emesa per les cèl·lules de cada pou en cada lectura. Així, els valors de fluorescència (comptes) obtingudes en cada pou s'expressen com a percentatge de (Fmàx - Fmín), que és el rang on es mouran els valors de fluorescència per cada pou.

Determinació d' $F_{m\grave{a}x}$ i $F_{m\grave{i}n}$

Partint del fet, que cada pou ja comporta una certa fluorescència degut al Ca^{2+} o Na^+ intracel·lular de les cèl·lules i que existeix una fluorescència de fons, es van afegir reactius com el $MnCl_2$ o l' EGTA (en el cas del $F_{m\grave{i}n}$), que desplacen o s'uneixen al Ca^{2+} i no permeten que reaccioni amb el Fluo-4. D'aquesta manera es va poder determinar la fluorescència de fons. En el cas dels experiments de Na^+ , l' $F_{m\grave{i}n}$ es va determinar mitjançant la lectura d'un pou que contenia cèl·lules carregades amb el fluorocrom però en un medi sense Na^+ . Per una altra banda, es van afegir reactius com el Tritó X-100 o la ionomicina, que trenquen o provoquen porus en les membranes cel·lulars, respectivament, permetent que tot el Ca^{2+} disponible en el medi pogués reaccionar amb el fluorocrom o Gramicidina en el cas del Na^+ , així es van obtenir els valors d' $F_{m\grave{a}x}$.

Els valors normalitzats com a % d' $F_{max}-F_{min}$ es representen gràficament utilitzant el programa Microsoft Excel o GraphPAD Prism i la resposta neta induïda per un fàrmac es quantifica en cada pou com la diferència entre els valors de fluorescència obtinguts després i abans de l'addició de l'estímul. Per a cada condició experimental, el resultat es presenta com la mitjana \pm error estàndard de 4 pous per experiment, repetint-se cada experiment un mínim de 3 vegades.

La comparació de les diferències entre les mitjanes dels diferents grups experimentals es va realitzar mitjançant un ANOVA d'una via, utilitzant el programa GraphPAD Instat, seguit de comparacions entre grups pel test de Tukey, considerant-se diferències significatives a partir d'un valor de $P < 0,05$.

Reactius

El plurònic prové de Molecular Probes (Leiden, Netherlands). Els components del tampó Tyrode, el probenecid, la ionomicina i l'EGTA provenen de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).

9. IMMUNODETECCIÓ DE PROTEINA PER WESTERN BLOT

La tècnica de Western blot és una tècnica analítica utilitzada per detectar proteïnes específiques en una mostra complexa de proteïnes. En primer lloc se separen les proteïnes mitjançant una electroforesi en gel, aquesta separació es basa en criteris de pes molecular, hidrofobicitat, estructura. A continuació les proteïnes són transferides a una membrana de bifluorur de polivinilidè (PVDF) on mitjançant la incubació amb anticossos específics detectarem les proteïnes d'interès.

Per a realitzar aquesta tècnica es van tractar cèl·lules PC12 en plaques de 92 mm i es van utilitzar extractes de nucli, citoplasma o mitocondri per a determinar la P65 i la GSK-3; extractes totals de cèl·lules PC12 per a determinar l' α -espectrina i receptors solubilitzats per determinar les subunitats $\alpha 7$ i $\alpha 4$.

Electroforesi

En primer lloc es preparen els gels de poliacrilamida, formats per la copolimerització d'acrilamida i bisacrilamida en el sistema mini Protean 3 de BioRad. El gel està format per 2 parts: el gel concentrador, el qual té una concentració baixa de polímer i permet que les proteïnes es disposin en la mateixa posició de sortida abans de començar a separar-se, i el gel de separació, encarregat de la separació de les proteïnes. La concentració d'acrilamida-bisacrilamida que s'utilitza depèn de la mida de la proteïna. Normalment s'utilitzen gels de separació amb una concentració del 10%, però en alguns casos, quan la proteïna té un pes molecular inferior a 20KDa s'utilitzen gels de separació del 15%. La reacció de polimerització no s'inicia fins l'adició de TEMED i persulfat d'amoni.

Gel concentrador (stacking) 5%: Per un volum de 5 ml, Acrilamida-bisacrilamida (40%) 0.625 ml ; Tris-HCl (1M, pH 6.8) 0.625 ml; SDS (10%) 0.05 ml; TEMED 5 μ l; Persulfat d'amoni (10%) 25 μ l; H₂O MilliQ 3.795 ml.

Gel separador 10%: Per un volum de 7.5 ml, Acrilamida-Bisacrilamida (40%) 1.9 ml; Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8) 1.875 ml; SDS (10%) 0.085 ml; TEMED 5 µl; Persulfat d'amoni (10%) 0.05 ml; H₂O MilliQ 3.585 ml.

La mostra que es carrega en el gel té un volum de 30-40 µl que contenen 30-40 µg de proteïna i es barreja amb el tampó de mostra (sample buffer) que conté agents reductors que desnaturalitzen les proteïnes.

Sample Buffer 4X: SDS (10%) 3.2 ml; Glicerol 1.6 ml; Tris-HCl (pH 6.8) 2 ml; β-mercaptoetanol (10%) 0.8 ml; Blau bromofenol (0.1%) 0.4 ml.

Abans de carregar les mostres s'escalfen a 95-100°C en bany sec durant 5 minuts per una correcta desnaturalització de les proteïnes.

La migració de les proteïnes es duu a terme en una cubeta que conté un tampó específic de migració (Tampó 1X a partir de tampó migració stock 10X: Tris base 25 mM; Glicina 192 M; SDS 0.1%; qs H₂O MilliQ). Es fixa el voltatge constant a 100 V durant 10 minuts per a que les proteïnes es disposin en el mateix punt de sortida en el gel concentrador, i a continuació es canvien les condicions a intensitat constant de 35 mA per la separació de les proteïnes.

Electrotransferència

A continuació les proteïnes es transfereixen del gel a una membrana de fluorur de polivinilidè (PVDF; Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, USA). S'utilitza un suport de sandvitx que permet la fixació de la posició del gel en contacte amb la membrana durant tot el procés de transferència. El suport es col·loca dins una cubeta amb un tampó de transferència en fred (Tris base 25 mM; Glicina 192 M; Metanol 10%; qs H₂O MilliQ) durant 2 hores a una intensitat constant de 0.2 A.

Immunodetecció

Aquesta etapa consisteix en la incubació de la membrana amb un anticòs primari específic de la proteïna d'interès seguit de la incubació amb un anticòs secundari que es caracteritza per tenir conjugat l'enzim peroxidasa per a la detecció quimioluminescent posterior amb el reactiu ECL Western blotting Analysis System (Immobilion Western, Millipore, Billerica, MA, USA). El revelat i la quantificació de la senyal obtinguda es duu a terme mitjançant l'aparell de quantificació Quantity One software o mitjançant el revelatge amb film fotogràfic en cambra fosca.

Previ a l'incubació amb l'anticòs primari, s'incuba la membrana durant 1 hora amb llet de bloqueig (5% llet en pols en TBS-T). A continuació els protocols utilitzats per a cada anticòs van ser els següents:

- En el cas de la detecció de l' α -espectrina es va incubar la membrana durant 2 hores a temperatura ambient amb l'anticòs monoclonal de ratolí anti α -espectrina (MAB1662; Chemicon, Temecula, USA; dilució 1:5000 en llet de bloqueig). A continuació es van fer 3 rentats en TBS-T i es va incubar la membrana durant 45 minuts amb l'anticòs secundari anti-IgG de ratolí conjugat amb la peroxidasa (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; dilució 1:2500 en TBS-T).

- Per la detecció de la subunitat P65 de l'NF κ B es va incubar la membrana tota la nit (o/n) a 4°C amb l'anticòs policlonal de conill p65 (acetyl K310) (ab19870; Abcam, Cambridge, UK; dilució 1:1000 en llet de bloqueig). A continuació es van fer 3 rentats amb TBS-T i es va incubar la membrana durant 1 hora amb l'anticòs secundari anti IgG de conill (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; dilució 1:5000 en TBS-T).

- Per la detecció de la GSK-3 es va utilitzar l'anticòs policlonal de conill Phospho-GSK-3 β (ser9) (9336; Cell Signaling Technology, Beverly, MA; dilució 1:1000 en llet de bloqueig) o/n a 4°C. A continuació es van fer 3 rentats amb TBS-T i es va incubar la membrana durant 1 hora amb l'anticòs secundari anti IgG de conill (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; 1:5000 en TBS-T).

-Per la detecció del Citocrom C en el citoplasma, es va utilitzar l'anticòs policlonal de conill o/n a 4°C (ab53056; Abcam Cambridge, UK; dilució 1:1000 en llet de bloqueig). Es van fer 3 rentats per eliminar l'anticòs no unit, i a continuació es va incubar durant 1 hora amb l'anticòs secundari anti IgG de conill (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; 1:5000 en TBS-T).

- En el cas de les subunitats $\alpha 4$ i $\alpha 7$, es van incubar les membranes durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs monoclonal de rata per la subunitat $\alpha 7$ (ab23832; Abcam, Cambridge, UK; dilució 1:1000) i l'anticòs de conill policlonal per la subunitat $\alpha 4$ (ab41172; Abcam, Cambridge, UK; dilució 1:1000). A continuació es van fer 3 rentats en TBS-T i es van incubar les membranes amb l'anticòs secundari de cabra anti-IgG de rata (Merck Calbiochem, Germany; dilució 1:5000) per l' $\alpha 7$ i l'anticòs secundari d'ase anti-IgG de conill (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; dilució 1:7500) pel $\alpha 4$.

Per tal d'assegurar-se que en cada pou del gel d'electroforesi es va carregar la mateixa concentració de proteïna es van incubar les membranes amb anticossos contra alguna proteïna estructural cel·lular diferent per cadascuna de les preparacions utilitzades.

-En el cas de proteïna total o receptors solubilitzats de cèl·lules PC12 o de rata/ratolí, es van incubar les membranes durant 1 hora amb l'anticòs primari per la β -actina (A-5441; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA, dilució 1:2500). Es van fer 3 rentats amb TBS-T i es va utilitzar l'anticòs secundari anti-IgG de ratolí (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; dilució 1:2500 en TBS-T).

-El control positiu de citoplasma va ser l'enzim gliceraldehid-3-fosfat deshidrogenasa (GAPDH) (MAB374; Chemicon, Temecula, USA, dilució 1:2000). Es van fer 3 rentats amb TBS-T i es va incubar amb l'anticòs secundari anti-IgG de ratolí (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; dilució 1:5000).

-Com a control positiu de nucli, es va utilitzar l'anticòs primari que detectava inespecíficament proteïna nuclear neuronal (NeuN) (MAB377; Chemicon, Temecula,

USA, dilució 1:1000). A continuació 3 rentats amb TBS-T, i es va incubar amb l'anticòs secundari anti IgG de ratolí (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; dilució 1:5000).

Reactius

Els components dels tampons de migració, transferència, TBS-T, i sample buffer provenen de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

10. ELECTROFISIOLOGIA

Aquesta tècnica es va realitzar en col·laboració amb el laboratori del Dr. Gandía de l' Institut Teófilo Hernando, Departament de Farmacologia i Terapèutica, Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Madrid.

Preparació dels ARNm de les subunitats del receptor nicotínic humà i expressió en ovòcits de *Xenopus*

Els cADNs de les subunitats $\alpha 7$, $\alpha 4$, i $\beta 2$ del receptor nicotínic neuronal humà es van insertar en un vector d'expressió pSP64T. Els detalls del protocol de preparació de vectors d'expressió estan descrits per Criado i col. (2005). Després de la linearització per enzims de restricció, el ADN es purifica per precipitació amb etanol i es sintetitza *in vitro* el ARNm mitjançant la ARN polimerasa SP6 i el kit mMESSAGEMACHINE kit (Applied Biosystems Hispania, Madrid, Spain). A continuació es purifica el ARNc mitjançant la extracció amb fenol-cloroform i la precipitació amb isopropanol. Es manté a -80°C .

Com a donants d'ovòcits es van utilitzar femelles adultes dels gripaus africans *Xenopus laevis*. Els *Xenopus* s'anestesiaven col·locant-los durant 30 minuts en una solució de 2g/L de tricaina (etil 3-aminobenzoat metanosulfonat). L'extracció d'ovòcits es dur a terme mitjançant una incisió en l'abdomen.

Un cop extrets els ovòcits, es retira la capa fol·licular mitjançant el tractament amb col·lagenasa 0.5 mg/ml dissolta en el tampó Barth sense calci (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 7.5 mM Tris, buffered to pH 7.4 with HCl) a temperatura ambient durant 45 minuts. A continuació s'injecta en els ovòcits defol·liculats 46 nl d'ARNm a una concentració final de 250 ng/μl i s'incuben durant 3-5 dies en tampó Barth amb calci (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 7.5 mM Tris, 0.41 mM CaCl₂, 0.33 Ca(NO₃)₂; pH 7.4; 10 U/ml penicilina i 10 μg/ml estreptomina) a 16–18°C. Els ovòcits són examinats als 3-5 dies per a determinar la funcionalitat dels nAChRs.

Registre dels corrents iònics

Els corrents iònics s'enregistren mitjançant la tècnica de dos electrodes (Campos-Caro i col., 1997) utilitzant microelectrodes amb resistències de borosilicat de 0.2-1 MΩ (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) que contenen KCl 3 M.

El ovòcit es disposa en una cambra de volum 0.6 ml que conté una solució (mM) amb 82.5 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 BaCl₂, 1 MgCl₂, i 5 HEPES, pH 7.4; s'utilitza bari en lloc de calci per a minimitzar els corrents a través dels canals de clorur dependents de calci (Sands, 1993). Els registren es fan a temperatura ambient i els resultats s'analitzen amb el software de pCLAMP 5.2 Digidata 1200 Interface (Axon Instruments, Union City, CA, USA). El potencial de membrana es va fixar a -70 mV. Els corrents es van filtrar a 1000 Hz amb un filtre Bessel. Per aplicar els agonistes es va utilitzar una pipeta activada per la gravetat amb un diàmetre intern de 1.2 mm i amb la punta propera a l'equador de l'ovòcit. El flux de la solució que conté els agonistes va ser de 12 ml/min, i la taxa de perfusió de 7 ml/min. Aquest sistema de perfusió permet un ràpid canvi de solució i alhora una disposició heterogènia de la concentració de fàrmac dispensat.

Es van fer registres amb els ovòcits que no havien estat injectats per a assegurar que no hi havia resposta de fons. Els resultats es van expressar en forma de corbes concentració-resposta utilitzant la mitjana dels corrents obtinguts ± SEM.

Mitjançant el programa Origin (Microcalc Software Inc.) es van extrapolar els valors de les respostes corresponents a la corba d'inhibició concentració dependent a la següent equació dosi-resposta:

$$Y=A_1+[A_2-A_1]/[1+10^{[(\log(X_0)-X)*p]}]$$

on Y representa la resposta que es dona en forma de corrent iònic a una concentració determinada d'agonista (X). A_2 és la concentració del lligand que produeix la resposta màxima; A_1 és la concentració del lligand que dona lloc a la resposta mínima; X_0 correspon a la IC_{50} del lligand i p representa el coeficient de Hill.

Les dades de la corba estan expressades com a percentatge de la resposta d'ACh 100 μ M. Per a determinar les diferències entre grups s'utilitza el test estadístic ANOVA/Manova i el test de Duncan. El valor de $P \leq 0.05$ s'utilitza com a límit de significació.

11. COMPOSTOS

La barreja racèmica d'MDMA prové del Laboratori de drogues de la delegació del Ministeri de Sanitat de Barcelona. Els enantiòmers de l'MDMA R(-) i S(+) es van obtenir del Institut Nacional de Drogues d'abús (NIDA; Bethesda, MD, USA).

La S(+)METH i la R(-) METH provenen de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

L'H-89 és de Calbiochem (LaJolla, CA, USA).

El GF9203X, el 5-I-A-85380 dihidroclorur (5-I-A), el PNU120596, el PNU282987 són de Tocris (Avonmouth, UK).

L'Acetilcolina (ACh), la Metillicaconitina (MLA), la dihidro- β -eritroidina (DBE), el dantrolè (DANT), el nitrendipí (NDP), el 2-aminoetil-fenil-borat (2-APB), el clorur de cadmi ($CdCl_2$), l' α -Bungaroxina (α -Bgtx), la cicloheximida (CHX), la ciclosporina A (CsA), la brefeldina A (BFA), la genisteïna, la nicotina (NIC), el bupropió i la clomipramina són de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).

Resultats

1. ASSAIGS DE COMPETICIÓ

Desplaçament de l' [³H]MLA per MDMA i METH

Es van realitzar assaigs de competició en membranes de cèl·lules PC12 diferenciades. Tant la METH com l'MDMA van desplaçar de manera concentració-dependent la unió específica de l' [³H]MLA en aquestes cèl·lules, mostrant l'MDMA una major afinitat pels receptors nicotínics $\alpha 7$.

La K_i per la METH va ser de $283 \pm 109 \mu\text{M}$, mentre que la de l'MDMA va ser de $15,35 \pm 1,03 \mu\text{M}$. Els coeficients de Hill (n_H) per ambdues drogues no varen diferir entre ells, presentant uns valors $1,20 \pm 0,15$ i $1,35 \pm 0,11$ respectivament, i no diferents de 1.

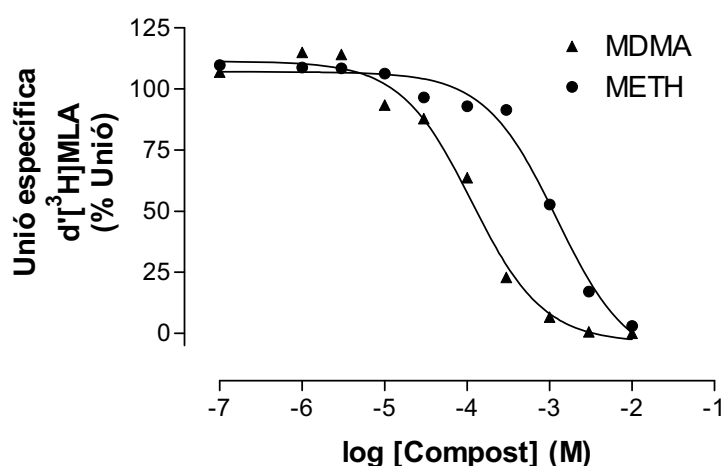


Fig. 1. Corbes representatives de l'assaig de competició on l'MDMA i la METH inhibeixen la unió de la [³H]MLA en cèl·lules PC12. Les corbes es van calcular mitjançant una aproximació no lineal de quadrats mínims i ajustant a un model d'un sol lloc d'unió. Les dades representen la mitjana de duplicats. Els resultats obtinguts es van realitzar almenys 3 vegades obtenint resultats similars.

En el cas dels assajos en extracte de cervell de ratolí, la K_i per la METH va ser de $369.77 \pm 95.61 \mu\text{M}$ mentre que la de l'MDMA va ser de $34.21 \pm 6.71 \mu\text{M}$. En aquest cas els coeficients de Hill van diferir de 1 (0.40 ± 0.27 i 0.29 ± 0.08 , MDMA i METH respectivament) el qual indica una interacció més complexa.

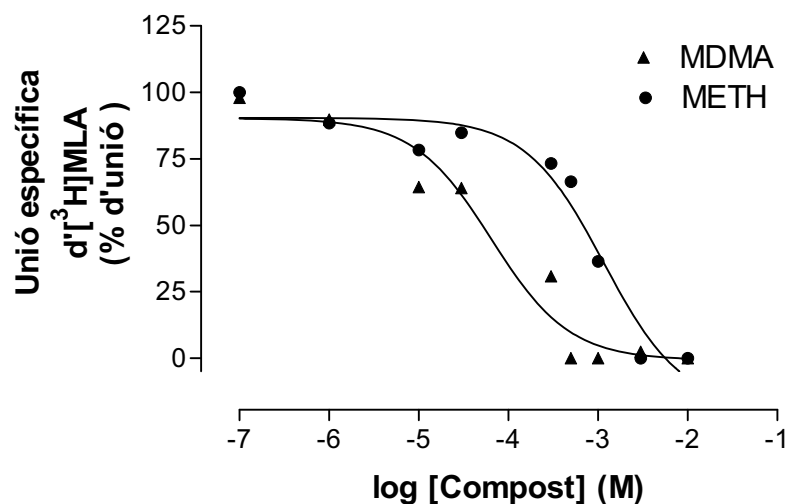


Fig. 2. Corbes representatives de l'assaig de competició on l'MDMA i la METH inhibeixen la unió de la $[^3\text{H}]$ MLA en cervell total de ratolí. Les corbes es van calcular mitjançant una aproximació no lineal de quadrats mínims i ajustant a un model d'un sol lloc d'unió. Les dades representen la mitjana de duplicats. Els resultats obtinguts es van realitzar almenys 3 vegades obtenint el mateix resultat.

No es van realitzar assajos de competició d' $[^3\text{H}]$ MLA amb la d-Amfetamina ja que treballs previs del nostre grup (Chipana i col., 2008) van demostrar la baixa afinitat de la d-Amfetamina pels receptors nicotínics $\alpha 7$.

Desplaçament de l' $[^3\text{H}]$ Epibatidina

Com en l'assaig anterior, tant la METH com l'MDMA van desplaçar de manera concentració-dependent la unió específica de l' $[^3\text{H}]$ EB en cèl·lules PC12 diferenciades. En aquest cas l'MDMA també va presentar una major afinitat pels receptors que en aquest cas eren receptors heteromèrics. Però cal destacar que en aquest cas, l'afinitat de la METH pels receptors heteromèrics va ser més elevada que en el cas dels $\alpha 7$.

La K_i per la METH va ser de $155,36 \pm 5,36 \mu\text{M}$, mentre que la de l'MDMA va ser de $25,71 \pm 3,13 \mu\text{M}$. Els coeficients de Hill per ambdues drogues no varen diferir entre ells, presentant uns valors $0,76 \pm 0,11$ i $0,92 \pm 0,04$ respectivament, no diferents de 1 ($P > 0,05$).

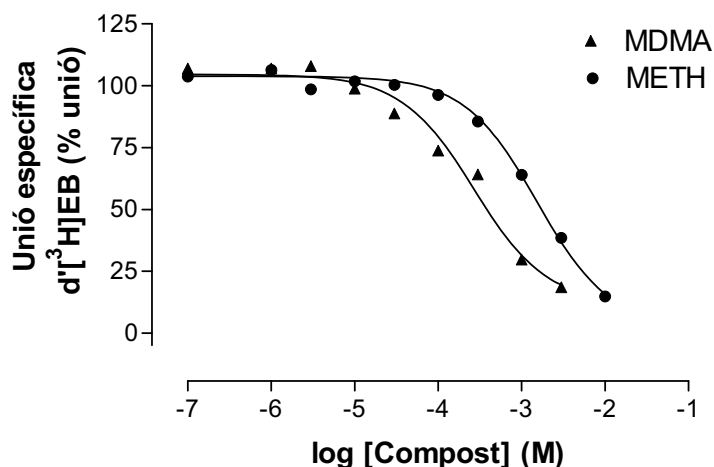


Fig. 3. Corbes representatives de l'assaig de competició on l'MDMA i la METH inhibeixen la unió de la $[^3\text{H}]\text{EB}$ en PC12. Les corbes es van calcular mitjançant una aproximació no lineal de quadrats mínims i ajustant a un model d'un sol lloc d'unió. Les dades representen la mitjana de duplicats. L'experiment es va realitzar almenys 3 vegades obtenint resultats similars.

En el cas dels assajos en extracte de cervell de ratolí, la K_i per la METH va ser de $23.9 \pm 2.65 \mu\text{M}$ mentre que la de l'MDMA va ser de $0.76 \pm 0.11 \mu\text{M}$. Els coeficients de Hill per ambdues drogues no varen diferir entre ells, presentant uns valors pròxims a 1: $0,83 \pm 0,12$ i $1,27 \pm 0,28$ respectivament ($P > 0.05$).

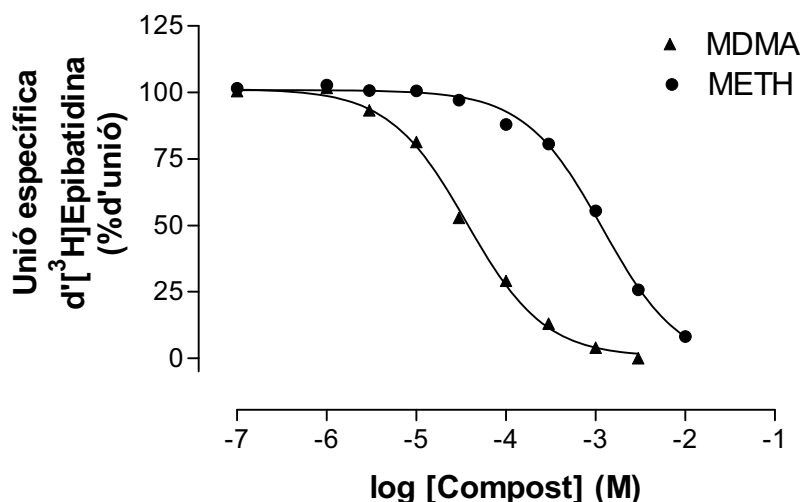


Fig. 4. Corbes representatives de l'assaig de competició on l'MDMA i la METH inhibeixen la unió de la $[^3\text{H}]\text{Epibatidina}$ en cervell total de ratolí. Les corbes es van calcular mitjançant una aproximació no lineal de quadrats mínims i ajustant a un model d'un sol lloc d'unió. L'experiment es va realitzar almenys 3 vegades obtenint resultats similars.

Es van dur també a terme assajos de competició amb la d-Amfetamina en membranes d'escorça de cervell de rata. La K_i va ser de $66 \pm 3.2 \mu\text{M}$, i el coeficient de Hill va ser de 1.47 ± 0.11 , diferent de 1 ($P < 0.05$).

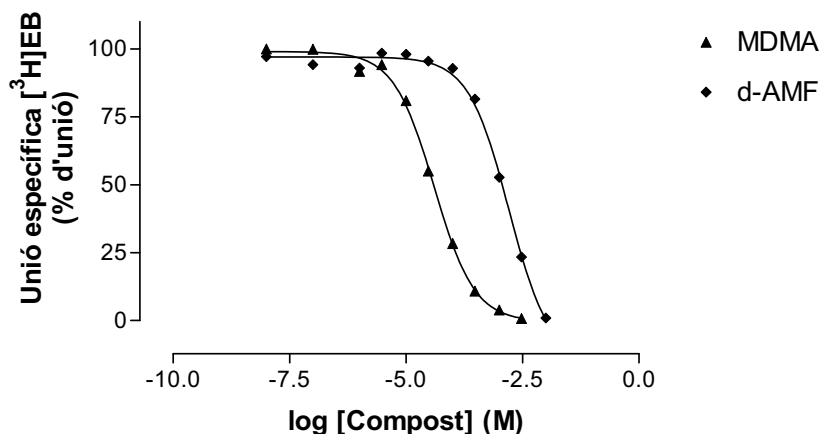


Fig. 5. Corbes representatives de l'assaig de competició on l'MDMA i la d-Amfetamina inhibeixen la unió de la $[^3\text{H}]EB$ en escorça de rata. Les corbes es van calcular mitjançant una aproximació no lineal de quadrats mínims i ajustant a un model d'un sol lloc d'unió. Les dades representen la mitjana de duplicats. L'experiment es va realitzar almenys 3 vegades obtenint resultats similars.

Compostos	PC12		CV ratolí	
	K_i (μM)	n_H	K_i (μM)	n_H
S(+)-METH	283 ± 109	1.2 ± 0.15	369.77 ± 95.61	$0.29 \pm 0.08^{**}$
(+/-)-MDMA	15.35 ± 1.03	1.35 ± 0.11	34.21 ± 6.71	$0.40 \pm 0.27^*$

Taula 1. K_i de l'MDMA i la METH per als nAChR $\alpha 7$ en cèl·lules PC12 i extracte de cervell de ratolí. Els valors de la K_i es van obtenir a partir de les corbes de competició dels assaigs d'unió d' $[^3\text{H}]MLA$ i van ser calculades amb l'equació de Cheng-Prusoff. Les dades representades són la mitjana \pm EEM de 3 experiments similars. *vs la unitat; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Compostos	PC12		CV ratolí	
	K _i (μM)	n _H	K _i (μM)	n _H
S(+)-METH	155.36 ± 5.36	0.76 ± 0.11	23.90 ± 2.65	1.27 ± 0.28
(+/-)-MDMA	25.71 ± 3.13	0.92 ± 0.04	0.76 ± 0.11	0.83 ± 0.12

Taula 2. K_i de l'MDMA i la METH per als nAChR α4β2 en cèl·lules PC12 i en extracte de cervell de ratolí. Els valors de la K_i es van obtenir a partir de les corbes de competició dels assaigs d'unió d'[³H]EB i van ser calculades amb l'equació de Cheng-Prussoff. Les dades representades són la mitjana ± EEM de 3 experiments similars.

Compost	CV rata	
	K _i (μM)	n _H
D(+)-AMF	66 ± 3.2	1.47 ± 0.01*

Taula 3. K_i de la D-Amfetamina per als nAChR α4β2 en extracte de cervell de rata. Els valors de la K_i es van obtenir a partir de les corbes de competició dels assaigs d'unió d'[³H]EB i van ser calculades amb l'equació de Cheng-Prussoff. Les dades representades són la mitjana ± EEM de 3 experiments similars. *vs la unitat; *P<0.05.

Increment en la densitat de receptors nicotínics *in vitro*

Així com està descrit per la nicotina, el pretractament de les cèl·lules amb METH i MDMA (en ambdós casos a la concentració de 300 μM) va provocar un increment en el nombre de receptors, tant en el cas dels receptors homomèrics com els heteromèrics. Aquest increment va ser màxim per les dues amfetamines a les 48 hores però ja es podia percebre a les 6 hores de pretractament.

L'MDMA va induir un major increment respecte la METH a les 24 hores, tant en el cas de l'assaig d'[³H]MLA com en l'assaig d'[³H]EB.

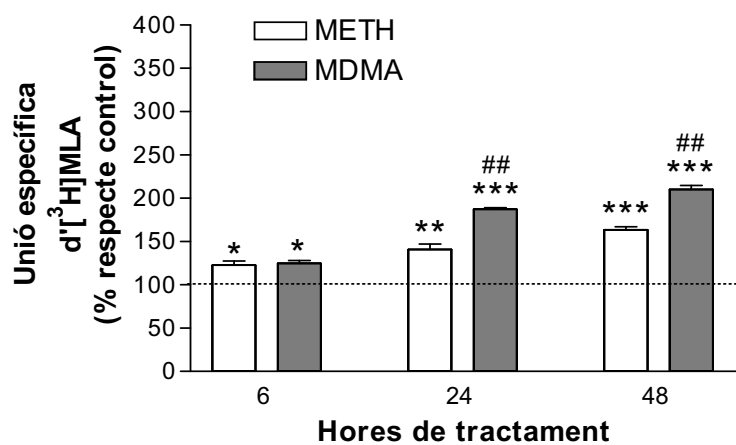
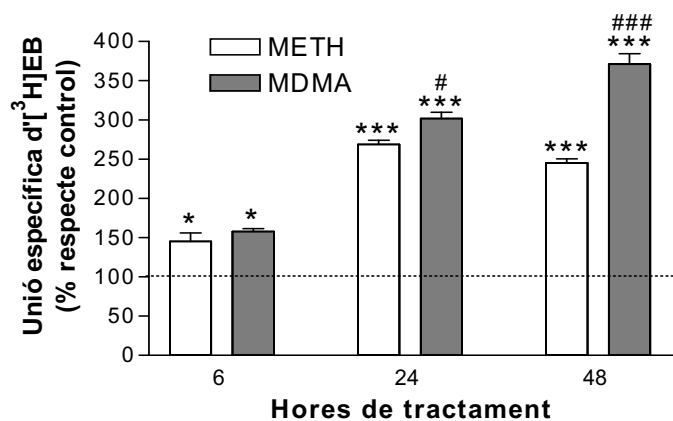
A**B**

Fig. 6. Efecte del pretractament amb METH i MDMA en la densitat de receptors $\alpha 7$ (A) i heteromèrics $\beta 2$ (B). Les cèl·lules PC12 diferenciades es van pretractar amb METH i MDMA (300 μ M) durant 6, 24 i 48 h passades les quals es van rentar i es va determinar la unió de [3 H]MLA i [3 H]EB. * : comparació vs control; #: comparació entre els grups marcats. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

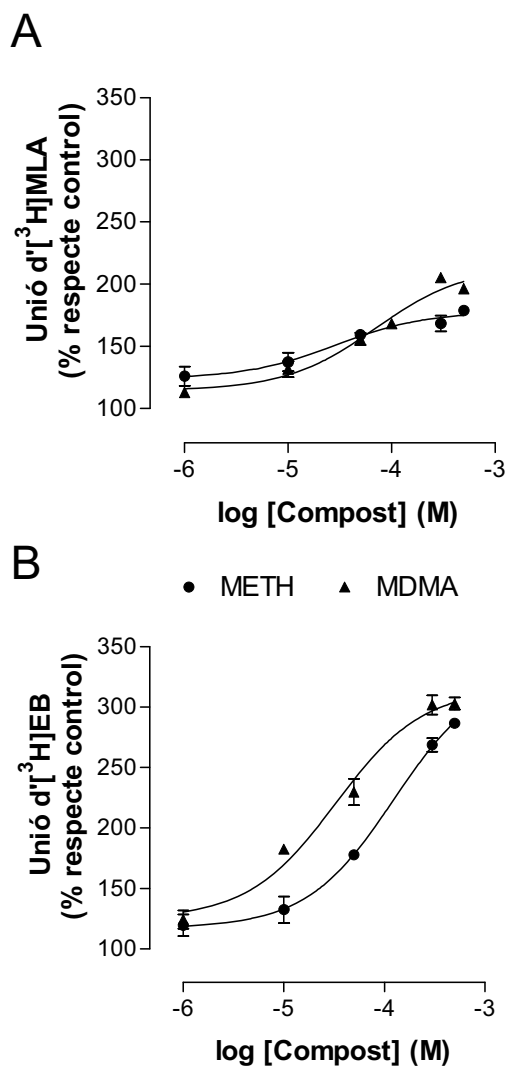


Fig. 7. Corbes concentració-resposta de l'MDMA i la METH sobre la unió de (A) l' $[^3\text{H}]$ MPLA i (B) l' $[^3\text{H}]$ EB en cèl·lules PC12 diferenciades. Les cèl·lules van ser tractades durant 24 hores amb diferents concentracions d'MDMA i METH i a continuació es va realitzar l'assaig d'unió dels radiol·ligands. Les dades estan expressades com a percentatge de l'increment respecte el control i representades com a mitjana \pm EEM. Tots els increments són significatius respecte les cèl·lules no tractades.

Es va determinar la regulació a l'alça induïda per la D-AMF sobre els nAChR $\alpha 4\beta 2$. A la concentració de 100 μM a les 6 hores ja va induir un increment molt significatiu ($P < 0.01$ vs Control) de la població de nAChR $\alpha 4\beta 2$.

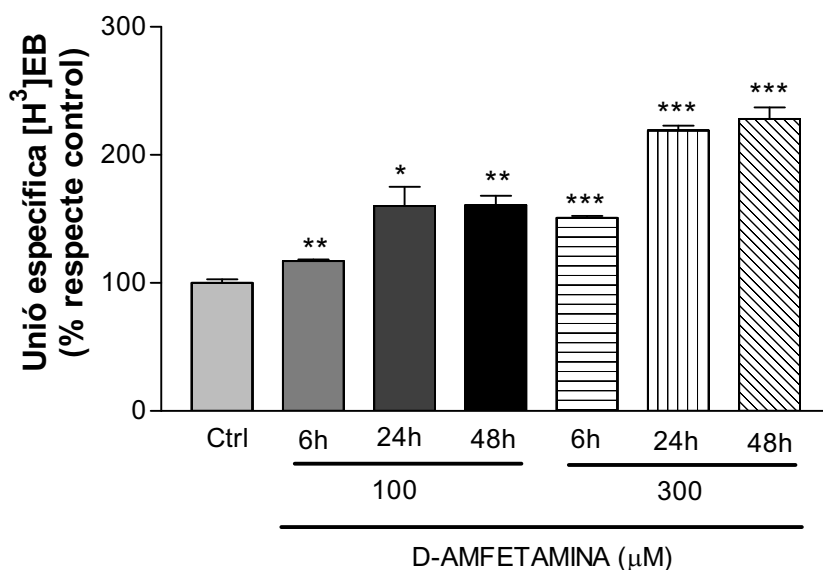


Fig. 8. Efecte del pretractament amb D-AMF en la densitat de receptors heteromèrics β_2 . Les cèl·lules PC12 diferenciades es van pretractar amb D-AMF (100 i 300 μM) durant 6, 24 i 48 h passades les quals es van rentar i es va determinar la unió de l' $[^3\text{H}]\text{EB}$. * : comparació vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

2. ASSAIGS DE SATURACIÓ

Determinació de la B_{max} i la K_D

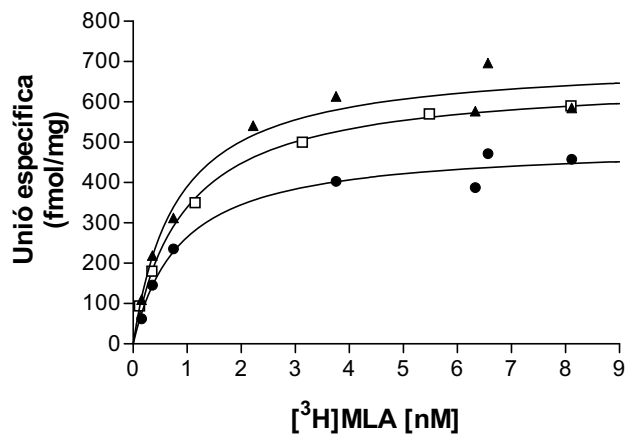
Es van dur a terme assajos de saturació per a determinar si l'increment de unió detectat ve donat per l'augment en el nombre de receptors o perquè varia l'afinitat del receptor pel lligand. Es van utilitzar membranes de cèl·lules PC12 diferenciades no tractades (control) i tractades amb 100 μM de METH i MDMA.

Respecte l'assaig de saturació d' $[^3\text{H}]\text{MLA}$, ajustant els valors a un sol lloc d'unió, s'observa que el tractament amb MDMA incrementa la densitat dels α_7 . Els valor obtinguts per la B_{max} van ser: Control 532 ± 43 fmol/mg, METH: 690 ± 16 fmol/mg, $P < 0,05$ vs. control; MDMA: 787 ± 62 fmol/mg, $P < 0,01$ vs. Control. En canvi, l'afinitat no varia en cap dels casos, els valors de la K_D van ser: Control: $0,43 \pm 0,26$ nM, METH: $0,65 \pm 0,21$ nM, MDMA: $0,51 \pm 0,16$ nM, ambdós casos $P > 0,05$ vs control.

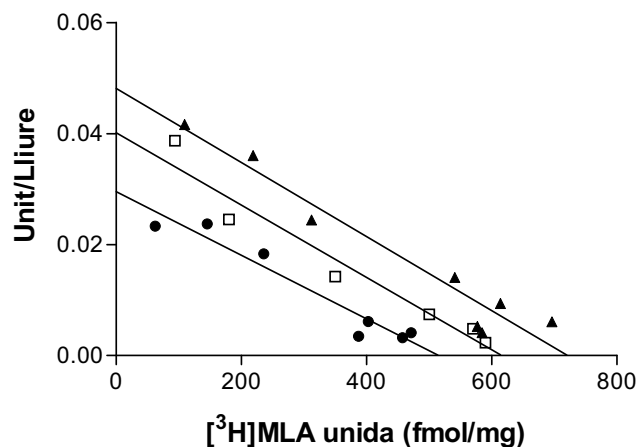
Respecte l'assaig de saturació d' $[^3\text{H}]\text{EB}$, els valor s'ajustaven millor a un model de dos llocs per regressió lineal, que defineixen un estat d'alta afinitat i un de baixa

afinitat del receptor. Cal tenir present que l'agonista [³H]EB marca millor el lloc d'alta afinitat, mentre que la [³H]MLA, al tractar-se d'un antagonista, marca els receptors independentment de l'estat, per aquesta raó, s'ajusta solament a un lloc d'unió. El tractament amb METH i MDMA va provocar un increment en la densitat de receptors en l'estat d'alta afinitat; els valors de la B_{max} per aquest lloc van ser: Control: 57 ± 9 fmol/mg, METH: 96 ± 10 fmol/mg, $P < 0,05$ vs. control; MDMA: 129 ± 15 fmol/mg, $P < 0,05$ vs. control. En canvi, les afinitats per aquest lloc no van variar; els valors de la K_D van ser: Control: 109 ± 20 pM; METH: 105 ± 15 pM; MDMA: 122 ± 9 pM; $P > 0,05$ vs. control.

A ● Ctrl ▲ MDMA □ METH



B



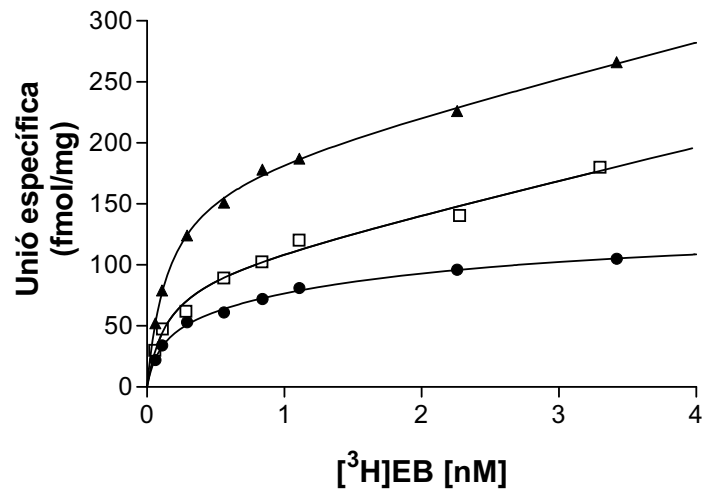
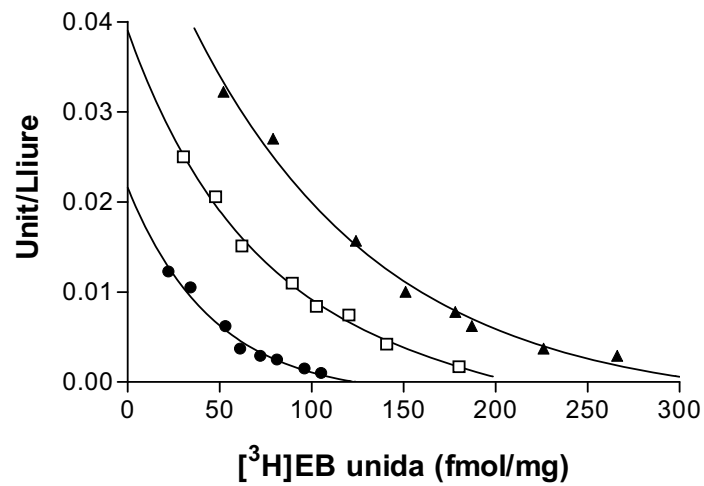
C**D**

Fig. 9. Gràfics representatius del assajos de saturació [³H]MLA i [³H]epibatidina en membranes de cèl·lules PC12 diferenciades no tractades (Ctrl) o tractades amb MDMA i METH 100µM durant 24 hores. El resultat obtingut en l'assaig amb [³H]MLA s'ajusta a un model d'un sol lloc d'unió (A) i dona lloc a una representació d'Scatchard lineal (B); en canvi, en el cas de l'assaig d' [³H]EB, els valors s'ajusten a un model de 2 llocs d'unió (C) i el gràfic d'Scatchard esdevé curvilini (D).

Compostos	PC12	
	Bmax	K _D
Control	532 ± 43	0.43 ± 0,26
S(+)-METH	690 ± 16*	0.65 ± 0.21
(+/-)-MDMA	787 ± 62**	0.51 ± 0.16

Taula 4. Bmax (fmol/mg) i K_D (nM) obtingudes a partir de l'assaig de saturació d' [³H]MLA mitjançant una regressió no lineal. Les cèl·lules PC12 van ser tractades amb MDMA i METH durant 24 hores. Les dades representades són la mitjana ± EEM de 3 experiments similars. * vs Control; *P<0.05, **P<0.01.

Compostos	PC12	
	Bmax	K _D
Control	57 ± 9	109 ± 20
S(+)-METH	96 ± 10*	105 ± 15
(+/-)-MDMA	129 ± 15*	122 ± 9

Taula 5. Bmax (fmol/mg) i K_D (nM) obtingudes a partir de l'assaig de saturació d' [³H]EB mitjançant una regressió no lineal. Les cèl·lules PC12 van ser tractades amb MDMA i METH durant 24 hores. Les dades representades són la mitjana ± EEM de 3 experiments similars. * vs Control; *P<0.05.

3. INCREMENT EN LA DENSITAT DE RECEPTORS NICOTÍNICs *in*

vivo

Amb l'objectiu de determinar si la regulació a l'alça observada *in vitro* es donava també *in vivo*, es va realitzar un tractament en rates Sprague-Dawley.

Efecte del tractament en la ganància de pes

El dia 11 de tractament es van pesar els animals i es va observar que els tractats amb MDMA i els tractats amb l'associació d'MDMA i Nicotina havien guanyat menys pes de manera molt significativa respecte els animals tractats amb s.f. (Control) **(%ΔPes (respecte pes inicial): Control 33.14 ± 6.5, MDMA 18 ± 2.6, NIC 28.34 ± 5.8, NIC+MDMA 23.84 ± 14.49; MDMA i NIC+MDMA vs Control P<0.001)**, però no diferien significativament entre ells. No es van observar diferències entre el grup s.f. i el grup d'animals tractats amb nicotina sola.

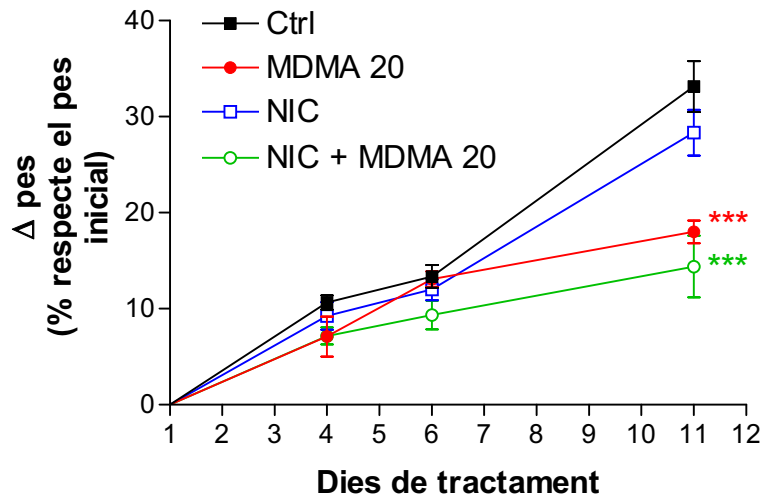


Fig. 10. Increment de pes dels animals al llarg del tractament d'11 dies amb sèrum fisiològic, MDMA, nicotina i l'associació d'MDMA i nicotina. Els valors representats en el gràfic són la mitjana dels percentatges dels pesos dels animals de cada grup en un dia concret del tractament respecte el pes de l'animal del dia 1. * : comparació vs control. *** P<0.001.

Efecte del tractament en la densitat del transportador de serotonina

Mitjançant l'assaig d'unió de [³H]Paroxetina es va determinar l'efecte del tractament amb MDMA i la Nicotina sobre els terminals serotoninèrgics de les zones cerebrals més susceptibles de ser danyades, l'escorça i l'hipocamp.

En l'escorça la unió de [³H]Paroxetina va disminuir significativament en els animals tractats amb MDMA i amb la seva associació amb nicotina mentre que en els animals tractats amb Nicotina no es va veure modificat significativament (**%[³H]Paroxetina:** Control 100 ± 3.6, MDMA 33.7 ± 3.1, NIC 91 ± 4.1, NIC+MDMA 26.94 ± 13.7; MDMA i NIC+MDMA vs Control P<0.001). En hipocamp els resultats van ser similars, tot i que la disminució de la unió va ser més moderada que en l'escorça (**%[³H]Paroxetina:** Control 100 ± 2.9, MDMA 83.9 ± 5.5, NIC 114 ± 7.2, NIC+MDMA 77.12 ± 5.6; MDMA vs Control P<0.05, NIC+MDMA vs Control P<0.01). L'associació d'ambdues drogues no va potenciar la neurotoxicitat serotoninèrgica.

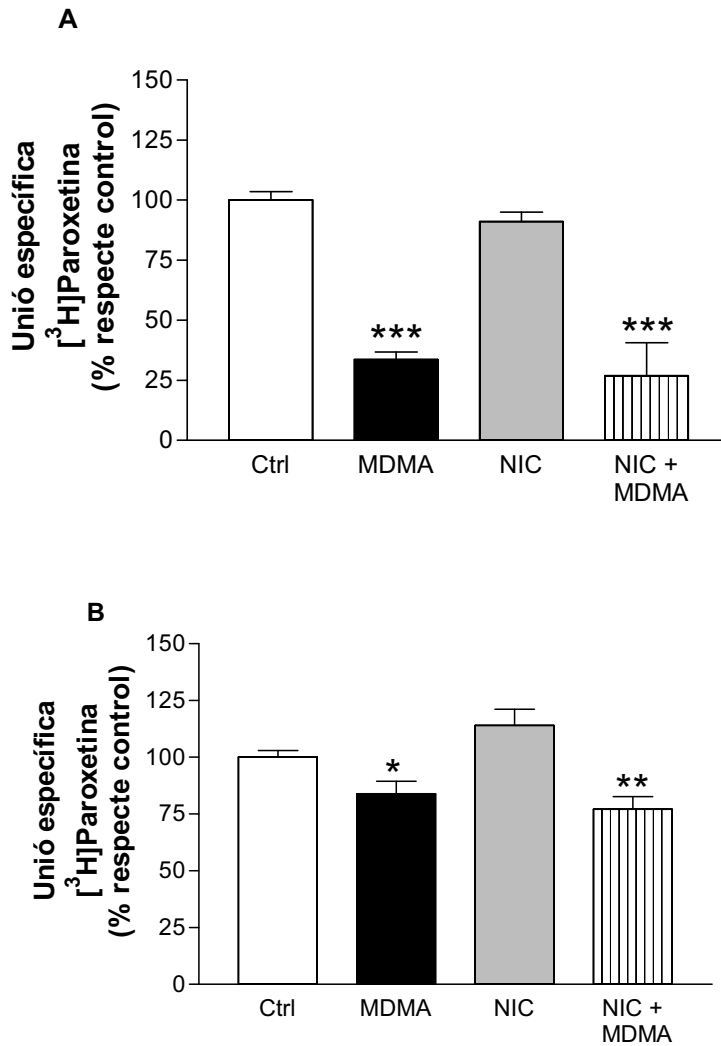


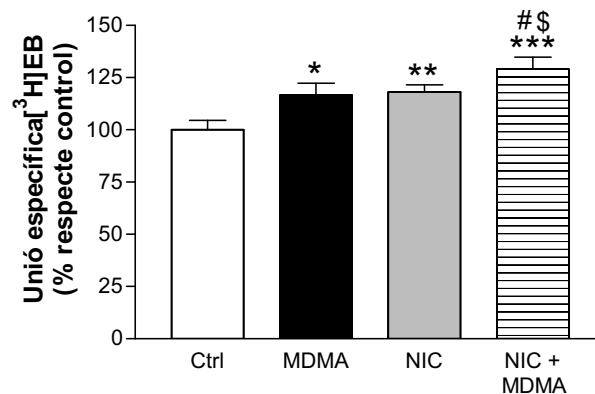
Fig. 11. Efecte del pretractament amb MDMA i Nicotina en la densitat del transportador de serotonina en (A) escorça i en (B) hipocamp de rata. Després de 10 dies de tractament, es van obtenir les membranes cel·lulars de cada part del cervell i es va determinar la unió de [³H]Paroxetina. Els resultats són la mitjana dels valors de 5 animals/grup ± EEM. * : comparació vs control. * P < 0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Efecte del tractament en la unió d' [³H]EB

Mitjançant l'assaig d'unió d' [³H]EB es va determinar els nivells de nAChR heteromèrics. En escorça parietal es va observar un increment significatiu d'un 20% de l'unió tant en els grups tractats amb MDMA com amb Nicotina respecte el grup control. Aquest efecte va ser potenciat mitjançant l'associació d'MDMA i Nicotina fins un 30% d'increment (% [³H]EB: Control 100 ± 4.6, MDMA 116.5 ± 5.8, NIC 118 ± 3.6,

NIC+MDMA 129.1 ± 5.7 ; MDMA vs Control $P < 0.05$, NIC vs Control $P < 0.01$, MDMA i NIC vs Control $P < 0.001$; NIC vs MDMA $P < 0.05$; NIC+MDMA vs NIC $P < 0.05$). Resultats semblants però més pronunciats es van donar en el cas de l'escorça prefrontal, on l'MDMA i la Nicotina soles induïen un increment del 30% i l'associació un 70%. Per contra, en l'estriat i els col·licles superiors i mesencèfal, l' MDMA no va induir cap increment a diferència de la Nicotina que va induir un increment del 40%. En el cerebel no es va observar increment en cap del grups tractats (dades no mostrades).

A



B

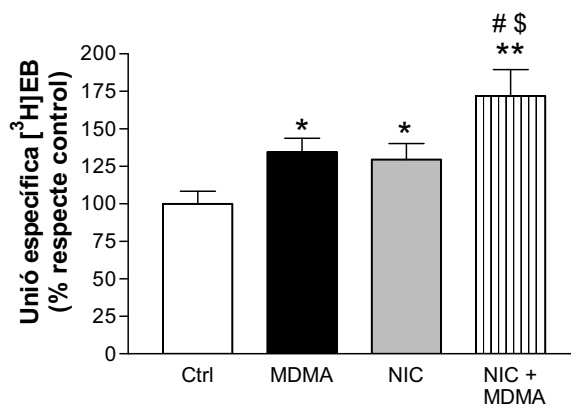
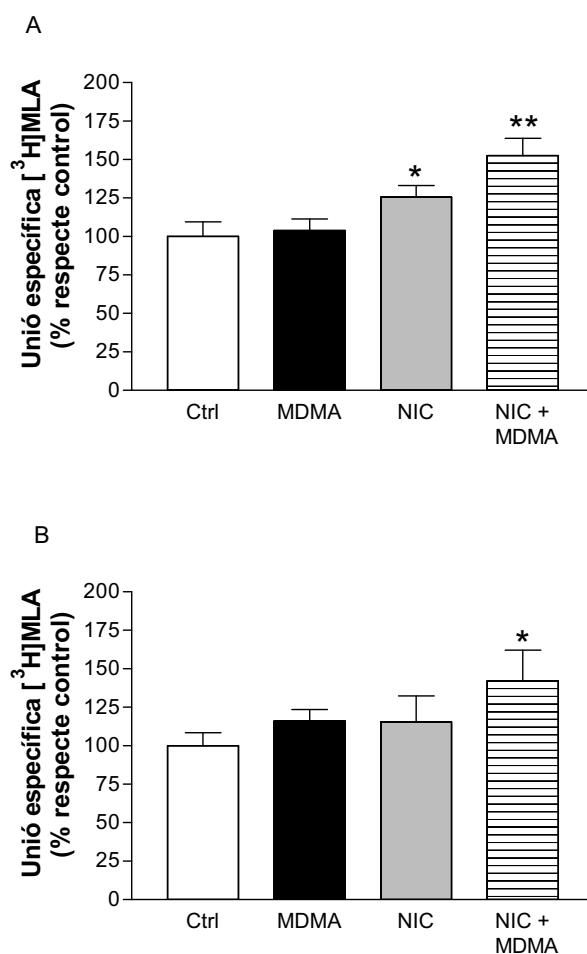


Fig. 12. Efecte del pretractament amb MDMA i Nicotina en la densitat de receptors $\alpha 4\beta 2$ en (A) escorça parietal i (B) escorça frontal de rata. Després de 10 dies de tractament, es van obtenir les membranes cel·lulars de cada part del cervell i es va determinar la unió d' $[^3\text{H}]\text{EB}$. * : comparació vs control; #: comparació amb MDMA i \$: comparació amb nicotina. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; # $P < 0.05$; \$ $P < 0.05$.

Efecte del tractament en la unió d' $[^3\text{H}]\text{MLA}$

Mitjançant l'assaig d'unio d' $[^3\text{H}]\text{MLA}$ es va determinar els nivells de nAChR homomèrics $\alpha 7$. En l'escorça prefrontal, es va observar un increment significatiu del 40% de l'unio del radiolligand solament en el grup tractat amb l'associació d'MDMA i Nicotina (**% $[^3\text{H}]\text{MLA}$: Control 100 ± 8.4 , MDMA 116 ± 7.5 , NIC 115.4 ± 17 , NIC+MDMA 142.1 ± 20 ; NIC vs Control $P < 0.05$, NIC+MDMA $P < 0.05$). En escorça parietal solament l'MDMA sol va induir un increment del 15%, i no va ser modificat per l'associació (**% $[^3\text{H}]\text{MLA}$: Control 100 ± 6.3 , MDMA 115.3 ± 5.2 , NIC 111 ± 5.3 , NIC+MDMA 121 ± 3.9 ; MDMA i NIC+MDMA vs Control $P < 0.05$). En canvi, en l'hipocamp, l'MDMA sola no va induir cap canvi, però sí que va modificar l'increment induït per la Nicotina sola, d'un 25% a un 52% (**% $[^3\text{H}]\text{MLA}$: Control 100 ± 9.5 , MDMA 103.92 ± 7.5 , NIC 125.53 ± 7.6 , NIC+MDMA 152.5 ± 11.3 ; NIC vs Control $P < 0.05$, NIC+MDMA vs Control $P < 0.01$). En estriat cap dels tractaments va induir canvis en l'unio d' $[^3\text{H}]\text{MLA}$.******



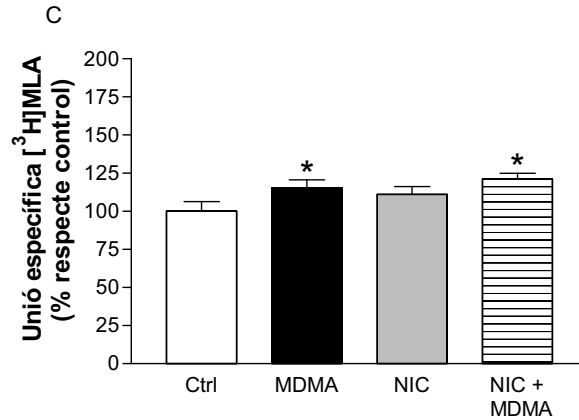
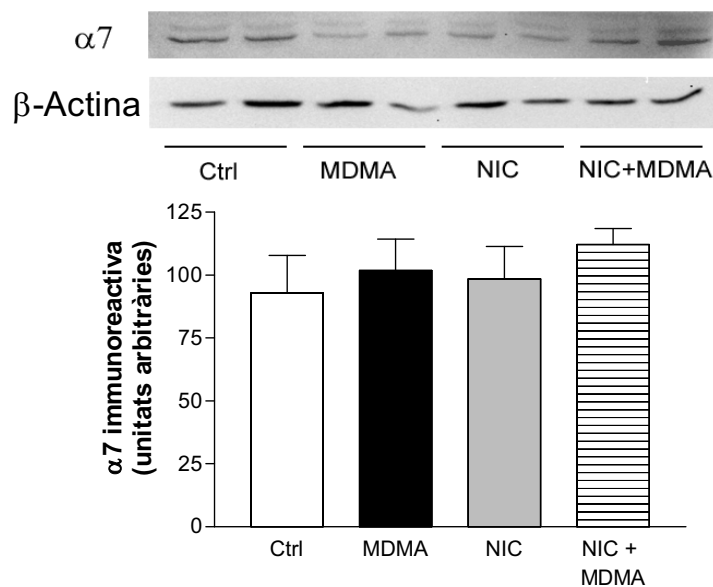


Fig. 13. Efecte del pretractament amb MDMA i Nicotina en la densitat de receptors $\alpha 7$ en (A) hipocamp, (B) escorça frontal i (C) escorça parietal de rata. Després de 10 dies de tractament, es van obtenir les membranes cel·lulars de cada part del cervell i es va determinar la unió d' $[^3\text{H}]\text{MPLA}$. * : comparació vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Expressió de les subunitats $\alpha 4$ i $\alpha 7$

Es va realitzar la tècnica de Western blot i la immunodetecció de les subunitats $\alpha 4$ i $\alpha 7$ en les zones cerebrals on es va observar increments més marcats en l'unió de radiolligands, escorça parietal en el cas dels $\alpha 4$ i hipocamp en el cas dels $\alpha 7$. No es van observar canvis significatius en l'expressió de proteïnes en cap dels casos.

A



B

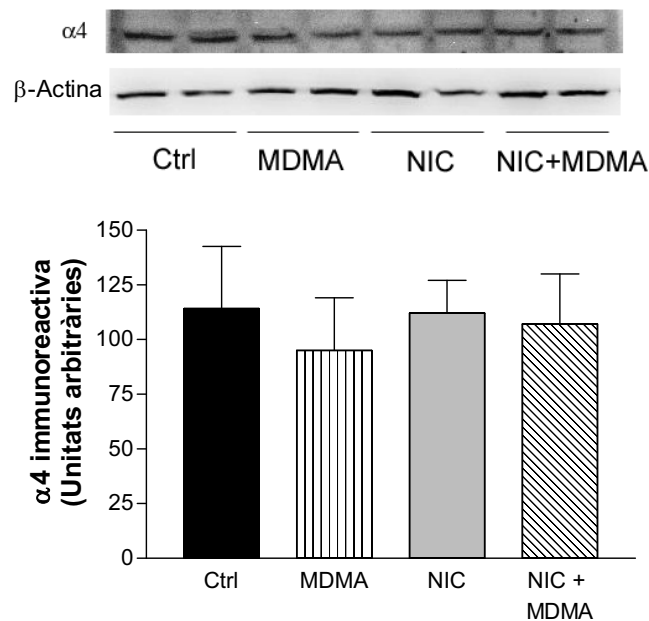


Fig. 14. Nivells d'expressió de les subunitats nicotíniques (A) $\alpha 7$ en hipocamp i (B) $\alpha 4$ en escorça parietal de rata. Després de 10 dies de tractament, es van obtenir els receptors solubilitzats dels teixits i es va realitzar la immunodetecció de les subunitats.

Immunoprecipitació de les subunitats $\alpha 4$ i $\beta 2$

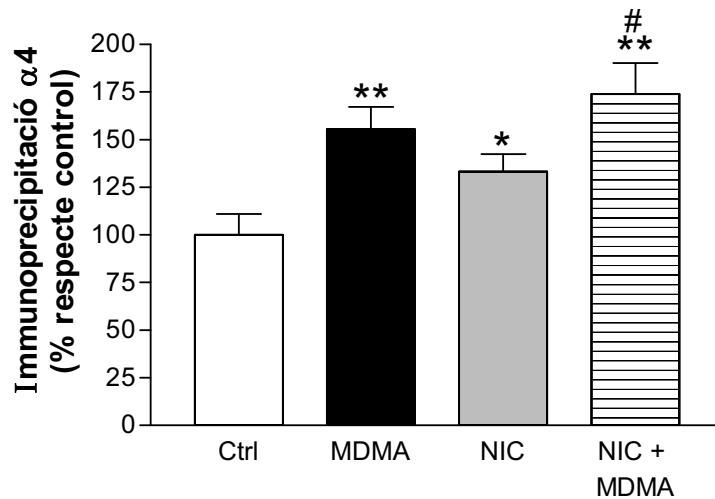
Per tal de determinar quines subunitats dels nAChR heteromèrics es regulava a l'alça es va dur a terme la immunoprecipitació de les subunitats $\alpha 4$ i $\beta 2$ unides a l' $[^3\text{H}]\text{EB}$. En primer lloc, es van solubilitzar els receptors de l'escorça parietal i es va realitzar l'assaig d'unió amb $[^3\text{H}]\text{EB}$ per tal de determinar el increment de nAChR heteromèrics.

Paral·lelament, es van immunoprecipitar independentment els receptors amb les subunitats $\alpha 4$ i $\beta 2$ de l'escorça utilitzant anticossos específics acoblats a microesferes, i a continuació es van realitzar els assajos d'unió $[^3\text{H}]\text{EB}$ de les subunitats precipitades per tal de veure si es donava la regulació a l'alça tant de la subunitat $\alpha 4$ com de la $\beta 2$.

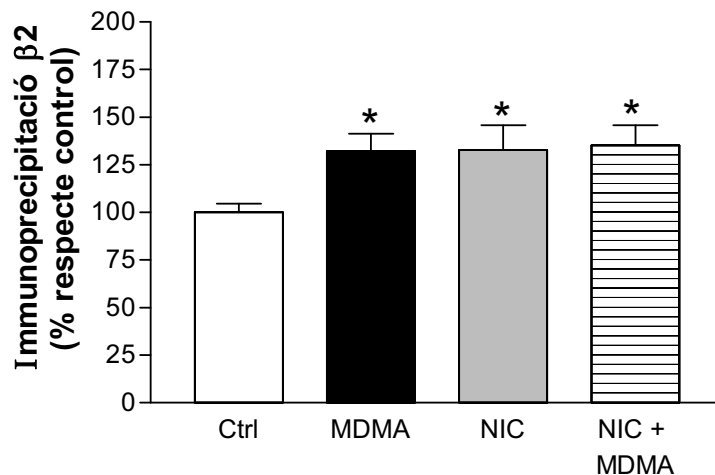
En ambdós casos es dona una regulació a l'alça induïda per MDMA i per nicotina, però solament en el cas de la immunoprecipitació dels $\alpha 4$ s'observa una

potenciació resultat de l'associació de l'MDMA i la nicotina (**% $\alpha 4$** : Control 100 ± 11 , MDMA 155.4 ± 11.77 , NIC 133.28 ± 9.16 , NIC+MDMA 173.95 ± 16.37 ; NIC vs Control $P < 0.05$, MDMA i NIC+MDMA vs Control $P < 0.01$, NIC+MDMA vs MDMA $P < 0.05$. **% $\beta 2$** : Control 100 ± 4.53 , MDMA 132.04 ± 9.17 , NIC 132.7 ± 13 , NIC+MDMA 135.23 ± 10.5 ; MDMA, NIC i NIC+MDMA vs Control $P < 0.05$. **% [3 H]EB**: Control 100 ± 5.06 , MDMA 130.5 ± 9.67 , NIC 122.24 ± 5.71 , NIC+MDMA 147.81 ± 3.62 ; MDMA vs Control $P < 0.05$, NIC vs Control $P < 0.01$, NIC+MDMA vs Control $P < 0.001$, NIC+MDMA vs MDMA $P < 0.01$).

A



B



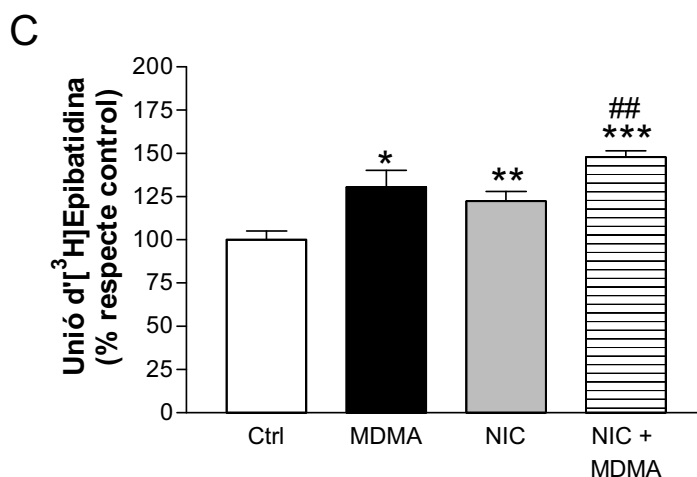


Fig. 15. Efecte del pretractament amb MDMA i Nicotina en la densitat de receptors nicotínic heteromèrics immunoprecipitats que contenen (A) la subunitat $\alpha 4$, (B) la subunitat $\beta 2$ i (C) totals heteromèrics en escorça parietal de rata. Després de 10 dies de tractament, es van obtenir els receptors solubilitzats de l'escorça, es va realitzar la immunoprecipitació de les subunitats i es va determinar la unió d' [3H]EB. * : comparació vs control; #: comparació amb MDMA. * P < 0.05, ** P<0.01, *** P<0.001; #P<0.05, ##P<0.01.

4. MECANISMES IMPLICATS EN LA REGULACIÓ A L'ALÇA DELS RECEPTORS NICOTÍNICS

Per tal de descriure acuradament la regulació a l'alça dels receptors nicotínic induïda per METH i MDMA, es van explorar els mecanismes de regulació implicats en cèl·lules PC12.

Paper de la síntesi proteica i el tràfic del receptor

La **cicloheximida** (CHX, 1 $\mu\text{g/ml}$) és un inhibidor de la síntesi proteica. La CHX va inhibir l'increment de receptors induït pel pretractament amb METH i MDMA (ambdós 300 μM), tant en l'assaig d'unio d' [3H]MLA (%[3H]MLA: Control 100 \pm 3.8, METH 145.3 \pm 2.21, CHX 72.61 \pm 4.63, CHX+METH 82.28 \pm 3.61, MDMA 139.3 \pm 11.4, CHX+MDMA 78.18 \pm 8.83; METH vs Control P<0.001, MDMA vs Control P<0.01, Control vs CHX P<0.05, Control vs CHX+ MDMA i METH P<0.05) com en el d' [3H]EB (%[3H]EB: Control

100 ± 8.8, METH 145 ± 11, CHX 90 ± 15, CHX+METH 100.31 ± 3.7, MDMA 157.9 ± 5.68, CHX+MDMA 91.09 ± 8.5; METH i MDMA vs Control P<0.05), resultat que ens suggereix que la regulació a l'alça requereix síntesi proteica.

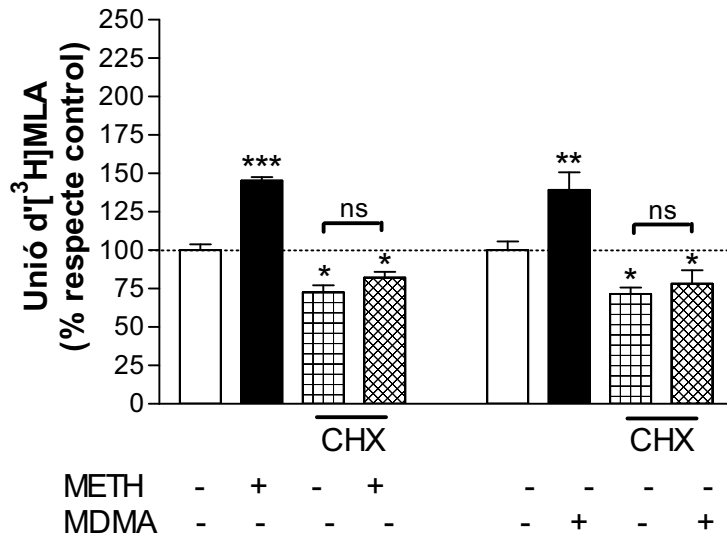


Fig. 16. Efecte de la cicloheximida (CHX) sobre la regulació a l'alça dels nAChR $\alpha 7$. El tractament amb METH i MDMA va ser de 24 hores, afegint la CHX 15 minuts abans. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls \pm EEM. * : comparació vs control; ns: comparació entre els grups marcats. * P < 0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

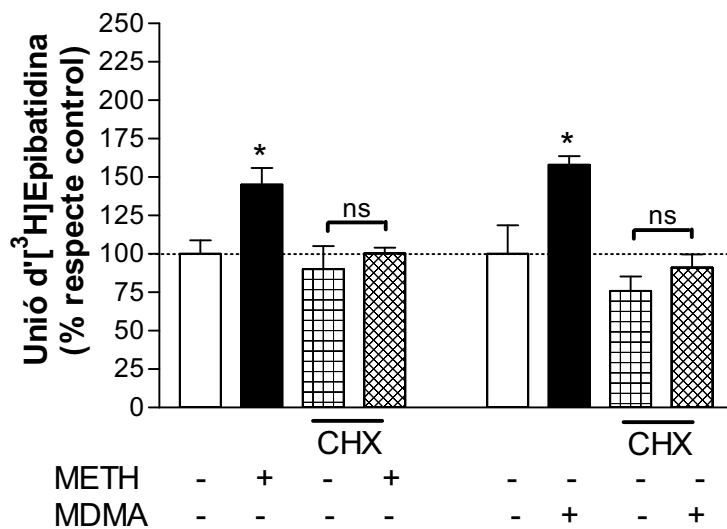


Fig. 17. Efecte de la cicloheximida (CHX) sobre la regulació a l'alça dels nAChR heteromèrics. El tractament amb METH i MDMA va ser de 24 hores, afegint la CHX 15minuts abans. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls \pm EEM. * : comparació vs control; ns: comparació entre els grups marcats. * P < 0,05.

Per tal de determinar si la regulació a l'alça ve donada per un augment en el trànsit del receptor a la membrana, vam tractar les cèl·lules amb **brefeldina A** (BFA, 3 μ M), un metabòlit d'origen fúngic que desestructura l'aparell de Golgi i, per tant, interfereix el trànsit de proteïnes intracel·lulars a la membrana i alhora els últims passos de la maduració del receptor. Tot i que la BFA va fer disminuir com era d'esperar la densitat de receptors en totes les condicions, no vam observar inhibició de la regulació a l'alça per METH i MDMA, el qual ens indica que el trànsit a la membrana no és un punt determinant en la regulació a l'alça dels receptors nicotínics (**% [3 H]MLA**: Control 100 ± 6 , METH 182 ± 3 , MDMA 227.2 ± 4.4 , BFA 12.3 ± 1.5 , BFA+METH 19 ± 2 , BFA+MDMA 24 ± 2.1 ; METH i MDMA vs Control $P < 0.001$, BFA+METH i BFA+MDMA vs BFA $P < 0.05$. **% [3 H]EB**: Control 100 ± 3.2 , METH 210 ± 3 , MDMA 217.8 ± 13.6 , BFA 17 ± 2.1 , BFA+METH 31 ± 2 , BFA+MDMA 32.6 ± 2.4 ; METH i MDMA vs Control $P < 0.001$, BFA+METH i BFA+MDMA vs BFA $P < 0.01$).

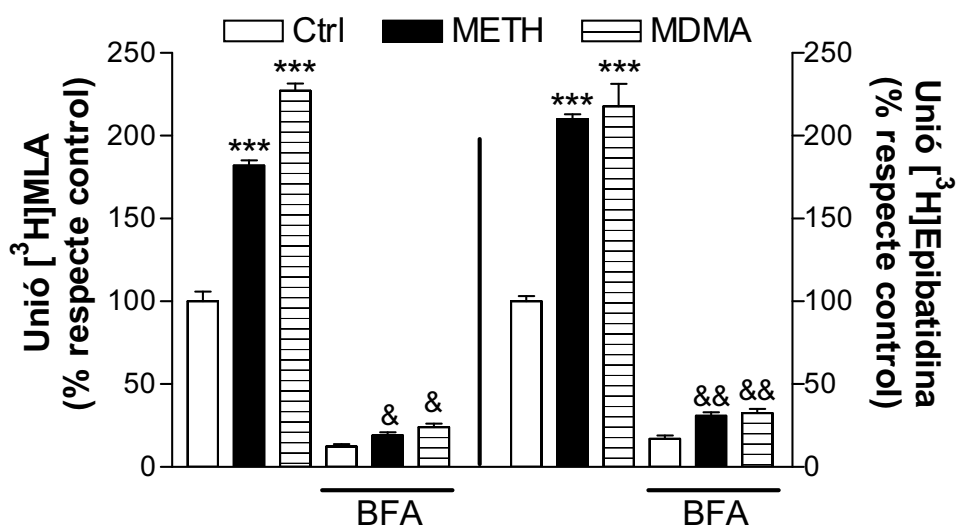


Fig. 18. Efecte de la inhibició del trànsit de nAChR a la membrana per Brefeldina A i el seu efecte sobre la regulació a l'alça induïda per METH i MDMA. El tractament amb METH i l'MDMA (300 μ M) és de 18 hores, en absència o presència de BFA que l'afegim 15 minuts abans. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls \pm EEM.

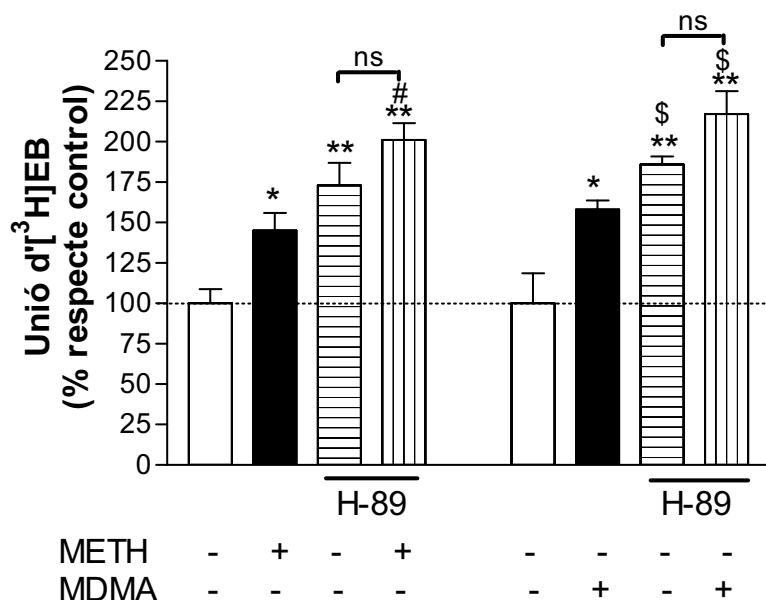
* : comparació vs control; &: comparació vs BFA sola. &P<0.05, &&P<0.01, *** P < 0,001.

Paper de les Cinases de proteïna en la regulació a l'alça dels nAChR

L'**H89** (100 nM), un inhibidor de la proteïna cinasa A (PKA), a les 6 hores de tractament va incrementar l'unió de l' $[^3\text{H}]\text{JEB}$ en un 70-80%, el que va fer complicat veure el seu efecte sobre la regulació a l'alça dels nAChR $\beta 2$ induïda per l'MDMA i la METH. Però, al comparar l'H-89 i l'MDMA o la METH amb l'H89 sol, vam veure que inhibia l'efecte d'aquests derivats amfetamínics (**% $[^3\text{H}]\text{JEB}$** : Control 100 ± 8.8 , METH 145 ± 11 , MDMA 157.9 ± 5.68 , H-89 172.9 ± 14 , H-89+METH 201.1 ± 10.41 , H-89+MDMA 217.3 ± 14.04 ; METH i MDMA vs Control $P < 0.05$, H-89 vs Control $P < 0.01$, H-89+MDMA i METH vs Control $P < 0.01$, H-89+METH vs METH $P < 0.05$, H-89+MDMA vs MDMA $P < 0.05$).

Contràriament, l'H89 sol no va incrementar la unió de l' $[^3\text{H}]\text{MLA}$ i tampoc va modificar la regulació a l'alça induïda per la METH i l'MDMA (**% $[^3\text{H}]\text{MLA}$** : Control 100 ± 3.8 , METH 145.3 ± 2.21 , MDMA 139.3 ± 11.4 , H-89 110.8 ± 2.58 , H-89+METH 158.7 ± 5.73 , H-89+MDMA 134.5 ± 3.19 ; METH vs Control $P < 0.001$, MDMA vs Control $P < 0.01$, H-89+METH vs Control $P < 0.01$, H-89+MDMA vs Control $P < 0.001$).

A



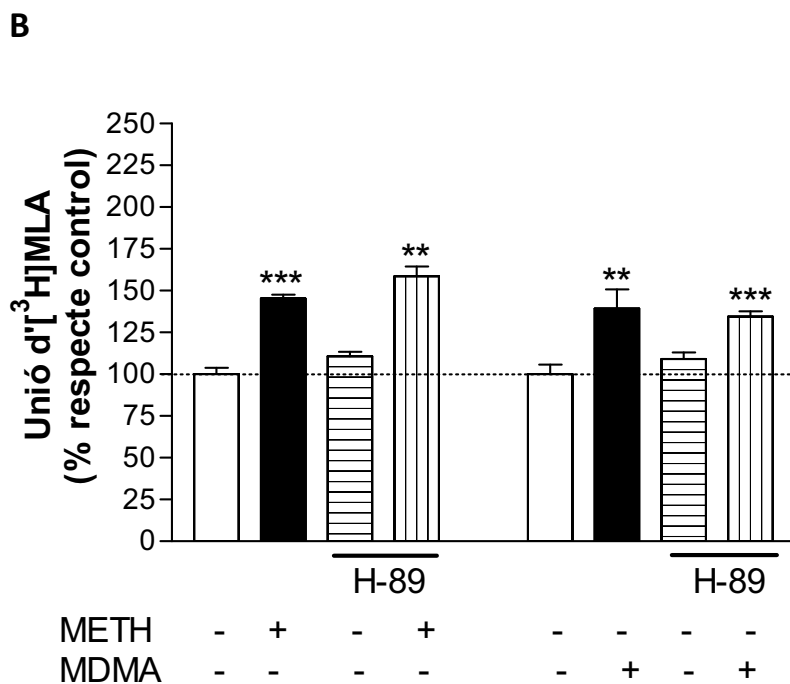


Fig. 19. Efecte del l'H-89, un inhibidor de la PKA, sobre la regulació a l'alça dels nAChR (A) heteromèrics i (B) $\alpha 7$, induïda per la METH i l'MDMA a les 24 hores. L'H-89 es va afegir 15 abans de la droga. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls \pm EEM. * : comparació vs control. ** P < 0.01, *** P < 0.001. # comparació amb METH, \$ comparació amb MDMA. # i \$ P < 0.05

El **GF-109203X** (GF, 0,3 μ M), inhibidor de la PKC, a les 24 hores de tractament, no afectà als nivells basals d'unió de l'[³H]EB ni els de [³H]MLA, ni tampoc l'augment en la fixació de [³H]MLA induït pels dos derivats amfetamínics (dades no mostrades), però va potenciar l'augment induït per la METH i l'MDMA en la unió d'[³H]EB (%[³H]EB: METH 161 \pm 1,6 vs GF + METH 191,1 \pm 5,5 P < 0,01, MDMA 124 \pm 10,3 vs GF + MDMA 181 \pm 6% P < 0,05).

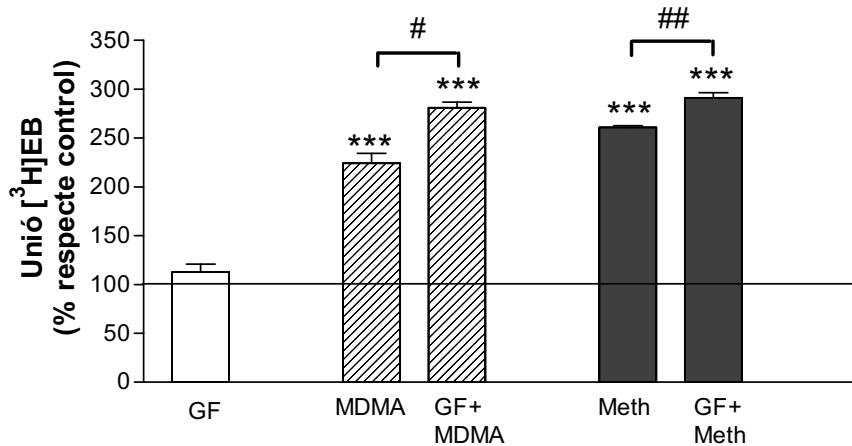


Fig. 23. Efecte de el GF-109203X, un inhibidor de la PKC, en la regulació a l'alça dels nAChR heteromèrics $\beta 2$ induïda per MDMA i METH. El tractament amb METH i MDMA va ser de 24 hores, afegint la GF-109203X 15 minuts abans. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls \pm EEM. * : comparació vs control. #: comparació entre els grups marcats. # P < 0.05, ## P < 0.01, *** P < 0.001.

La **genisteïna** (20 μ M), un inhibidor de la tirosina-cinasa, al ser incubada sola amb les cèl·lules durant 6 hores, produí un augment significatiu tant en la unió d' $[^3\text{H}]\text{EB}$ com en la de $[^3\text{H}]\text{MLA}$, els quals no foren modificats per la METH o l'MDMA. No obstant, a les 24 hores, la genisteïna va produir una important disminució en la unió. (% $[^3\text{H}]\text{EB}$: genisteïna $36,18 \pm 2,9$ vs Control $100 \pm 6,7$, P < 0,001; % $[^3\text{H}]\text{MLA}$: genisteïna $64 \pm 2,4$ vs Control $100 \pm 2,6$, P < 0,001). En aquest temps d'incubació, quan s'afegí la METH o l'MDMA en presència de Genisteïna, l'augment de receptors nicotínics $\alpha 7$ es va inhibir significativament. Els augments en la unió comparats amb els del seu corresponent control (vehicle o genisteïna sola) foren per l' $[^3\text{H}]\text{EB}$: (%: MDMA $109,2 \pm 6,8$ vs genisteïna + MDMA $42,9 \pm 4,2$ P < 0,001, METH $161 \pm 1,6$ vs genisteïna + METH 91 ± 53 P < 0,001; i per $[^3\text{H}]\text{MLA}$: (%: MDMA $135 \pm 3,8$ vs genisteïna + MDMA 88 ± 5 P < 0,001, METH 76 ± 2 vs genisteïna + METH $35 \pm 2,6$ P < 0,001.)

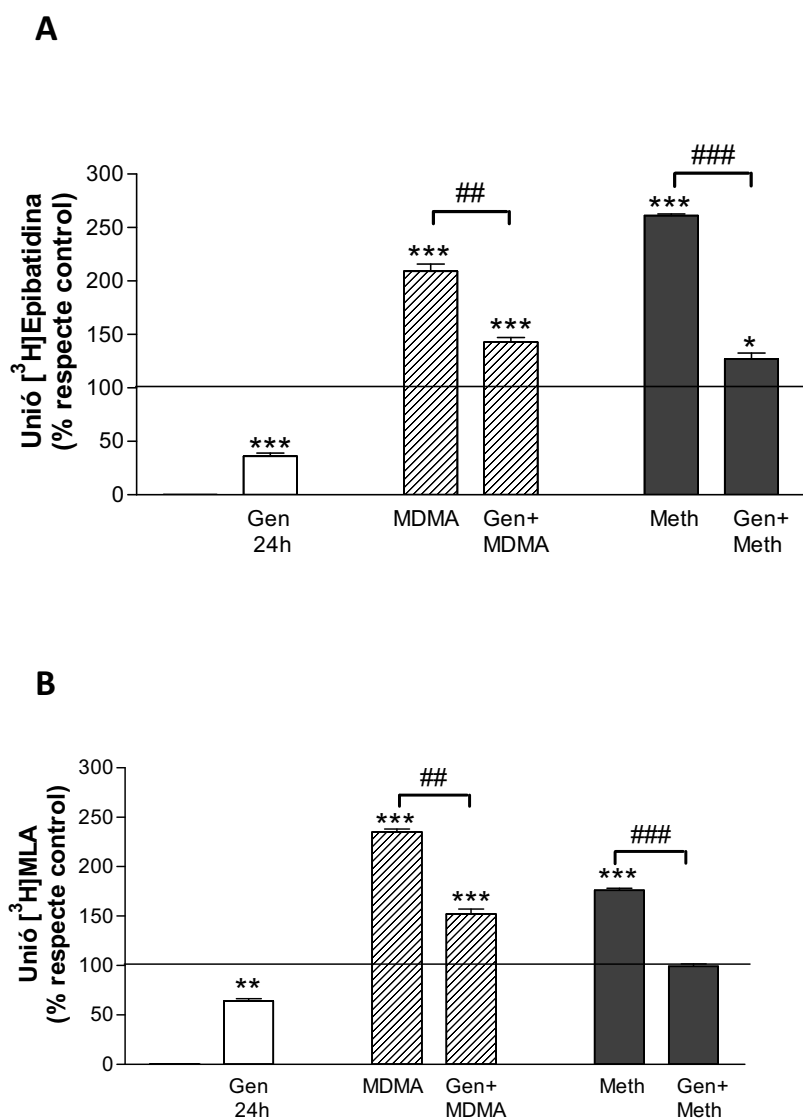


Fig. 20. Efecte de la genisteïna sobre la regulació a l'alça dels nAChR (A) heteromèrics i (B) $\alpha 7$ induïda per METH i MDMA. El tractament amb METH i MDMA va ser de 24 hores, afegint la genisteïna 15 minuts abans. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls \pm EEM.

* : comparació vs control; #: comparació entre els grups marcats. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001; ###P<0.01, ####P<0.001.

La **ciclosporina A** (CsA, 1 μ M , inhibidor de la ciclofilina A) sola no afectà la unió de [3 H]MLA però va inhibir moderadament, encara que de manera molt significativa la regulació a l'alça de receptors nicotínics $\alpha 7$ (%[3 H]MLA: METH 76,2 \pm 2 d'augment vs 46,6 \pm 6 d'augment per CsA + METH P < 0,001; 135 \pm 3,8 d'augment per MDMA vs 106 \pm 1,3 per CsA + MDMA). D'altra banda, la CsA induí un increment en la unió d' [3 H]EB

(al voltant d'un 50% d'augment, dades no mostrades), dificultant valorar un efecte clar sobre la regulació a l'alça induïda per METH i MDMA i per això no es va assajar sobre els efectes induïts per aquestes amfetamines.

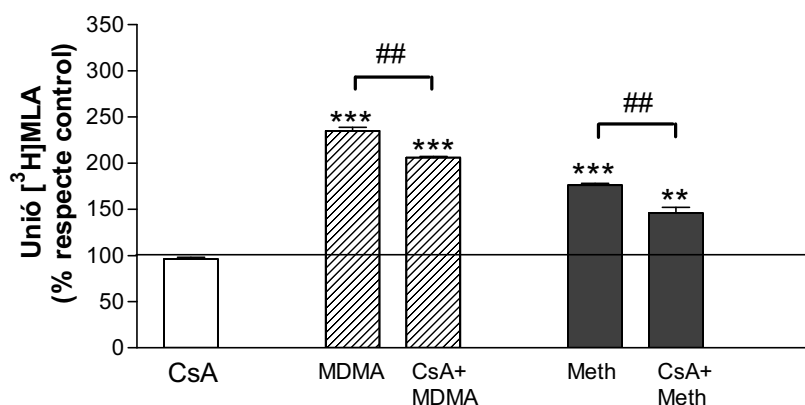


Fig. 21. Efecte de la ciclosporina A sobre la regulació a l'alça dels nAChR $\alpha 7$ induïda per METH i MDMA. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls \pm EEM. * : comparació vs control; #: comparació entre els grups marcats. ** P < 0.01, *** P < 0.001; ##P<0.001.

Compostos	PC12	
	[³ H]MLA	[³ H]EB
Control	100 \pm 3.8	100 \pm 3.2
CHX	72.61 \pm 4.63*	90 \pm 15
BFA	12.3 \pm 1.5***	17 \pm 2.1***
H-89	110.8 \pm 2.58	172.9 \pm 14**
GF-109203X	112.7 \pm 8	146 \pm 5**
Genisteïna	64 \pm 2.4***	36.18 \pm 2.9***
CsA	96 \pm 2	122 \pm 9

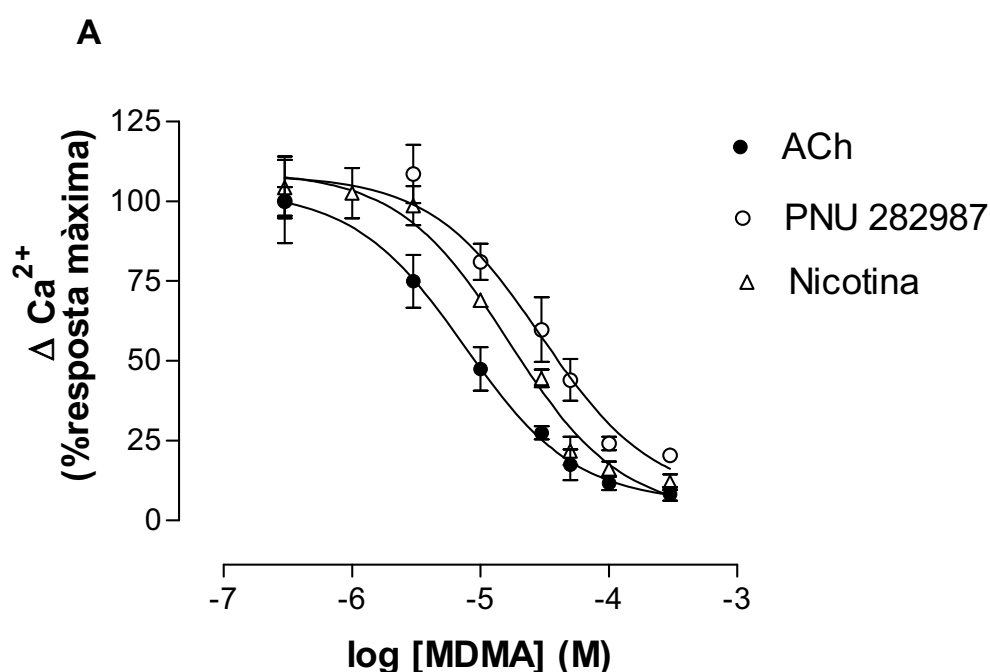
Taula 6. Percentatge, respecte Control, de unió dels radiol·ligands [³H]MLA i [³H]EB després del tractament de les cèl·lules PC12 durant 24 hores amb els diferents inhibidors que poden estar implicats en la regulació dels nAChR: Cicloheximida (CHX), Brefeldina-A (BFA), H-89, GF-109203X, Genisteïna i Ciclosporina A (CsA). Les dades representades són la mitjana \pm EEM de 3 experiments similars. *vs Control; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

5. ASSAIGS FUNCIONALS

L'increment de calci induït per ACh, nicotina i PNU282987

Els increments de calci es van determinar mitjançant la tècnica fluorimètrica de detecció de Ca^{2+} en microplaca, on les cèl·lules PC12 van ser carregades amb el fluorocrom Fluo-4.

L'MDMA inhibí de forma dependent de concentració l'entrada de calci induïda per diferents agonistes nicotínics. Vam obtenir les CI_{50} mitjançant la regressió no lineal: $10 \pm 3.96 \mu\text{M}$ per l'ACh, $18.70 \pm 2.31 \mu\text{M}$ per la nicotina, i $29.88 \pm 2.52 \mu\text{M}$ en el cas del PNU282987 (n=3 per cada agonista). Per altra banda, al mesurar els nivells basals de Ca^{2+} després d'afegir l'MDMA i abans d'afegir l'agonista es va observar un increment en els nivells basals de calci de manera concentració depenent, el qual ens indica que l'MDMA sol provoca canvis en els nivells de Ca^{2+} citosòlic.



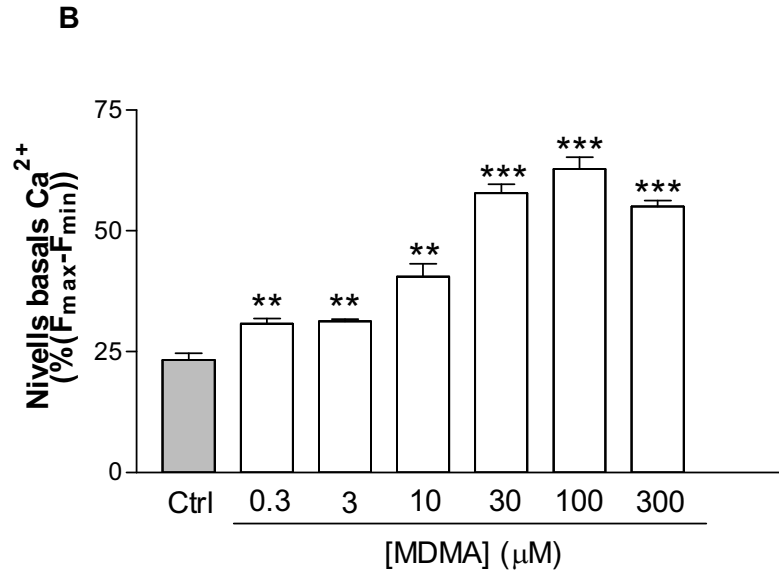


Fig. 22. (A) Efecte de l'MDMA concentració-dependent sobre la resposta dels agonistes nicotínics ACh (100 μM), nicotina (100 μM), i PNU 282987 (0.1 μM) en cèl·lules PC12 incubades amb Fluo-4. L'MDMA va ser afegit a les cèl·lules 5 min abans que l'agonista. (B) Nivells basals de Ca^{2+} 5 min després d'afegir l'MDMA i abans d'afegir l'agonista. Totes les mesures es van fer en presència del modulador al·lostèric PNU 120596 (10 μM). Els resultats són normalitzats com a percentatge ($F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$) i el gràfic és representatiu d'un de 3 experiments amb resultats similars. Les dades són la mitjana \pm EEM quadruplicats de cada condició. * : comparació vs control; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

L'MDMA actua com agonista parcial dels nAChR

Donats els efectes de l'MDMA sola observats en els experiments anteriors, es va investigar un possible efecte agonista.

L'MDMA va ser capaç, a concentracions micromolars, d'induir l'entrada de calci de manera concentració-dependent però sense assolir l'efecte màxim al qual es pot arribar amb l'Acetilcolina. En tots els assajos, a l'igual que passava amb l'acetilcolina, va ser necessària la presència del modulador al·lostèric PNU120596 per poder mesurar la resposta. Vam explorar la possibilitat que l'MDMA fos un agonista parcial, la hipòtesi va ser confirmada donat que l'MDMA es comportava com una agonista ja que era capaç d'induir entrada de calci per si sol i a la vegada es comportava com antagonista inhibint de forma concentració-dependent la resposta de l'acetilcolina, un agonista total.

A partir de les corbes concentració-resposta es van obtenir les CE_{50} : 0.50 ± 0.16 μ M per l'ACh i 49.75 ± 5.74 μ M per MDMA (n=3).

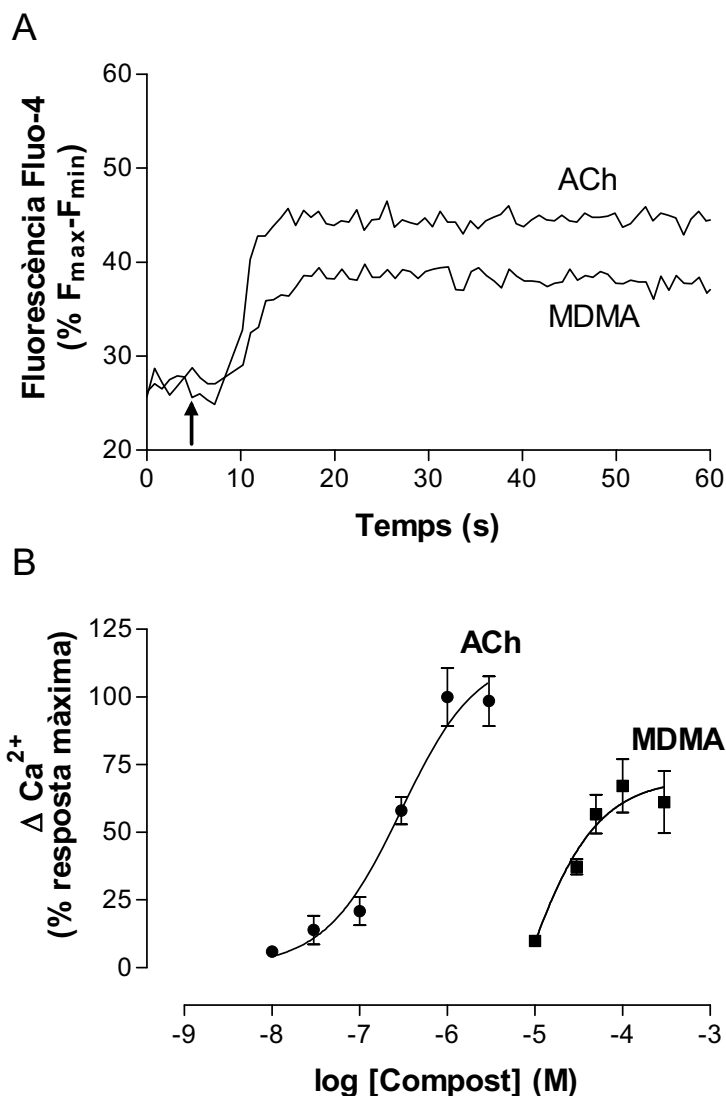
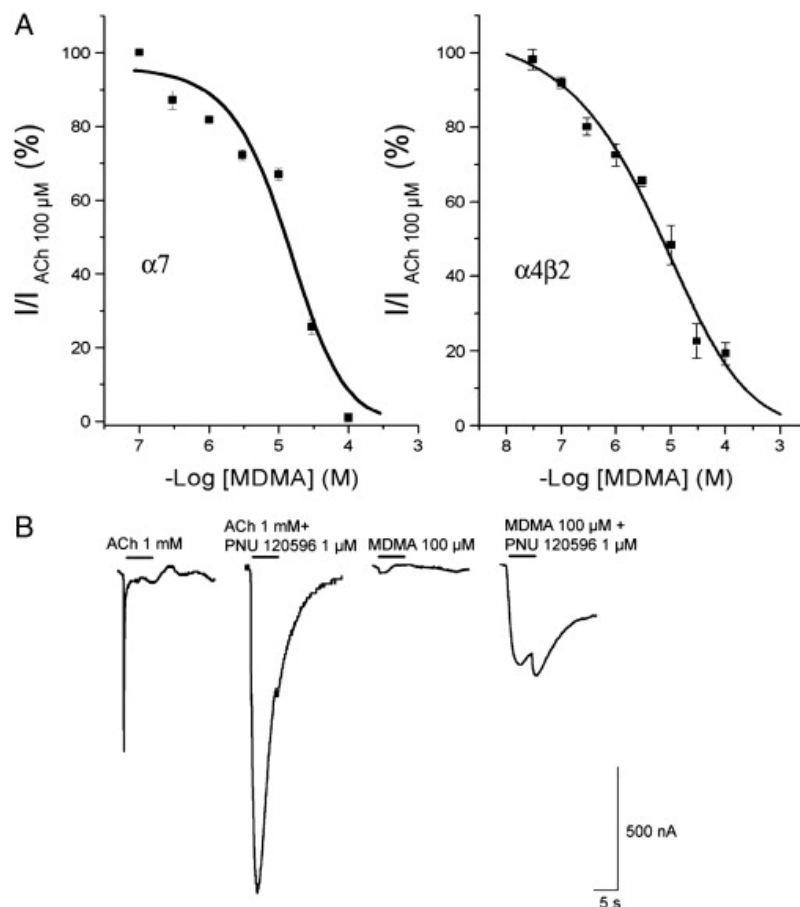


Fig. 23. (A) Traçat representatiu de l'increment de Ca^{2+} citosòlic induït per ACh (100 μ M) i MDMA (50 μ M). (B) Corbes representatives concentració-resposta en cèl·lules PC12 mostrant un increment de Ca^{2+} citosòlic induït per l'MDMA i l'ACh com a agonista total. Les respostes es van normalitzar com a percentatge de F_{max}-F_{min} i es representen com a percentatge de la resposta màxima de l'ACh 100 μ M. Durant 5 segons es mesura la fluorescència basal i a continuació s'afegeix ACh o MDMA amb l'injector automàtic del fluorímetre i durant 95 segons es mesura l'increment en la fluorescència. Les dades representades són la mitjana \pm EEM de quatre pouets per a cada condició.

L'MDMA es comporta com agonista parcial en ovòcits que expressen el nAChR $\alpha 7$ humà i com antagonista sobre els nAChR $\alpha 4\beta 2$

En els experiments realitzats en ovòcits L'MDMA va inhibir els corrents induïts per l'acetilcolina de manera concentració-dependent. La CI_{50} pels corrents $\alpha 7$ va ser de $16.79 \pm 0.77 \mu M$ ($n=3$) amb un bloqueig màxim observat a una concentració de $100 \mu M$ d'MDMA ($97.78 \pm 2.22\%$) mentre que la CI_{50} per als $\alpha 4\beta 2$ va ser de $9.77 \pm 0.22 \mu M$.

La Fig. 24B mostra els corrents induïts per MDMA i ACh en presència o en absència del modulador al·lostèric $\alpha 7$ PNU120596 en ovòcits que expressen els receptors nicotínics $\alpha 7$. La potenciació de la resposta en presència de PNU120596 va ser de 7.6 vegades més pels corrents induïts per l'ACh i 9.6 vegades més pels corrents induïts per l'MDMA. Per altra banda, l'MDMA no va induir corrents iònics quan era aplicada sola sobre els ovòcits transfectats amb el nAChR $\alpha 4\beta 2$.



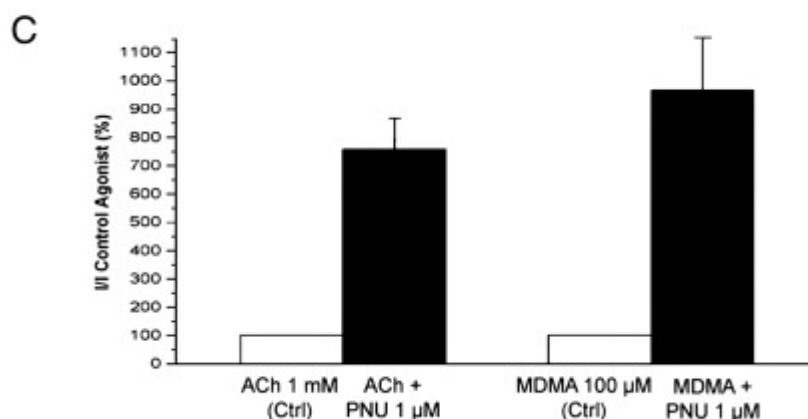


Fig. 24. Corrents iònics induïts per l'aplicació d'ACh o MDMA sobre ovòcits de *Xenopus* que expressen nAChR humans. La figura (A) mostra la corba d'inhibició-resposta dels corrents d'ACh (100 μM) MDMA en ovòcits que expressen nAChR humans α7 (esquerra) o α4β2 (dreta). Les respostes s'expressen com a percentatge respecte el corrents induït per ACh 100 μM. Les dades són la mitjana ± SEM de 3 ovòcits d' almenys 2 donants diferents. (B) Registres representatius dels corrents induïts per ACh (1 mM) i MDMA (100 μM) en absència i en presència de PNU120596 (1 μM) en ovòcits que expressen els nAChR α7 humans. El potencial de membrana dels ovòcits es va mantenir a -70 mV. Els ovòcits eren estimulats amb polsos d'agonistes de 5 segons de durada com s'indica en la barra superior horitzontal, amb intervals de 2 minuts. La figura (C) mostra resultats agrupats dels corrents generats per l'ACh i l'MDMA sobre el ovòcits que expressen el nAChR α7. La perfusió dels ovòcits amb PNU120596 provoca una marcada potenciació de la resposta induïda per ACh (1 mM) o MDMA (100 μM). La resposta potenciació s'expressa com a percentatge respecte la resposta induïda per 1 mM d'ACh o 100 μM d'MDMA. Les dades corresponen a la mitjana ± EEM de 6 ovòcits d' almenys 3 donants diferents.

Vies implicades en l'increment de Ca²⁺ induït per MDMA

Després d'observar la resposta induïda per l'MDMA vàrem avaluar l'efecte de diferents antagonistes i/o moduladors a fi de determinar quines vies de mobilització de calci estaven implicades.

Els antagonistes específics α7 metillicaconitina (MLA, 10 nM) i α - Bungarotoxina (α-Bgtx, 100 nM) van inhibir completament la resposta induïda per l'MDMA (% ΔCa²⁺: MDMA 100 ± 7.7 vs MLA+MDMA 5.4 ± 5.4 P<0.001, MDMA vs α-Bgtx+MDMA 12 ± 3.2 P<0.001). L'antagonista dels receptors nicotínics heteromèrics que contenen la subunitat β2, dihidro-β-eritroidina (DHβE, 1 μM) no va tenir efecte sobre la resposta induïda per l'MDMA. Per a determinar si el calci provenia del reticle

endoplasmàtic es va utilitzar el dantrolè (DANT, 20 μ M, antagonista del receptor de rianodina), el 2-aminoetil difenil borat (2-APB, 150 μ M, un bloquejant del receptor IP_3 i dels canals catiónics dependents de les reserves intracel·lulars) els quals van inhibir parcialment la resposta de l'MDMA, indicant que els reservoris intracel·lulars estan implicats en el seu efecte (% ΔCa^{2+} : MDMA 100 ± 7.7 vs DANT+MDMA 67.7 ± 8.7 $P < 0.05$, MDMA vs 2-APB+MDMA 46.01 ± 6.01 $P < 0.01$). El nitrendipí (NDP, 0.3 μ M), un blocador dels canals de Ca^{2+} dependents de voltatge de tipus L (VOCC), va inhibir un 30% l'efecte de l'MDMA encara que a una concentració més elevada (30 μ M) la inhibició esdevingué d'un 60% (% ΔCa^{2+} : MDMA 100 ± 7.7 vs NDP+MDMA 67.65 ± 7.57 $P < 0.05$). El $CdCl_2$ (50 μ M), un inhibidor no-selectiu dels canals de Ca^{2+} dependents de voltatge, va tenir un efecte sobre l'increment de Ca^{2+} similar al nitrendipí (% ΔCa^{2+} : MDMA 100 ± 7.7 vs $CdCl_2$ +MDMA 53.19 ± 5.79 $P < 0.01$). En últim lloc, es va assajar l'atropina (0.1 μ M), un antagonista dels receptors muscarínics, que no va modificar l'efecte de l'MDMA.

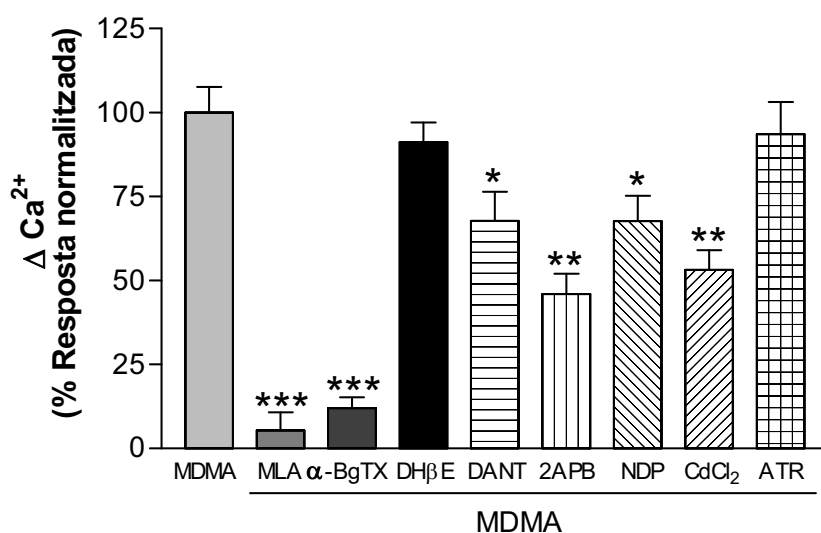


Fig. 25. Modulació farmacològica de l'increment de Ca^{2+} citosòlic induït per MDMA. Els antagonistes i inhibidors van a ser afegits al cultiu de cèl·lules PC12, carregades amb Fluo-4, 10 minuts abans de dispensar automàticament l'MDMA (50 μ M). Es va mesurar la resposta durant 5 segons i 60 segons abans i després, respectivament, d'afegir l'MDMA. La resposta és normalitzada com a percentatge ($F_{max} - F_{min}$) i expressada com a percentatge de la resposta induïda per l'MDMA sol. Totes les respostes es van mesurar en presència de PNU120596 (10 μ M). El resultat s'expressen com a Mitjana \pm EEM de tres experiments amb quadruplicats de cada condició. * : comparació vs control; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

L'MDMA es comporta com a antagonista dels nAChR $\alpha 4\beta 2$

Es va voler corroborar els resultats obtinguts mitjançant electrofisiologia en els quals l'MDMA inhibia els corrents induïts per ACh però no induïa una entrada de ions a través del nAChR $\alpha 4\beta 2$. El Ca^{2+} majoritàriament entra a través dels nAChR $\alpha 7$ i el Na^+ a través dels $\alpha 4\beta 2$, així que es van utilitzar cultius primaris de cèl·lules corticals embrionàries de ratolí i un fluorocrom que reacciona amb el Na^+ intracel·lular, el CoroNa Green, per tal de confirmar el comportament antagonista de l'MDMA sobre els nAChR $\alpha 4\beta 2$.

El resultat obtingut va demostrar que l'MDMA no indueix un increment en la concentració citosòlica de Na^+ i alhora actua com a antagonista dels nAChR amb la subunitat $\beta 2$, tal com s'observa en l'increment induït per 5-I-A-85380 ($\% \Delta \text{Na}^+$: 5-I-A 100 ± 38 , DBE+5-I-A 11.8 ± 11.8 , MDMA 20.5 ± 21 , MDMA+5-I-A: 9.47 ± 9.4 ; DBE+5-I-A, MDMA i MDMA+5-I-A vs Control $P < 0.05$).

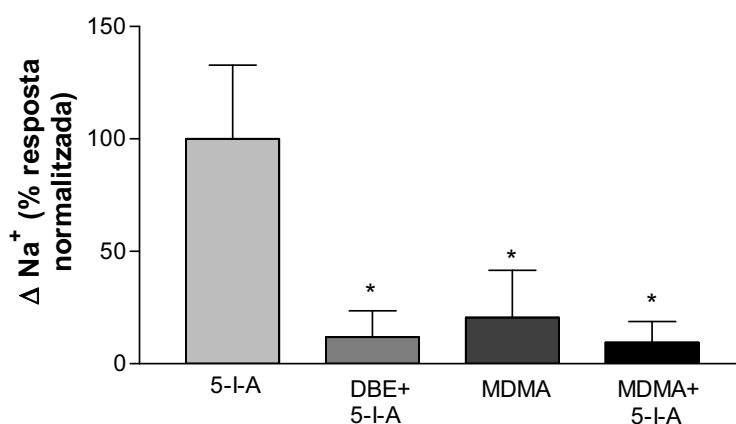


Fig. 26. Modulació farmacològica de l'increment de Na^+ citosòlic induït per MDMA. Els antagonistes i blocadors van a ser afegits al cultiu de cèl·lules, carregades amb CoroNa-Green, 10 minuts abans de dispensar automàticament l'MDMA ($50 \mu\text{M}$) o el 5-I-A-85380 ($15 \mu\text{M}$). La resposta és normalitzada com a percentatge ($F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$) i expressada com a percentatge de la resposta induïda per 5-I-A sol. El resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de tres experiments amb quadruplicats de cada condició. * : comparació vs control; * $P < 0.05$.

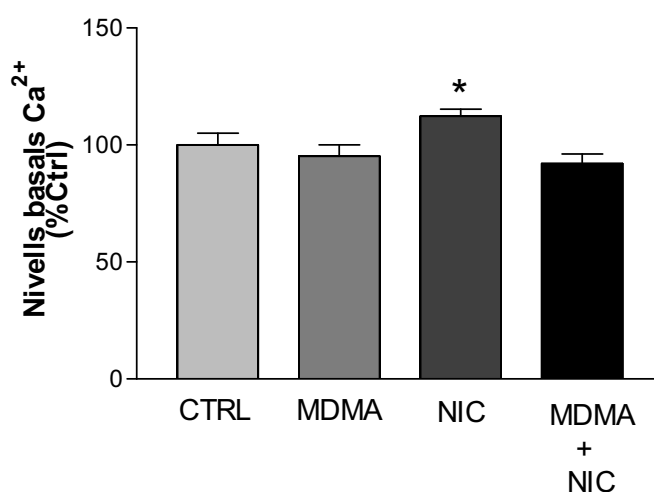
Posteriorment, mitjançant l'assaig de fluorimetria es va obtenir la corba d'inhibició per MDMA dels corrents de Na^+ induïts per l'agonista $\alpha 4\beta 2$, 5-I-A 85380, d'on es va calcular la CI_{50} de l'MDMA que va ser $5.09 \pm 0.1 \mu\text{M}$.

6. EFECTES A MITJÀ I LLARG TERMINI SOBRE EL Ca^{2+} I VIES RELACIONADES

El pretractament amb MDMA incrementa els nivells basals de Ca^{2+}

Per a determinar l'efecte a llarg termini de l'MDMA sobre els nivells de Ca^{2+} citosòlic, les cèl·lules PC12 van ser incubades amb MDMA (50 μM) durant 1, 6 i 24 h. A continuació es rentaven les cèl·lules, s'incubaven amb Fluo-4 i es mesurava la fluorescència. Alhora, vam fer un estudi comparatiu amb la nicotina. Després d'1 h d'incubació solament les cèl·lules tractades amb nicotina presentaven un lleuger però significatiu increment en els nivells de Ca^{2+} basal ($12 \pm 2.95\%$, $P < 0.05$). Contràriament, quan les cèl·lules es tractaven durant 6 i 24 hores amb nicotina, els nivells basals de calci eren els mateixos que els nivells control. En el cas de l'MDMA, quan les cèl·lules eren tractades durant 6 i 24 hores, s'induïa un increment del 30% ($P < 0.05$) respecte els nivells control. L'associació de nicotina amb l'MDMA no va modificar la resposta de l'MDMA. Aquests resultats ens indiquen que les cèl·lules són capaces de neutralitzar els efecte d'una activació sostinguda per nicotina però no l'efecte induït per MDMA, el qual ens indica la vulnerabilitat de les cèl·lules i el particular efecte d'aquesta droga.

A 1 hora



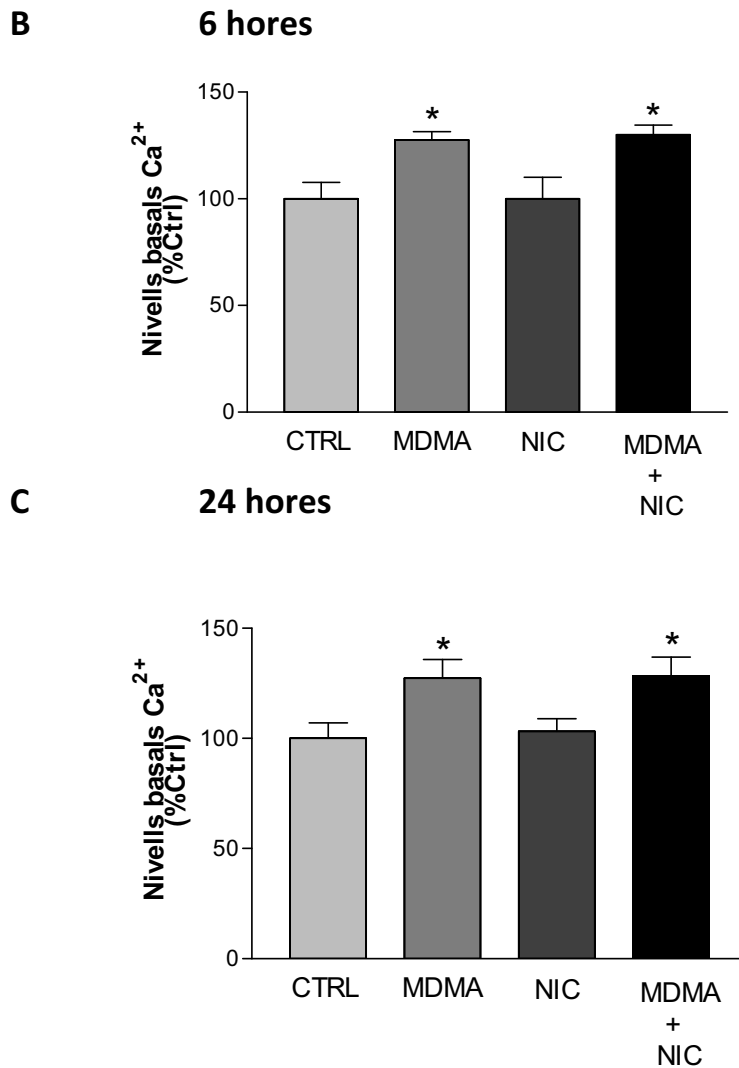


Fig. 27. Efecte de la preincubació amb MDMA i nicotina (ambdós 50 μ M) a diferents temps sobre els nivells basals de Ca^{2+} . Les cèl·lules PC12 van ser tractades amb MDMA, nicotina i ambdós substàncies durant 1(A), 6(B) i 24(C) hores, a continuació rentades i incubades amb Fluo-4 per a la mesura de la fluorescència corresponent als nivells basals de Ca^{2+} . Els valors van ser normalitzats pels valors de les cèl·lules tractades amb vehicle (Control) i s'expressen com la mitjana de 3 experiments \pm EEM.

* : comparació vs control; * $P < 0.05$.

Regulació a l'alça funcional

Paral·lel a la regulació a l'alça dels receptors nicotínics per diferents lligands està descrit un increment en la resposta farmacològica denominat regulació a l'alça funcional. Vàrem voler determinar si la preincubació amb MDMA induïa un increment de la resposta d'entrada de calci produïda per acetilcolina.

Quan les cèl·lules van ser pretractades durant 24 hores amb MDMA (50µM) i es va mesurar la resposta a agonistes específics dels nAChR, es va observar un increment en la resposta del 40% a l'acetilcolina, el qual suggereix, així com succeeix amb la nicotina, que l' MDMA indueix una regulació a l'alça funcional probablement resultat de l'augment de la població de receptors en estat d'alta afinitat. La resposta de l'agonista selectiu $\alpha 7$ PNU 282987 (0.1 µM) es va incrementar un 20% (119.1 ± 1.95 , $P < 0.05$ vs control) mentre que la resposta a l'agonista específic dels nAChR heteromèrics que contenen la subunitat $\beta 2$, 5-I-A-85380 (15µM) es va incrementar un 25% (126.27 ± 4.99 , $P < 0.05$ vs control).

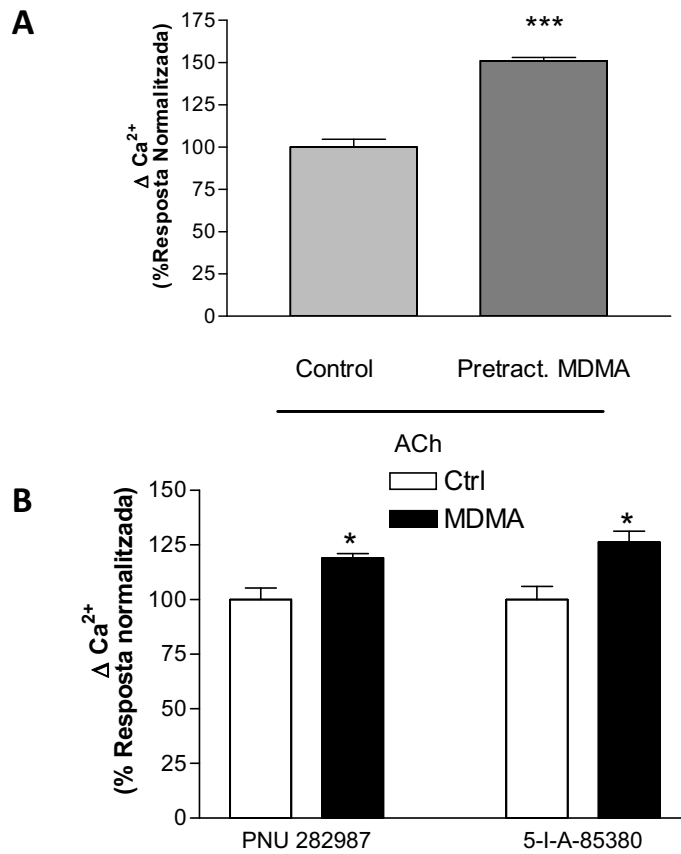


Fig. 28. Efecte de la preincubació amb MDMA (50 µM) durant 24 hores sobre l'increment de Ca^{2+} citosòlics induït per l'ACh (A) i per agonistes selectius dels nAChR PNU 282987 ($\alpha 7$, 0.1 µM) i 5-I-A-85380 (nAChR que contenen la subunitat $\beta 2$, 15 µM). Després de la preincubació es rentaren i s'incubaren les cèl·lules amb Fluo-4, a continuació es monitoritzà l'increment de calci després de l'addició dels agonistes. Els valors de fluorescència es normalitzaren respecte els de les cèl·lules tractades amb vehicle (Control) i corresponen a la mitjana de 3 experiments diferents \pm EEM.

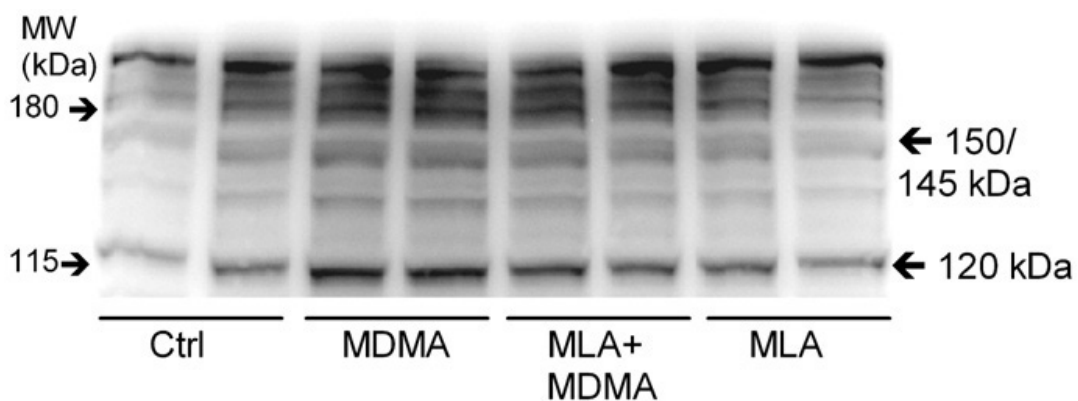
* : comparació vs control; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

L'MDMA indueix la fragmentació de l'espectrina mitjançant l'activació de calpaïna i caspasa

Un increment sostingut de la concentració de Ca^{2+} citosòlic induït per MDMA podria induir l'activació de la calpaïna, una proteasa calci-dependent. Com a resultat de la seva activació es pot observar la fragmentació de diferents proteïnes; un dels substrats més característics és l' α -espectrina que es fragmenta en 2 productes de 145 i 150 KDa. Les cèl·lules PC12 van ser tractades durant 24 hores amb MDMA 50 μM . Mitjançant la tècnica de Western blot es va observar que el tractament amb MDMA induïa un increment significatiu en els nivells de fragments d'espectrina (*spectrin breakdown products*, SBDP) de 145 i 150 KDa, indicatiu de l'activació de la calpaïna (**% SBDP 145-150KDa: Control** 100 ± 14.56 , **MDMA** 149.9 ± 1 , **MLA** 121.6 ± 5.33 , **MLA+MDMA** 113.6 ± 1.53 ; MDMA vs Control $P < 0.05$). Alhora, es va observar un increment molt significatiu en el fragment de 120 KDa SBDP indicant una activació de la caspasa-3 (**% SBDP 120KDa: Control** 100 ± 10.2 , **MDMA** 178.79 ± 5.86 , **MLA** 92.92 ± 7.59 , **MLA+MDMA** 90.85 ± 4.18 ; MDMA vs Control $P < 0.01$). La caspasa-3 també pot produir un fragment SBDP de 150 KDa (Wang i col., 2000).

Per altra banda, la coincubació de les cèl·lules amb MDMA i MLA (10nM), va donar lloc a la inhibició de la fragmentació de la espectrina per calpaïna i caspasa-3, indicant que els receptors nicotínics $\alpha 7$ tenen un paper clau en aquest procés.

A



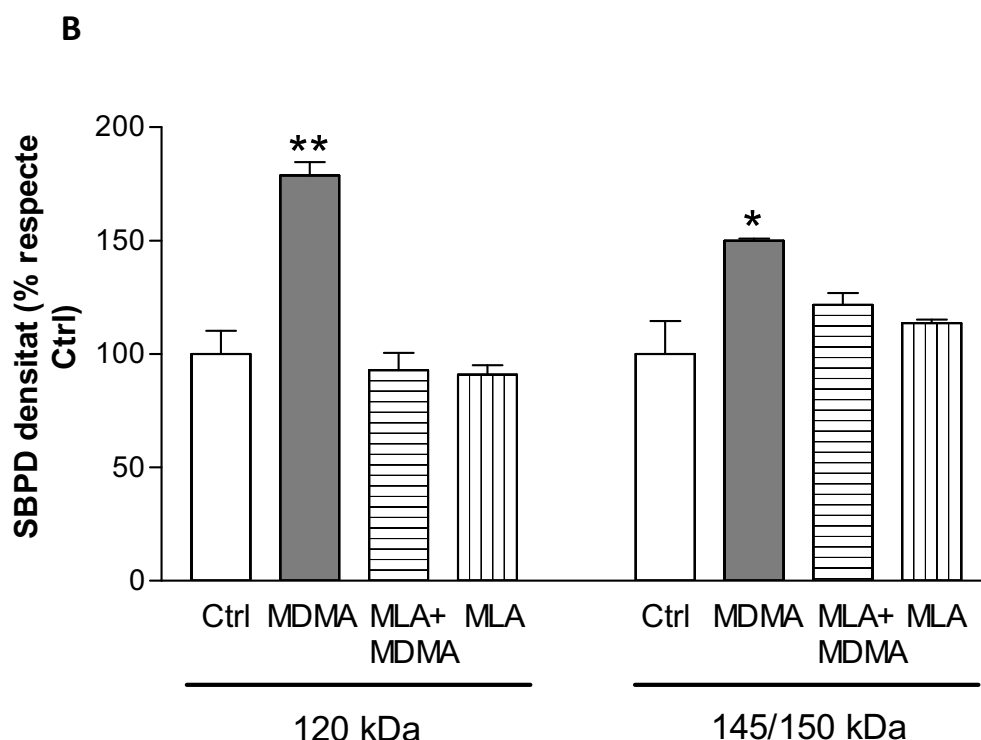


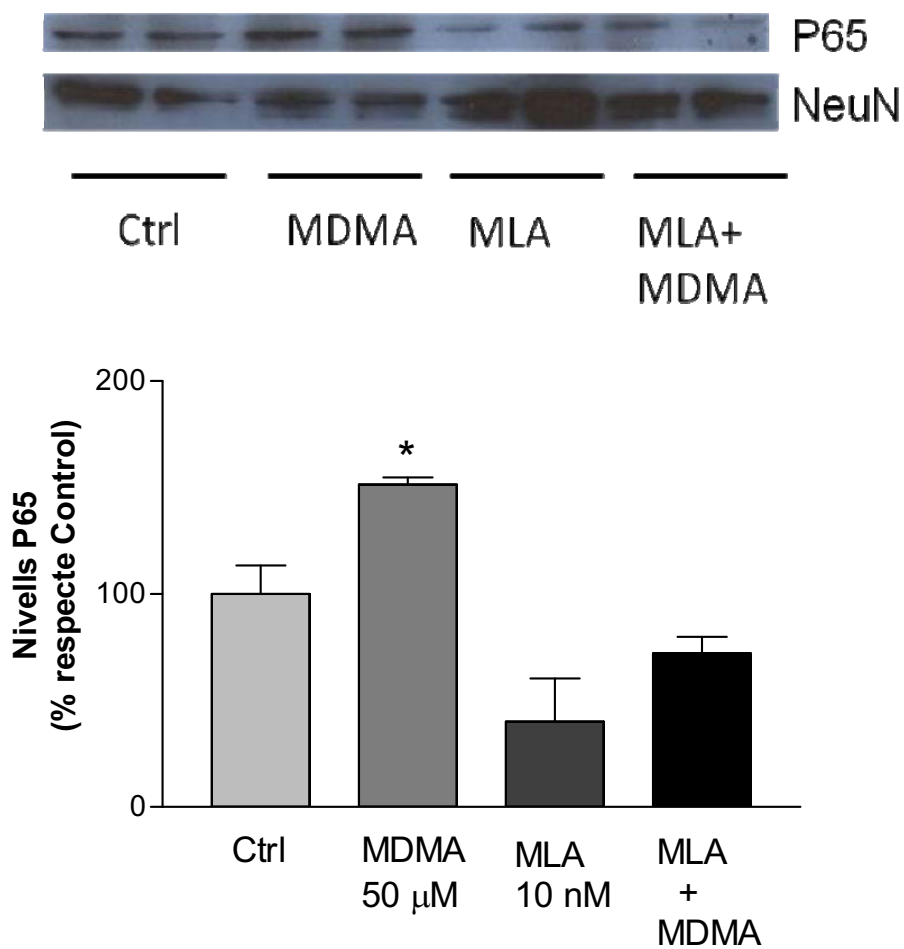
Fig. 29. (A) Western blot representatiu dels productes de la fragmentació d' α -espectrina (SBPD) originats per l'activació de la calpaina (145 i 150 kDa) i la caspasa-3 (120 i 150 kDa) després de 24 hores de tractament amb medi de cultiu (Ctrl), MDMA (50 μ M), MDMA + MLA (10 nM), and MLA sola. La localització dels marcadors de pes molecular (MW) es mostra a l'esquerra de la imatge. (B) Quantificació de la intensitat de les bandes SBPDs. Les dades s'expressen com la mitjana \pm EEM de tres cultius diferents, cada condició per duplicat. * : comparació vs control; * P < 0.05, ** P < 0.01.

Tal com està descrit (Baghdiguan i col., 1999; Han i col., 1999; Goñi-Oliver i col., 2007), a conseqüència de l'activació de la calpaina es pot observar l'activació de el factor NF κ B i la GSK-3, proteïnes implicades en les vies d'apoptosi.

El tractament amb 24 hores d'MDMA 50 μ M va induir la fragmentació del complex NF κ B-I κ B en el citoplasma i la conseqüent translocació de l'NF κ B al nucli, que va ser detectat mitjançant immunodetecció de la subunitat P65 que forma l'NF κ B, i normalitzat per la proteïna nuclear neuronal NeuN. Per altra banda, el pretractament amb MLA (10 nM) va inhibir aquesta translocació al nucli. (% P65: Ctrl 100 \pm 13,40; MDMA 151,40 \pm 3,30; MDMA 40,160 \pm 20,300; MDMA+MDMA 72,160 \pm 7,71 ;MDMA vs Control P<0.05).

En el cas de la GSK-3, l'MDMA va induir la seva activació en el citoplasma mitjançant la seva defosforil·lació, el qual va ser inhibit per l'MLA (10 nM); el resultat va ser normalitzat per la proteïna citoplasmàtica GAPDH. (% **GSK-3-P**: Ctrl 100 ± 5.33 ; MDMA 65.36 ± 10.5 ; MLA 96.23 ± 14.35 ; MLA+MDMA 109.61 ± 3.57 ; MDMA vs Control $P < 0.05$).

A



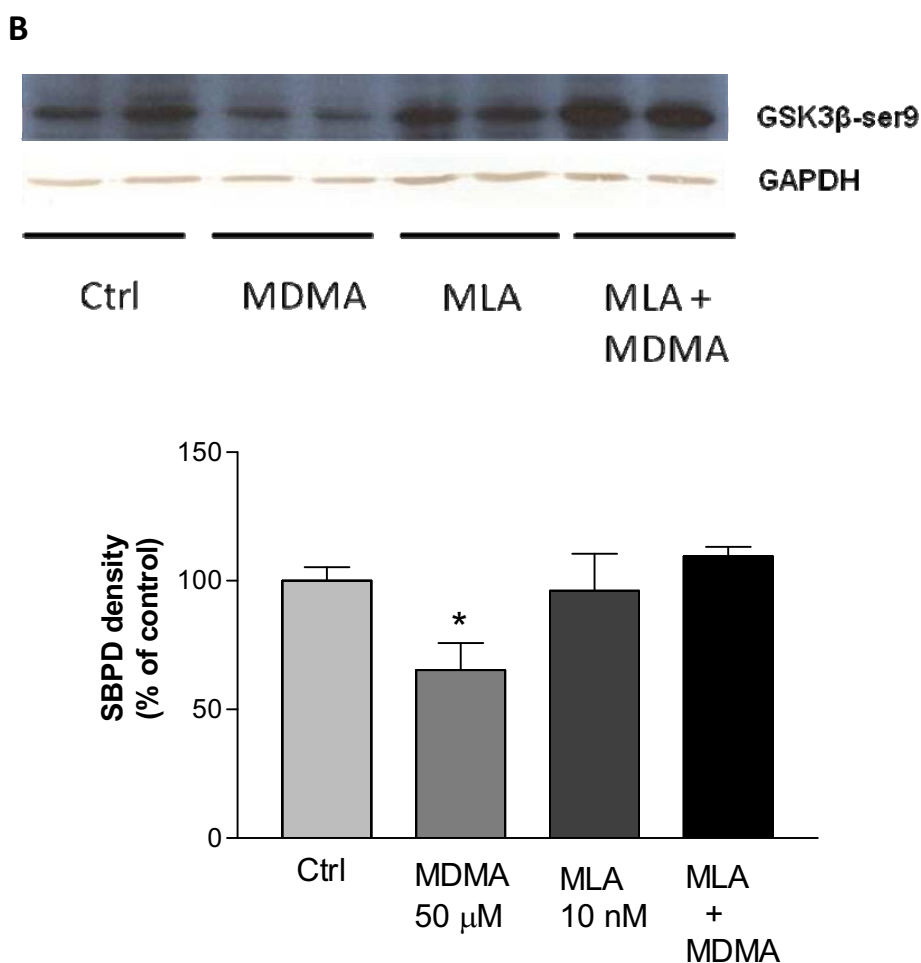


Fig. 30. Western blot representatiu i quantificació dels nivells en l'activació (A) d'NF κ B en nucli, normalitzat per la proteïna NeuN, i (B) GSK-3 en citoplasma, normalitzada per la proteïna GAPDH, induïts per MDMA (50 μ M) i inhibits pel pretractament amb MLA (10 nM). Les dades són la mitjana \pm SEM de 3 cultius diferents i cada condició per duplicat.

* : comparació vs control; * P < 0.05.

Per altra banda, la cascada d'apoptosi mediada per caspases s'inicia amb l'alliberació del citocrom C de la membrana mitocondrial al citoplasma (Reed, 1997. Revisió). En el nostre cas, l'MDMA va induir un increment del citocrom C en el citoplasma, i alhora, aquest increment va ser inhibit pel pretractament amb MLA. La inhibició de la caspasa-3 i del Cit C pel pretractament amb MLA indica que el procés s'inicia amb l'entrada de Ca²⁺ a través dels nAChR α 7. (**% Cit C:** Ctrl 100 \pm 14.26; MDMA 159.37 \pm 16.9; MLA 81.2 \pm 5.98; MLA+MDMA 84.7 \pm 21.56; MDMA vs Control P<0.05). Els nivells de proteïna de Cit C van ser normalitzats per la proteïna citoplasmàtica GAPDH.

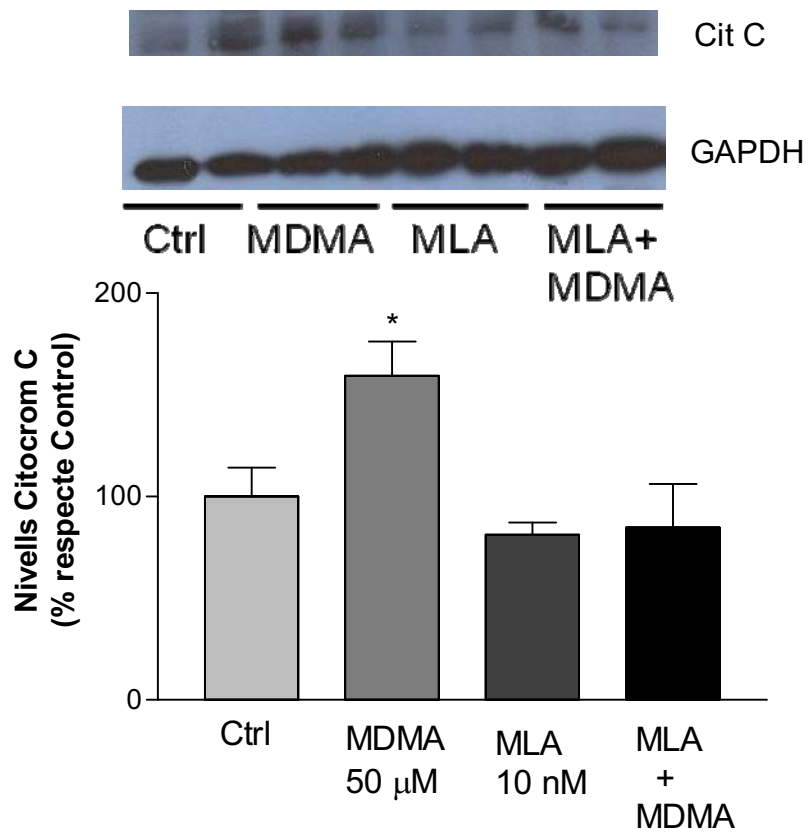


Fig. 31. Western blot representatiu i quantificació dels nivells en l'activació de citocrom C i alliberació al citoplasma per MDMA (50 μ M) i inhibits pel pretractament amb MLA (10 nM). Els nivells d'expressió de Cit C són normalitzats per GAPDH. Les dades són la mitjana \pm EEM de 3 cultius diferents i cada condició per duplicat.

* : comparació vs control; * P < 0.05.

7. ENANTIÒMERS DE L'MDMA I LA METH

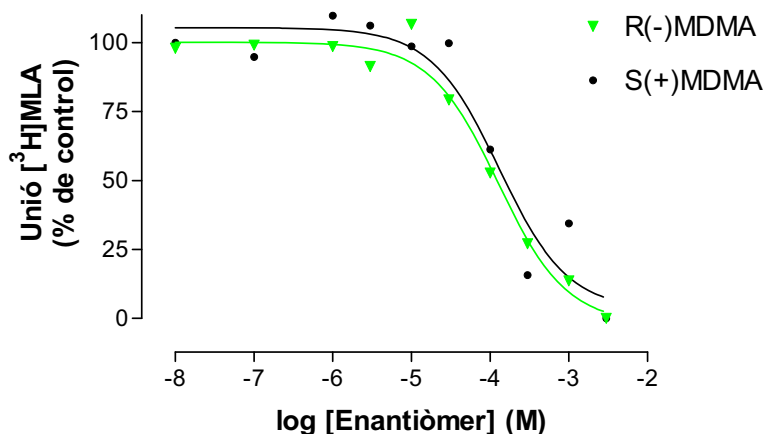
Diferències d'afinitat dels enantiòmers d'MDMA i de la METH vers els nAChR

Ja que l'MDMA i la METH que es consumeixen actualment conté barreges racèmiques dels compostos, es va determinar si existien diferències entre les formes R(-) i S(+) d'ambós derivats amfetamínics pel que fa a l'afinitat i efectes vers els nAChR.

Mitjançant assajos de competició amb [³H]MLA i [³H]EB vam determinar que ambdós enantiòmers, tant de l'MDMA com de la METH, es fixen sobre els receptors nicotínics tant homomèrics $\alpha 7$ com heteromèrics $\alpha 4\beta 2$. En el cas dels nAChR $\alpha 7$ es va utilitzar cèl·lules PC12 i pels assajos sobre nAChR $\alpha 4\beta 2$, es va utilitzar escorça de cervell de rata.

Les K_i dels enantiòmers d'MDMA sobre els receptors nAChR $\alpha 7$ no presenten diferències significatives entre elles (K_i (μM): R(-): 13.24 ± 5.27 , $n_H=0.99 \pm 0.08$; S(+): 11.64 ± 0.1 , $n_H=0.95 \pm 0.14$; $P>0.05$) ni per la barreja racèmica (K_i (μM): $15,35 \pm 1,03$, $n_H=1.35 \pm 0.11$; $P>0.05$). En canvi, les K_i dels enantiòmers de l'MDMA sobre els receptors nAChR $\alpha 4\beta 2$ sí que van presentar diferències significatives entre elles (K_i (μM): R(-): 0.63 ± 0.16 , $n_H=1.02 \pm 0.013$; S(+): 8.21 ± 2.02 , $n_H=0.75 \pm 0.11$; $P<0.05$), esdevenint l'enantiòmer R(-) el més afí, però aquest no va presentar diferències significatives respecte la barreja racèmica (K_i (μM): $1,44 \pm 0,54$, $n_H=1.03 \pm 0.04$; $P>0.05$).

A



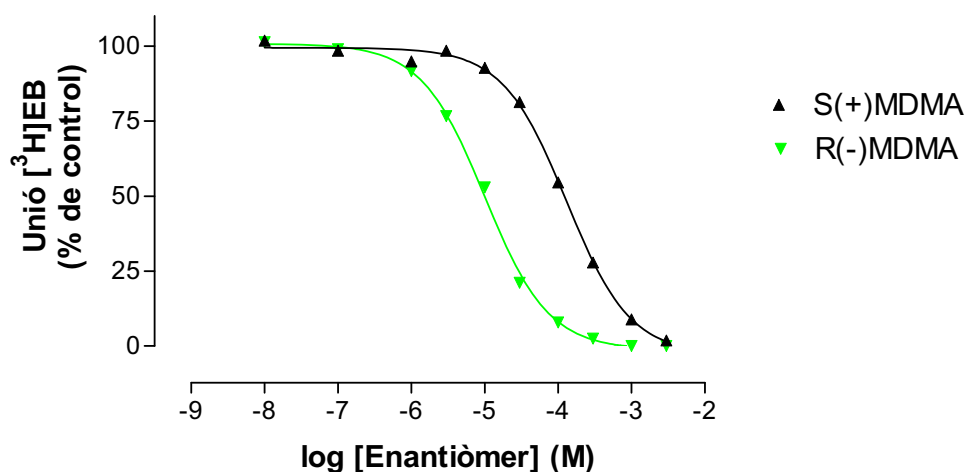
B

Fig. 32. Corbes representatives de l'assaig de competició on l'MDMA R(-) i S(+) inhibeixen la unió de la $[^3\text{H}]$ MLA en cèl·lules PC12(A) i $[^3\text{H}]$ EJB (B) en escorça de cervell de rata. Les corbes es van calcular mitjançant una regressió no lineal de quadrats mínims i ajustant a un model d'un sol lloc d'unió. Es presenten corbes representatives corresponents a un de tres experiments amb resultats similars.

Respecte la METH, quan es realitzaren assajos de competició sobre els nAChR $\alpha 4\beta 2$ es van observar diferències d'afinitat entre les K_i dels enantiòmers (K_i (μM) : R(-): 24.33 ± 1 , $n_H=0.71 \pm 0.11$; S(+): 66.76 ± 9 , $n_H=0.47 \pm 0.11$; $P<0.05$). La METH R(-) va presentar més afinitat per aquest subtipus de nAChR.

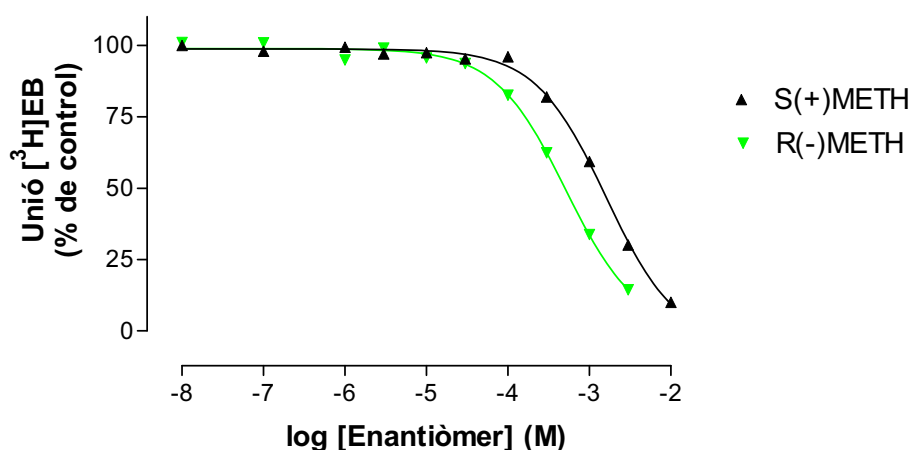


Fig. 33. Corbes representatives de l'assaig de competició on la METH R(-) i la METH S(+) inhibeixen la unió de $[^3\text{H}]$ EJB en escorça de rata. Les corbes es van calcular mitjançant una regressió no lineal de quadrats mínims i ajustant a un model d'un sol lloc d'unió. Es presenten corbes representatives corresponents a un de tres experiments amb resultats similars.

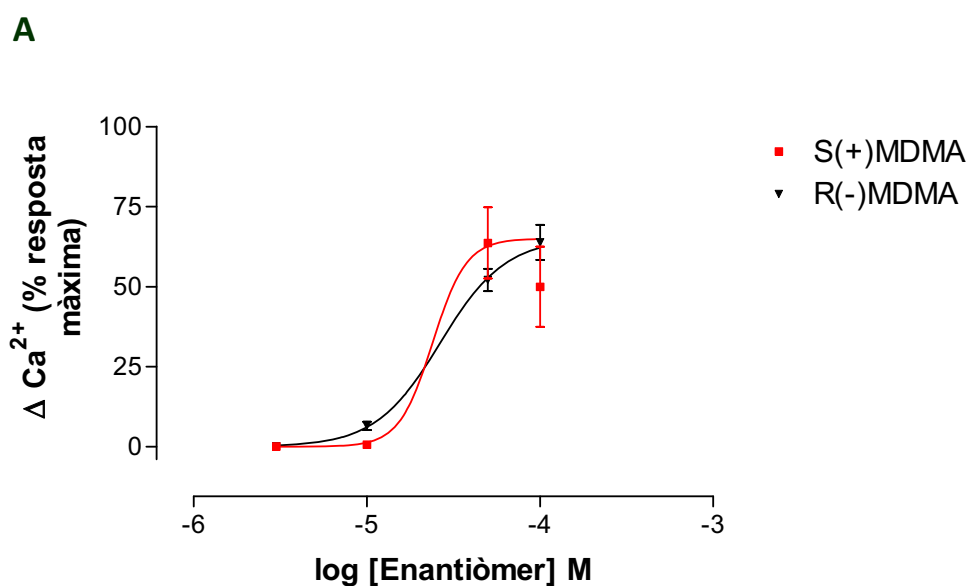
Entrada de Calci induïda pels enantiòmers de la METH i l'MDMA

Ja que ambdós isòmers de l'MDMA i la METH interaccionen amb els nAChR, es va determinar mitjançant assajos de fluorimetria si hi havia diferències en els increments de calci induïts per aquestes amfetamines i mediat pels nAChR $\alpha 7$.

Es van obtenir les corbes concentració-resposta de les dues isoformes de l'MDMA i la METH. En el cas de l'MDMA, els 2 enantiòmers van induir una entrada de Ca^{2+} , però no van assolir la resposta màxima, de la mateixa manera que s'havia observat en el cas de la barreja racèmica. Les CE_{50} obtingudes no van presentar diferències significatives (S(+)MDMA $30.45 \pm 10.2 \mu\text{M}$ i R(-)MDMA 55.68 ± 10.08 ; $n=3$, $P>0.05$).

Per altra banda, les CE_{50} dels enantiòmers de METH van presentar diferències molt significatives (S(+)METH $560 \pm 20 \mu\text{M}$ i R(-)METH $1145 \pm 72 \mu\text{M}$; $n=3$, $P<0.01$) el qual ens indica que els enantiòmers de la METH actuen de manera diferent sobre els nAChR $\alpha 7$, i que la S(+)METH és la més potent, tant com activadora com inhibidora.

Així doncs, l'MDMA presenta unes CE_{50} d'ordre micromolar, a diferència de la METH que provoca un increment de Ca^{2+} a concentracions d'ordre milimolar, totalment inassolible *in vivo*.



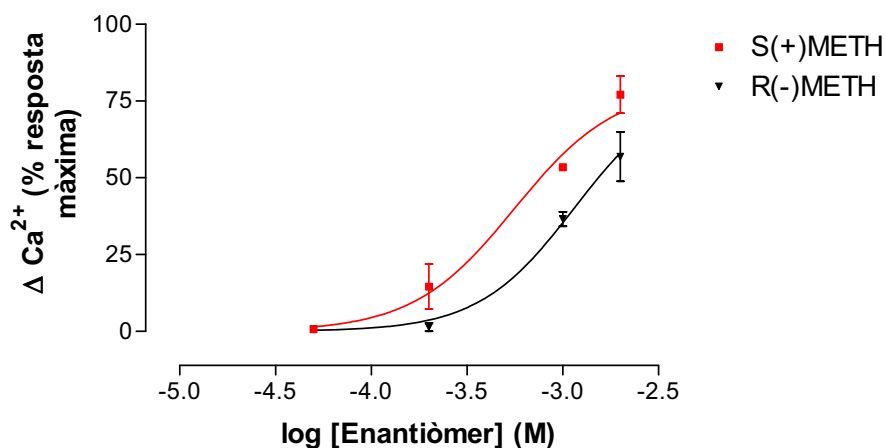
B

Fig. 34. Incrementos de Ca²⁺ citosòlic induïts pels enantiòmers R(-) i S(+) de (A) l'MDMA i (B) la METH sobre cèl·lules PC12. La resposta es normalitzada com a percentatge ($F_{\max} - F_{\min}$) i expressada com a percentatge de la resposta induïda per l'ACh sol. Totes les respostes es van mesurar en presència de PNU120596 (10 μM). Es presenten corbes representatives corresponents a un de tres experiments amb resultats similars. Els punts són la mitjana ± EEM de 4 pous per cada condició.

Les formes S(+) i R(-) de la METH, 1 mM, van presentar entre elles diferències significatives sobre l'increment de Ca²⁺ citosòlic (81.36 ± 1.05 % vs 59.2 ± 2.4 %, respectivament; $P < 0.05$), a diferència de l'S(+) i l'R(-)MDMA, 50 μM, en què ambdós enantiòmers van induir un increment similar (79.2 ± 5.3 % vs 79.24 ± 5.28 %, respectivament; $P > 0.05$). Aquests resultats coincideixen amb les CE₅₀ dels enantiòmers que ens indiquen que la S(+)-METH és més potent que l'R(-)-METH, i que els 2 isòmers de l'MDMA no presenten diferències significatives.

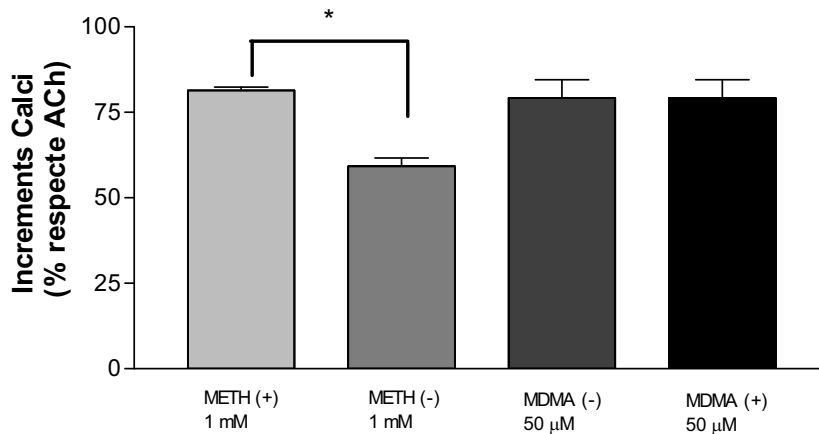
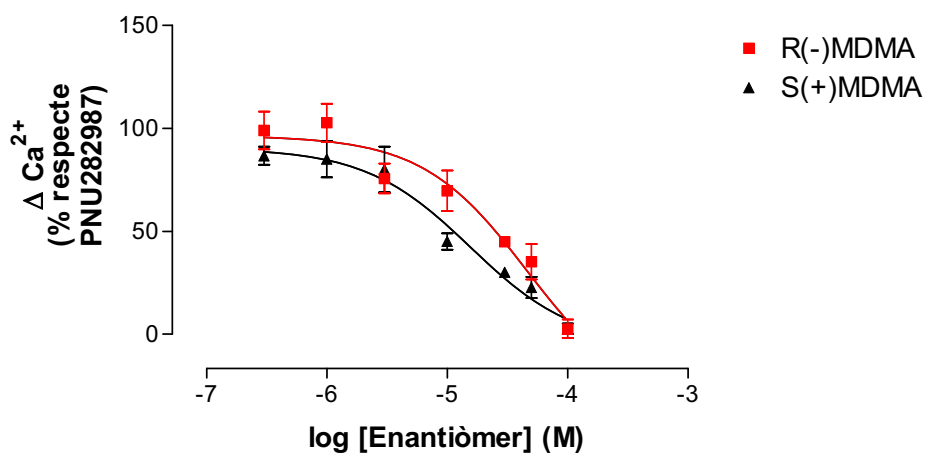


Fig. 35. Increments de Ca^{2+} induïts pels enantiòmers de l'MDMA (1 mM) i de la METH (50 μM). La resposta és normalitzada com a percentatge ($F_{\text{max}}-F_{\text{min}}$) i expressada com a percentatge de la resposta induïda per l'ACh sol. Totes les respostes es van mesurar en presència del PNU120596 (10 μM). Els resultats s'expressen com a mitjana \pm EEM de 3 experiments amb quadruplicats per cada condició. *Comparació entre grups marcats. * $P < 0.05$.

Per tal de determinar l'efecte específic de l'MDMA i la METH sobre els nAChR, es van obtenir les corbes d'inhibició de la resposta induïda per l'agonista específic $\alpha 7$, PNU282987. Es van observar diferències significatives en la inhibició induïda per ambdós isòmers de l'MDMA. Les CI_{50} per als nAChR $\alpha 7$ van ser de $46 \pm 2.12 \mu\text{M}$ i $15 \pm 5.5 \mu\text{M}$ $n=3$ ($P < 0.05$), R(-)MDMA i S(+)MDMA respectivament, i en el cas de la METH, les diferències entre les CI_{50} també van ser significatives (S(+)) METH $326 \pm 2 \mu\text{M}$ i R(-)METH $466 \pm 5.2 \mu\text{M}$; $n=3$ $P < 0.05$). Els isòmers S(+) tan de l'MDMA com de la METH van esdevenir més potents.

A



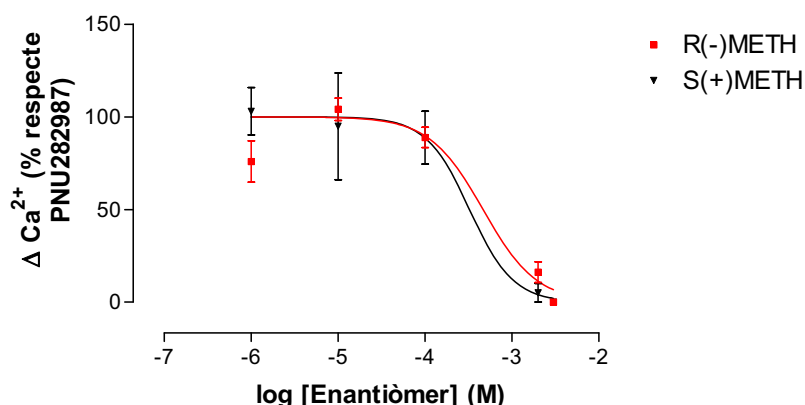
B

Fig. 36. Efecte concentració-depenent dels enantiòmers de (A)l'MDMA i (B)la METH sobre l'entrada de Ca^{2+} induïda per l'agonista específic $\alpha 7$, PNU 282987 (0.1 μM) en cèl·lules PC12 carregades amb Fluo-4. L'MDMA va ser afegit a les cèl·lules 5 min abans que l'agonista. Totes les mesures es van fer en presència del modulador al·lostèric PNU 120596 (10 μM). Els resultats van ser normalitzats ($F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$) i representats com a percentatge respecte l'efecte obtingut en absència de derivat amfetamínic. El gràfic és representatiu d'un de 3 experiments amb resultats similars. Els punts són la mitjana \pm EEM de 4 pous per cada condició.

Tal com passa amb l'MDMA, amb la METH també s'observa que la concentració a la qual inhibeix l'increment de Ca^{2+} induït per PNU282987 és menor però molt propera a la concentració a la qual activa pròpiament el receptor. Això fa difícil separar ambdós efectes.

Entrada de Sodi i els enantiòmers de l'MDMA i la METH

Vam fer un estudi comparatiu de la METH i l'MDMA sobre l'increment de sodi intracel·lular per tal d'observar diferències en l'efecte d'aquests compostos sobre els nAChR heteromèrics $\beta 2$, els quals indueixen l'alliberació de dopamina implicada en l'addicció. Per a realitzar aquest estudi es van utilitzar cèl·lules corticals de cultius primaris de ratolí donat que les cèl·lules PC12 no incorporaven el fluorocrom. Tant la barreja racèmica com els dos isòmers d'MDMA van inhibir de forma concentració-dependent els corrents de sodi induïts pel 5-I-A85380. Les CI_{50} pels nAChR $\alpha 4\beta 2$ van ser: MDMA (+/-) $5.09 \pm 0.1 \mu\text{M}$; R(-)MDMA $0.37 \pm 0.02 \mu\text{M}$, S(+)-MDMA: $9.7 \pm 1 \mu\text{M}$, $n=3$ ($P<0.05$). En cap dels casos, l'MDMA va induir un increment de sodi intracel·lular, sinó que es comporta sempre com un antagonista dels nAChR heteromèrics $\beta 2$.

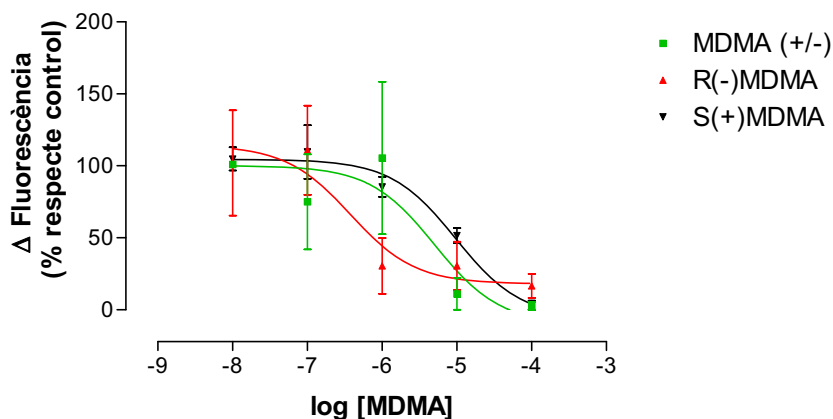


Fig. 37. Efecte dels enantiòmers de l'MDMA concentració-dependent sobre la resposta de l'agonista nicotínic β_2 5-I-A-85380 (15 μ M) en cèl·lules cortical de cultius primaris incubades amb CoroNa-Green. L'MDMA va ser afegit a les cèl·lules 5 min abans que l'agonista. Els resultats van ser normalitzats ($F_{\max} - F_{\min}$) i representats com a percentatge respecte l'efecte obtingut en absència de derivat amfetamínic; els valors són la mitjana \pm EEM de 3 experiments, alhora quadruplicats de cada condició.

Per altra banda, els dos enantiòmers de la METH van inhibir l'entrada de Na^+ induïda pel 5-I-A85380 de manera concentració-dependent, però sense inhibir completament la resposta de l'agonista ni presentar diferències significatives entre ells. Les CI_{50} van ser de S(+)-METH: $12.06 \pm 2.1 \mu\text{M}$ i R(-)-METH: $13.68 \pm 1.3 \mu\text{M}$, $n=3$ ($P>0.05$).

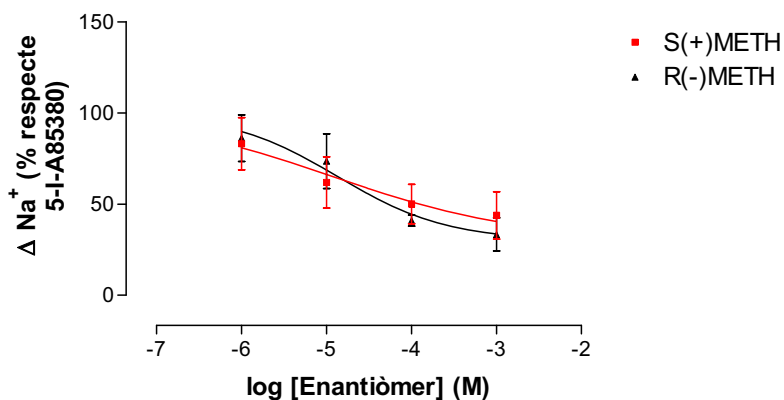


Fig. 38. Efecte dels enantiòmers de la METH concentració-dependent sobre la resposta de l'agonista nicotínic β_2 5-I-A-85380 (15 μ M) en cèl·lules cortical de cultius primaris incubades amb CoroNa-Green. L'MDMA va ser afegit a les cèl·lules 5 min abans que l'agonista. Els resultats van ser normalitzats ($F_{\max} - F_{\min}$) i representats com a percentatge respecte l'efecte obtingut en absència de derivat amfetamínic. Els valors són la mitjana \pm SEM de 3 experiments, alhora quadruplicats de cada condició.

Ahora, tant l'R(-) com l'S(+)-METH van induir un increment de sodi intracel·lular de manera concentració-dependent, però no van presentar diferències significatives en la seva CE_{50} : R(-)-METH: $257.9 \pm 0.8 \mu\text{M}$ i S(+)-METH: $223.6 \pm 3.3 \mu\text{M}$, $n=3$ ($P>0.05$).

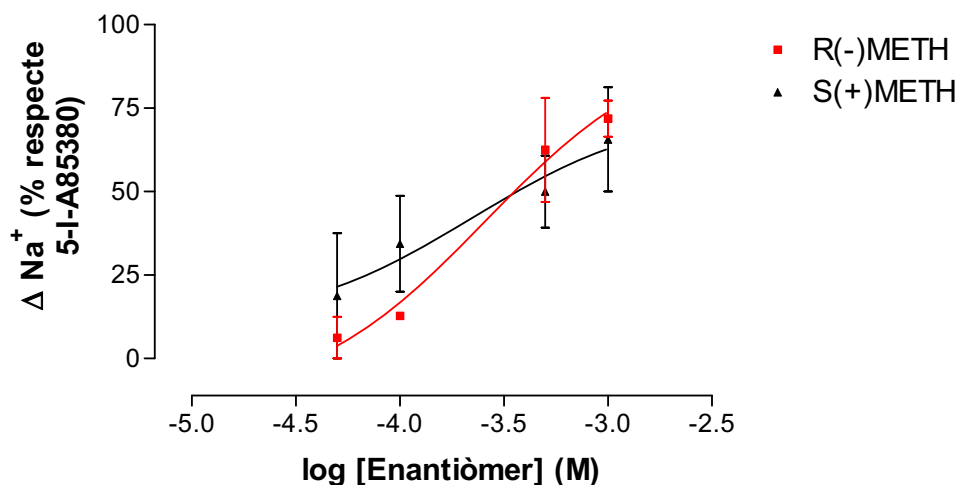


Fig. 39. Corbes representatives concentració-resposta en cèl·lules corticals de ratolí mostrant un increment de Na^+ citosòlic induït per l'S(+) i l'R(-)-METH. Les respostes es van normalitzar com a percentatge de ($F_{\text{max}}-F_{\text{min}}$) i es representen com a percentatge de la resposta màxima del 5-I-A85380 $15 \mu\text{M}$. Les dades representades són la mitjana \pm EEM de quatre duplicats per a cada condició.

TAULES RESUM

Compostos	PC12	
	K_i (μM)	n_H
S(+)-METH	283 ± 109	1.2 ± 0.15
(+/-)-MDMA	15.35 ± 1.03	1.35 ± 0.11
R(-)-MDMA	13.24 ± 5.27	0.99 ± 0.08
S(+)-MDMA	11.64 ± 0.1	0.95 ± 0.14

Taula 7. K_i de les diferents isoformes de l'MDMA i la METH per als nAChR $\alpha 7$ en cèl·lules PC12. Els valors de la K_i es van obtenir a partir de les corbes de competició dels assaigs d'unió d' $[^3\text{H}]\text{MLA}$ i van ser calculades amb l'equació de Cheng-Prusoff. Les dades representades són la mitjana \pm EEM de 3 experiments similars.

Compostos	PC12	
	CI ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)
R(-)METH	466 ± 20	1145 ± 72
S(+METH	326 ± 2 *	560 ± 5.2 *
(+/-)MDMA	29.88 ± 2.52	49.75 ± 5.71
R(-)MDMA	46 ± 2.12	55.68 ± 5
S(+MDMA	15 ± 5.5 *	30.45 ± 3.5

Taula 8. CE₅₀ i CI₅₀ de les diferents isoformes de l'MDMA i la METH sobre el receptor α7 en cèl·lules PC12. Els valors de la CE₅₀ es va obtenir a partir de les corbes concentració-resposta mitjançant assajos de fluorimetria amb Fluo-4, i les CI₅₀ a partir de les corbes d'inhibició dels corrents de Ca²⁺ induïts per PNU282986. Les dades representades són la mitjana ± EEM de 3 experiments similars. * Comparació entre enantiòmers; *P<0.05.

Compostos	CV rata	
	K _i (μM)	n _H
R(-)METH	24.33 ± 1	0.71 ± 0.11
S(+METH	45.33 ± 9	0.47 ± 0.11
(+/-)MDMA	1.44 ± 0.54	1.03 ± 0.04
R(-)MDMA	0.63 ± 0.16	1.02 ± 0.013
S(+MDMA	8.21 ± 2.02	0.75 ± 0.11

Taula 9. K_i de les diferents isoformes de l'MDMA i la METH per als nAChR α4β2 en cervell total de rata. Els valors de la K_i es van obtenir a partir de les corbes de competició dels assaigs d'unió d'[³H]EB i van ser calculades amb l'equació de Cheng-Prussoff. Les dades representades són la mitjana ± EEM de 3 experiments similars.

Compostos	Cèl·lules corticals	
	CI ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)
R(-)METH	13.68 ± 1.3	257.9 ± 0.8
S(+METH	12.06 ± 2.1	223.6 ± 3.3
(+/-)MDMA	5.09 ± 0.1	
R(-)MDMA	0.37 ± 0.02 *	
S(+MDMA	9.7 ± 1	

Taula 10. CE₅₀ i CI₅₀ de les diferents isoformes de l'MDMA i la METH en cultius primaris de cèl·lules corticals de ratolí. Els valors de la CE₅₀ es va obtenir a partir de les corbes concentració-resposta mitjançant assajos de fluorimetria, i les CI₅₀ a partir de les corbes d'inhibició dels corrents de Na⁺ induïts per 5-I-A 85380; el fluorocrom que es va utilitzar va ser CoroNa green. Les dades representades són la mitjana ± EEM de 3 experiments similars. * entre enantiòmers; *P<0.05.

8. EXPERIMENTS REALITZATS EN RATOLINS AMB LA DELECIÓ DEL RECEPTOR $\alpha 7$

Fixació de [3 H]MLA

En primer lloc, es va realitzar un assaig de fixació d' [3 H]MLA per comprovar que no hi havia nAChR $\alpha 7$ en els cervells dels ratolins de la soca *knockout* $\alpha 7$. El resultat va ser que no hi havia unió específica en aquesta soca, mentre que sí que n'hi havia en la soca control.

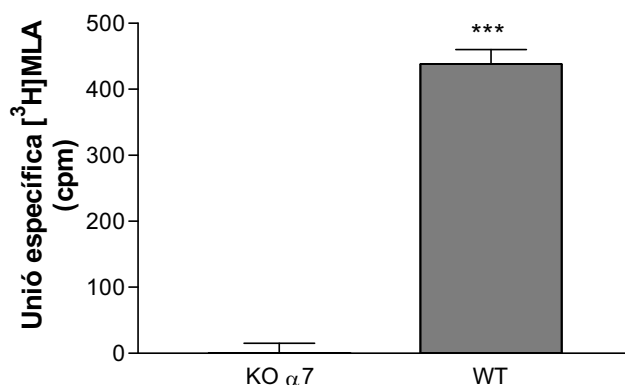


Fig. 40. Gràfic representatiu que mostra l'absència d'unió específica de l' [3 H]MLA en els ratolins KO $\alpha 7$, el qual ens indica que aquests animals no expressen nAChR $\alpha 7$. * : comparació vs control; ** *P<0.001.

Efecte del tractament en l'increment de temperatura

Després d'una hora de la segona dosi d'MDMA es va prendre la temperatura dels animals, i es va observar que els animals de la soca wt presentaven increment de la temperatura 1.22 $^{\circ}$ C respecte la mitjana del control, de manera molt significativa (P<0.01), a diferència del animals KO $\alpha 7$ que no van presentar cap increment de la temperatura. Cal destacar que els animals KO control, presentaven una temperatura lleugerament més elevada que els animals control de soca salvatge.

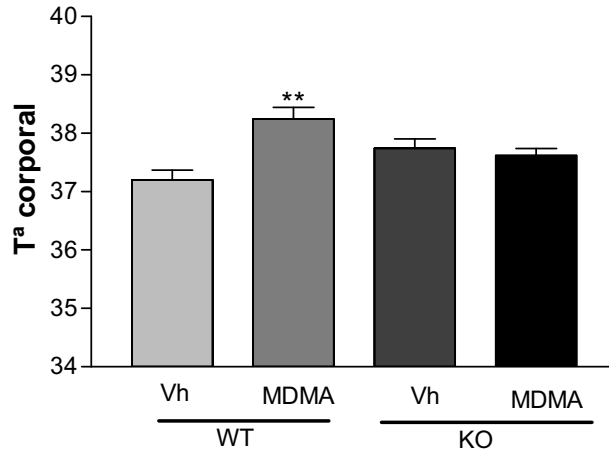
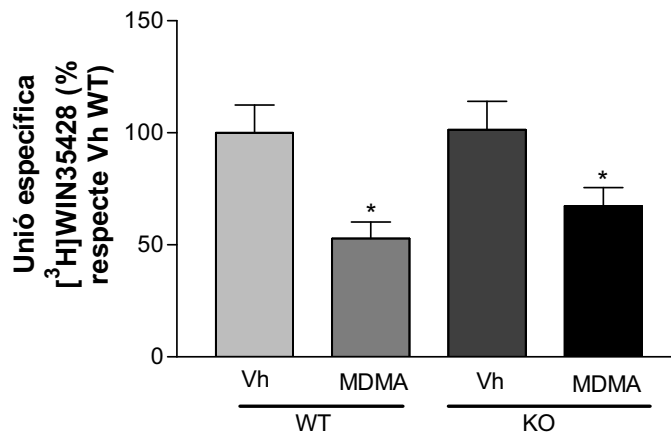


Fig. 41. Incrementos de la temperatura corporal dels ratolins wt i els KO $\alpha 7$, induïts pel tractament amb MDMA (després de la 2^a dosi de 25mg/kg). * : comparació vs control; ** P<0.01

Degeneració dels terminals dopaminèrgics

Mitjançant assajos d'unió de [³H]WIN35428 en preparació crua de l'estriat, vam observar que la pèrdua de terminals dopaminèrgics induïda per l'MDMA va ser significativa, però similar en ambdues soques de ratolins (**% [³H]WIN**: Vh WT 100 ± 12.4, MDMA WT 52.8 ± 7.4, Vh KO 101.5 ± 12.6, MDMA KO 67.3 ± 8.3; Control vs MDMA P<0.05). Alhora aquest resultat es va corroborar mitjançant la immunodetecció de Tirosina hidroxilasa (**%Nivells Tirosina hidroxilasa**: Vh WT 100 ± 28.5, MDMA WT 43.6 ± 9.9, Vh KO 108.33 ± 10.2, MDMA KO 55.34 ± 6.67; Control vs MDMA P<0.05).

A



B

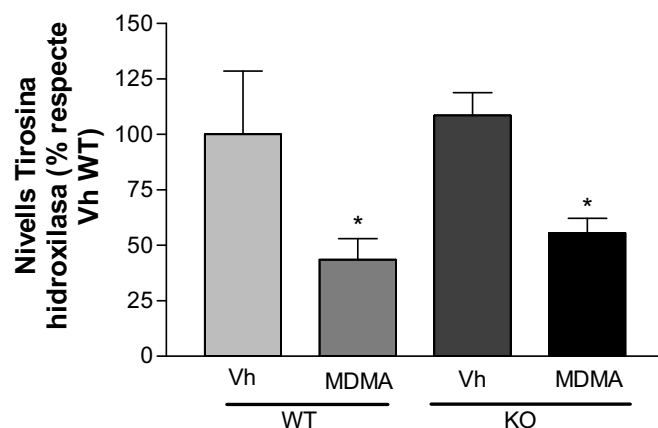


Fig. 42. Gràfics representatius de la pèrdua de terminals dopaminèrgics després del tractament dels ratolins WT i KO α 7 amb MDMA (25mg/kg). (A) Nivells d'unió de [3 H]WIN35428 i (B) Nivells de tirosina hidroxilasa. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls Vh WT \pm EEM.

* : comparació entre grups. *P<0.05.

Degeneració dels terminals serotoninèrgics

En el cas dels terminals serotoninèrgic, vam determinar la seva possible pèrdua mitjançant l'assaig d'unió de [3 H]Paroxetina en estriat; en cap cas l'MDMA va induir la seva degeneració, i els resultats obtinguts van ser similars per ambdues soques.

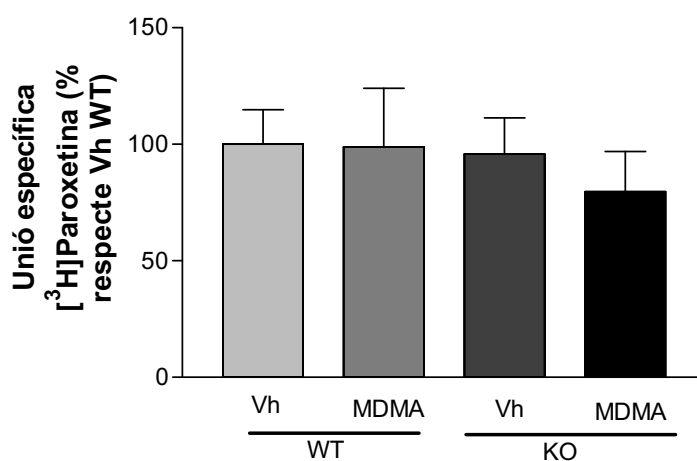


Fig. 43. Gràfics representatius de la pèrdua de terminals serotoninèrgics en estriat després del tractament dels ratolins WT i KO α 7 amb MDMA (25mg/kg). Nivells d'unió de [3 H]Paroxetina. Els valors s'expressen com a percentatge respecte els controls Vh WT \pm EEM.

Discussió i conclusions

Els derivats amfetamínics com l'èxtasi i la metamfetamina segueixen en l'actualitat essent un dels grups de drogues més consumits, amb un consum normalment associat a esdeveniments lúdico-festius. Com s'ha comentat a la Introducció, preocupen els efectes que a llarg termini pot provocar el consum d'aquestes drogues, tant a nivell psiquiàtric com neurològic (neurotoxicitat i malalties associades).

La producció d'espècies reactives d'oxigen (ROS) ha estat proposat com mecanisme principal de la neurotoxicitat induïda pels derivats amfetamínics (Cadet i col., 1995 ; Yamamoto i Zhu, 1998), encara que els mecanismes pels quals es dona un increment en les ROS encara no està ben descrit. En treballs recents del nostre grup (Pubill i col., 2005; Escubedo i col., 2005; Chipana i col., 2006) es va demostrar la producció de ROS induïda per METH i MDMA, encara que especial, en l'interior de sinaptosomes de rata i ratolí, i alhora es va demostrar quelant el calci com la dopamina endògena eren necessaris per a que es pogués donar aquesta producció de ROS, descrivint així una de les vies implicades en la neurotoxicitat induïda per aquest derivats amfetamínics.

Un treball anterior de Liu i col. (2003), descrivia com la d-Amfetamina induïa un increment de calci intracel·lular en cèl·lules cromafins bovines que induïa la secreció de catecolamines. Alhora, l' α -Bungarotoxina, un antagonista específic $\alpha 7$ inhibia aquesta entrada de calci. Basant-nos en aquest resultat, el nostre grup va demostrar tant *in vitro* com *in vivo* que l'MLA, un antagonista específic $\alpha 7$ atenuava els efectes de la METH i l'MDMA inhibint la producció de ROS. D'aquesta manera es planteja una nova diana pels derivats amfetamínics que podria estar implicada en la neurotoxicitat ja que l'activació del receptor nicotínic $\alpha 7$, provocaria una entrada de Ca^{2+} a l'interior de la cèl·lula activant enzims calci-dependents com la PKC o la nítric òxid sintasa que contribuirien a la producció de ROS.

Per a determinar si la METH i l'MDMA interaccionaven directament amb el receptor nicotínic $\alpha 7$ es van realitzar assajos de fixació de radiolligands en la línia cel·lular PC12, tipus cel·lular que es comporta com una neurona dopaminèrgica i alhora expressa aquest subtipus de receptor nicotínic i altres subtipus com el receptor nicotínic heteromèric $\alpha 4\beta 2$, subtipus majoritari en el sistema nerviós central. Tant la METH com l'MDMA van desplaçar el radiolligand específic $\alpha 7$ ($[^3H]$ MLA) i l'específic

dels nAChR heteromèrics ($[^3\text{H}]\text{EB}$). L'MDMA va presentar una afinitat més elevada per ambdós subtipus de receptors encara que les constants d'inhibició (K_i) dels dos derivats amfetamínics van resultar d'ordre micromolar. En el cas de l'MDMA les K_i van ser d'ordre micromolar baix pels dos subtipus de receptors i en el cas de la METH, d'ordre micromolar alt. En el cas del seu precursor, la d-Amfetamina va presentar una K_i sobre els nAChR heteromèrics d'ordre micromolar però més elevada que la METH i l'MDMA. Aquestes diferències entre d-Amfetamina, derivat amfetamínic i subtipus de receptor nicotínic suggereixen una rellevància fisiològica diferent per a cada cas. La K_i de l'MDMA pels receptors heteromèrics va ser $0.7 \mu\text{M}$, valor que esdevé quasi el mateix que la K_i de l'MDMA sobre el transportador de serotonina ($0.61 \mu\text{M}$; Battaglia i De Souza, 1989), principal diana fisiològica d'aquesta droga. Existeixen dades que demostren que s'assoleixen concentracions d'ordre micromolar a nivell cerebral (Chu i col., 1996; Kitaichi i col., 2003; Johnson i col., 2004), de manera que a nivell fisiològic els receptors nicotínics poden esdevenir una diana d'aquestes drogues, que es comportarien com a moduladors de la neurotransmissió nicotínica i participarien en la neurotoxicitat i addicció. També vàrem obtenir resultats similars en preparacions de cervell de ratolí i rata.

Els receptors nicotínics tenen un paper clau en l'addicció a nicotina (Govind i col., 2009). Està descrit que els efectes addictius de la nicotina es donen per la interacció d'aquesta substància amb els receptors nicotínics de la via mesolímbica, particularment del Nucli accumbens, que modulen l'alliberament de dopamina. Encara que el mecanisme pel qual s'inicia i es manté l'addicció resta desconegut, un dels possibles mecanismes podria ser la regulació a l'alça dels receptors nicotínics, és a dir, l'increment dels llocs d'unió d'alta afinitat. Es pensa que aquesta regulació a l'alça és la resposta homeostàtica a la ràpida dessensibilització induïda per una exposició perllongada a l'agonista (Fenster i col., 1999). La evidència més important que demostra que els receptors nicotínics estan relacionats amb l'addicció són els estudis de Picciotto i col. (1999), el qual utilitza ratolins "knockout $\beta 2$ " i observa que aquests animals, després del tractament amb nicotina, no s'autoadministren la droga ni presenten un increment en l'alliberació de dopamina en la VTA.

Després d'haver demostrat la interacció de la METH, l'MDMA i la d-Amfetamina amb aquests receptors, mitjançant assajos de fixació de radiol·ligands vam determinar

si l'exposició perllongada a aquestes drogues induïa també una regulació a l'alça tant dels receptors homomèrics com dels heteromèrics de manera dependent de concentració i temps d'exposició en cèl·lules PC12, obtenint resultats positius. Aquest resultat també es van corroborar en un model *in vivo*. Utilitzant una pauta de tractament que combinava una pauta de nicotina de 10 dies i una d'MDMA durant els últims 4 dies, l'MDMA va induir la regulació a l'alça dels nAChR heteromèrics i $\alpha 7$ en determinades àrees de cervell de rata. Quan l'MDMA es va associar amb la nicotina, es va potenciar el seu efecte sobre la regulació a l'alça dels nAChR heteromèrics en l'escorça i $\alpha 7$ en l'escorça i l'hipocamp. Mitjançant assajos d'immunoprecipitació i immunodetecció dels nAChR en les zones cerebrals on s'havia observat regulació a l'alça, es va observar que els nivells d'expressió de les subunitats no variaven, suggerint que el mecanisme de regulació a l'alça per l'MDMA es donaria a nivell postraduccionals. Ja que l' $[^3\text{H}]$ Epibatidina marca pràcticament tots els subtipus de receptors heteromèrics, la immunoprecipitació de les subunitats $\alpha 4$ i $\beta 2$ (ja que la seva combinació és la majoritària en mamífers) i la posterior quantificació mitjançant la unió d'aquest radiolligand va donar nivells d'increments de fixació similars als obtinguts en la fixació total, la qual cosa indica que els receptors que contenen aquestes subunitats són els que majoritàriament pateixen la regulació a l'alça. La potenciació de la regulació a l'alça tindria lloc especialment en aquells receptors heteromèrics que contenen la subunitat $\alpha 4$, ja que és en el seu immunoprecipitat on s'observa potenciació, mentre que en les associacions de $\beta 2$ amb altres subunitats aquesta no seria tan patent. Aquest resultat s'explicaria pel fet de que, tal com han demostrat diversos treballs, no totes les combinacions de nAChR pateixen regulació a l'alça, ni a les mateixes concentracions de lligand ni en el mateix grau. Per exemple, la combinació $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ és resistent a la regulació a l'alça (Mao i col., 2008), els receptors que contenen $\alpha 6$ només ho fan a concentracions altes i transitòries de nicotina, mentre que els $\alpha 4\beta 2$ requereixen menors concentracions, però mantingudes (Walsh i col., 2008); i les combinacions $\alpha 3\beta 2$ i $\alpha 3\beta 4$ la pateixen amb molt menor grau que les $\alpha 4\beta 2$ (Nguyen i col., 2003). Alhora, l'accessibilitat de cada lligand a cadascuna de les àrees cerebrals i el subtipus o combinació que hi predominen també pot condicionar i modular aquest fenomen. Així doncs, l'estudi en profunditat d'aquest efecte és realment complex i mereix treballs addicionals com estudis d'autoradiografia, per

localitzar de manera més precisa les zones concretes on es produeix la regulació. Immunoprecipitar amb altres anticossos per determinar si l'MDMA indueix la regulació a l'alça addicional d'un subtipus que no altera la nicotina també podria aportar una informació valuosa. Sigui com sigui, en aquest treball es demostra que els derivats amfetamínics i particularment l'MDMA poden induir la regulació a l'alça dels nAChR, tan *in vitro* com *in vivo*, després de determinades pautes de tractament. Cal recordar, tal i com s'ha dit a la revisió teòrica, que aquesta regulació la poden produir tan agonistes com antagonistes dels nAChR.

Per altra banda, ja que l'MDMA té com a diana principal el SERT, mitjançant assajos d'unió de [³H]Paroxetina, vam observar que el tractament amb MDMA disminuïa els nivells de SERT en hipocamp i escorça, el qual indicava que aquesta pauta de tractament encara provocava degeneració dels terminals serotoninèrgics. De tota manera, el tractament es va fer sense incrementar la temperatura ambient per no afavorir la neurotoxicitat, ja que el que es volia era veure l'efecte sobre el nAChR. Tot i així, es pot observar la regulació a l'alça que en algunes àrees podria estar emmascarada (o afavorida) pels efectes neurotòxics. Caldria trobar altres pautes de tractament amb MDMA que minimitzessin la neurotoxicitat i permetessin detectar només els canvis en els nAChRs.

Existeixen diverses hipòtesis sobre el mecanisme pel qual la nicotina indueix la regulació a l'alça. Treballs com el de Marks i col. (1992) demostren que es dona a nivell postranscripcional ja que no s'observen canvis en el mARN després de l'exposició a nicotina "*in vivo*" durant 10 dies. Altres hipòtesis impliquen: una disminució en la velocitat de reciclatge dels receptors que es troben en la membrana cel·lular (Peng i col., 1994) el qual significa que incrementa el nombre de receptors en membrana; un increment en el transport de receptors a la membrana (Harkness i Millar, 2002); un increment en la maduració i l'ensamblatge de noves subunitats en el reticle endoplasmàtic (Nashmi i col., 2003; Sallette i col., 2005; Kuryatov i col., 2005); canvis en la estequiometria dels receptors que dona lloc a diferents afinitats pels lligands (de 3:2 a 2:3) (Nelson i col., 2003; Moroni i col., 2006). Per contra, el treball de Wecker (2010) demostra que la nicotina no indueix canvis en l'estequiometria del receptor $\alpha 4\beta 2$. També s'ha proposat el bloqueig de la degradació de subunitats del receptor en el reticle endoplasmàtic mediat pel proteasoma (ERAD) (Christianson i Green, 2004;

Ficklin i col., 2005; Rezvani i col., 2007); i en últim lloc, el treball de Vallejo i col. (2005) on es dona un increment/estabilització dels receptors nicotínics d'alta afinitat que corrobora el treball d'altres grups (Buisson i col., 2000 i 2001). Aquesta última hipòtesi es basa en la transició entre dos estats d'afinitat; per una banda l'estat de repòs, on l'afinitat per la nicotina i altres agonistes esdevé molt baixa, però s'hi poden unir i induir la desensibilització del receptor, i de l'altra, l'estat de regulació a l'alça, on incrementa l'afinitat pels agonistes però no hi ha canvis en el nombre de receptors (Buisson i col., 2000 i 2001).

Per tal de corroborar o descartar algunes de les hipòtesis esmentades, per a determinar si l'MDMA i la METH produïen un increment en la unió de radiolligand bé per un increment del nombre total de receptors o bé pel l'increment en el nombre de receptors en estat d'alta afinitat, es van realitzar assajos de saturació amb radiolligands per tal de determinar la B_{max} (densitat de receptors) i la K_D (afinitat). En el cas dels receptors homomèrics $\alpha 7$, va incrementar la seva densitat (B_{max}) sense diferències en la K_D , a diferència dels heteromèrics, en els quals va incrementar la B_{max} també que era la població de receptors en estat d'alta afinitat. Per comprendre aquests resultats s'ha de tenir en compte que l'epibatidina és un agonista que, a concentracions baixes té major capacitat d'unir-se a receptors en estat d'alta afinitat; a més, com s'observa amb el coeficient de Hill, no s'ajusta a un model d'un únic lloc d'unió. Per tant, permet caracteritzar els dos estats del receptor (alta i baixa afinitat). En canvi, l'MLA és un antagonista que pot unir-se a tota la població de receptors, no diferencia entre receptors en membrana i formes prematures intracel·lulars (Molinari i col., 1998). Així doncs, respecte els receptors heteromèrics els resultats concordarien amb Vallejo i col. (2005) demostrant que l'MDMA i la METH estabilitzen la proporció de receptors d'alta afinitat en membrana; i en canvi, en el cas dels receptors homomèrics $\alpha 7$, l'MDMA i la METH mitjançant la unió a precursors o formes immadures del receptor, incrementarien o induirien la formació de receptors capaços d'unir-se a l'[H³]MLA. Ja que actualment no es disposa d'un radiolligand agonista $\alpha 7$ que permeti la discriminació observada amb l'[³H]Epibatidina, entre estats d'alta i baixa afinitat, no podem afirmar que el mecanisme amb els nAChR sigui el mateix que amb els heteromèrics (Malysz i col., 2010).

Per tal de descriure acuradament la regulació a l'alça dels receptors nicotínics induïda per METH i MDMA, es van explorar els mecanismes de regulació implicats. Basant-nos en els treballs de Marks i col. (1992) es va estudiar la participació de la síntesi proteica. La Cicloheximida, un inhibidor de la síntesi proteica, va inhibir el increment d'unió d'ambdós radiol·ligands, [³H]MLA i [³H]EB, el qual suggereix que és necessària la síntesi proteica, segurament ràpida i transitòria ja que el tractament amb cicloheximida sola, durant 6 hores, va provocar canvis en els nivells de nAChR, el qual suporta la teoria del ràpid recanvi de Cho i col. (2005) i Charpantier i col. (2005). Com ja s'ha dit abans, la regulació a l'alça induïda per nicotina no implica l'increment de ARNm dels nAChR, però en articles recents com el de Bond i col. (2009), la regulació a l'alça del receptor nicotínic $\alpha 7$ implica la síntesi d'ARNm o algun tipus de síntesis *de novo* (Bencherif i col., 1995). Aquests resultats estan d'acord amb els demostrats en aquest treball on la cicloheximida redueix els nivells de receptor nicotínic $\alpha 7$ i alhora inhibeix la regulació a l'alça induïda per l'MDMA i la METH.

La ciclofil·lina A és una xaperona encarregada del plegament correcte de les subunitats del receptor nicotínic, com $\alpha 7$ (Millar i Harkness, 2008) i $\alpha 4$ (Jeanclos i col., 2001). Així doncs, es va assajar la ciclosporina A, un inhibidor de la ciclofilina A sobre la regulació a l'alça dels nAChR induïda per METH i MDMA. El tractament amb ciclofilina sola no va provocar canvis en els nivells de nAChR $\alpha 7$, però sí que va inhibir la regulació a l'alça induïda per la METH i l'MDMA, el qual indica que la ciclofilina A està implicada en el mecanisme de regulació dels nAChR $\alpha 7$ induït pels derivats amfetamínics. El increment de receptors $\alpha 4\beta 2$ observat amb la ciclosporina A sola es pot explicar ja que aquesta molècula també és un inhibidor de la fosfatasa 2B, la qual inhibeix la desensibilització del nAChR $\alpha 4\beta 2$ (Marszalec i col., 2005), el qual induiria un increment en els llocs d'unió del radiol·ligand [³H]EB.

Vallejo i col. (2005) i Darsow i col. (2005) hipotetitzen que el mecanisme implicat en la regulació a l'alça induïda per nicotina és el control del transport dels receptors a la membrana. Basant-nos en aquests treballs es van exposar les cèl·lules a la Brefeldina A, la qual inhibeix el transport de l'aparell de Golgi al reticle endoplasmàtic. El tractament amb Brefeldina A sola va disminuir dràsticament els nivells de nAChR, però solament va inhibir lleugerament la regulació a l'alça induïda per METH i MDMA. El fet que la Brefeldina A disminuís més dràsticament els nivells de

nAChR en la membrana que la cicloheximida indica que en les cèl·lules PC12 diferenciades hi ha un reservori intracel·lular de receptors preparats implicats en la regulació a l'alça més que la síntesi de les subunitats *de novo* però que la seva sortida de l'aparell de Golgi abans d'arribar a la membrana juga un paper més aviat modest. Les vies de transducció de senyal dependents de PKC i PKA estan implicades en la regulació dels nAChR $\alpha 4\beta 2$ induïda per diversos lligands (Gopalakrishnan i col., 1997; Nuutinen i col., 2006) mitjançant la fosforil·lació de residus clau que permeten que el reticle endoplasmàtic no reconeixi la seqüència de retenció i es doni la translocació a la membrana. La idea que la fosforil·lació de les subunitats del nAChR promou la regulació a l'alça està demostrada per estudis amb nAChR de *Torpedo marmorata* on la fosforil·lació de les subunitats γ i δ no ensamblades incrementa la eficiència d'ensamblatge i el nombre de receptors en membrana (Green i col., 1991; Ross i col., 1991). De fet, està descrit que la PKC i la PKA fosforil·len la subunitat $\alpha 4$ neuronal (Pacheco i col., 2003), alhora, aquesta fosforil·lació incrementa l'afinitat de la subunitat per la chaperona 14-3-3 (Jeanclos i col., 2001) i estudis recents han demostrat que l'activació de PKC i PKA incrementa la densitat de receptors $\alpha 4\beta 2$ (Pollock i col., 2009). Donat que la fosforil·lació de la subunitat $\alpha 4$ induïda per PKC es dona a nivell dels residus de serina que es troben en el segment M3/M4 citoplasmàtic de la subunitat, queda pal·lesa la importància i implicació d'aquest bucle citoplasmàtic en l'ensamblatge i la maduració del nAChR i en últim lloc en la seva funció (Wecker i col., 2001 ; Pollock i col., 2007).

La PKA també està implicada en la desensibilització del nAChR (Nishizaki i Sumikawa, 1998). L'H-89 és un inhibidor de la PKA. El tractament amb H-89 sol va donar lloc a un increment de la unió del radiolligand [3 H]EB, resultat que va fer difícil la interpretació sobre els efectes de l'MDMA i la METH sobre la regulació a l'alça dels nAChR. El fet que no es trobessin diferències entre el tractament amb H-89 sol i associat amb METH o MDMA però que tant la METH com l'MDMA soles induïssin un increment més significatiu en la unió d' [3 H]EB ens suggereix que l'H-89 inhibeix l'efecte de la METH i l'MDMA. Aquests resultats estan d'acord amb el treball de Gopalakrishnan i col. (1997) que demostra que l'activació de l'adenilat ciclase amb forskolina potencia la regulació a l'alça dels receptors $\alpha 4\beta 2$ induïda per nicotina en cèl·lules HEK 293. Contràriament, el tractament amb H-89 sol no va tenir cap efecte

sobre la unió del radiol·ligand [³H]MLA ni sobre l'increment induït per l'MDMA i la METH, el qual corrobora que la PKA té un paper clau en la regulació a l'alça dels receptors nAChR $\alpha 4\beta 2$ i no dels $\alpha 7$. El increment dels llocs d'unió a [³H]EB induït per l'H-89 resulta complicat d'explicar si s'assumeix que es dona un increment en el nombre de receptors. Si tenim en compte que l'epibatidina, a la concentració utilitzada en aquests assaigs, s'uneix solament als nAChR d'alta afinitat, es pot deduir que l'H-89 mitjançant la reducció de la taxa de desensibilització dels receptors (Nishizaki i Sumikawa, 1998) podria incrementar la població de receptors d'alta afinitat. Una altra hipòtesi seria que, donat que els nAChR també són regulats per fosfatases (Cho i col., 2005) i altres cinases com la PKC i les tirosina cinases, la inhibició d'un d'aquests enzims donaria lloc a l'activació d'altres vies de regulació que promourien la regulació a l'alça dels nAChR.

A continuació es va assajar el GF-109203X, un inhibidor de la PKC. El tractament amb GF-109203X sol no va tenir cap efecte sobre els nivells d'unió de l' [³H]EB, però va potenciar l'efecte de la regulació a l'alça induïda per METH i MDMA. Així com succeeix amb l'H-89, la inhibició de la PKC disminuiria la taxa de desensibilització i induiria un increment en la població de receptors d'alta afinitat potenciada per el tractament amb els derivats amfetamínics. En el cas dels nAChR $\alpha 7$, no es va observar cap efecte, així com succeeix en el cas de la PKA.

Les tirosina cinases de proteïna també estan implicades en la regulació dels nAChR $\alpha 7$ i la seva inhibició a curt termini indueix la regulació a l'alça dels receptors i la potenciació de la resposta mediada per aquests (Cho i col., 2005; Charpantier i col., 2005). La genisteïna, un inhibidor d'ample espectre de les tirosina cinases de proteïna, a les 24 hores de tractament va inhibir l'efecte de la METH i l'MDMA sobre la regulació a l'alça, el qual ens indica que les tirosina cinases de proteïna estan implicades en la regulació a l'alça induïda pels derivats amfetamínics, però que depèn del temps i les condicions que es donin.

La regulació a l'alça esdevé un procés complex on estan implicades moltes vies de senyalització intracel·lular. Aquest treball ha demostrat que els mecanismes implicats en la regulació a l'alça dels nAChR $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ induïts per la METH i l'MDMA coincideixen amb els induïts per la Nicotina i que majoritàriament es donen a nivell postranscripcional coincidint amb els treballs revisats per Govind i col. (2009).

Posteriorment a l'estudi *in vitro*, es va demostrar *in vivo*, que el tractament crònic amb dosis neurotòxiques d'MDMA induïa una regulació a l'alça dels nAChR $\alpha 4\beta 2$ en escorça cerebral de rata.

La demostració que els derivats amfetamínics interaccionen directament amb els receptors nicotínics $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ corrobora la hipòtesis d'uns primers treballs del nostre grup (Chipana i col., 2005; Escubedo i col., 2005; Chipana i col., 2006) on es planteja que la unió dels derivats amfetamínics amb els receptors nicotínics potenciarà la seva activació i consegüentment, activaria o potenciarà vies calci dependents implicades en la neurotoxicitat per aquestes substàncies. Alhora, el bloqueig del receptor $\alpha 7$ per antagonistes específics com l'MLA atenuaria la neurotoxicitat induïda per aquests derivats (Chipana i col., 2006; Chipana i col., 2008). En aquests treballs també es va demostrar que la formació d'espècies reactives d'oxigen, era inhibida per l'MLA però alhora quelant el Ca^{2+} extracel·lular mitjançant EGTA, el qual indica que l'activació dels nAChR, majoritàriament $\alpha 7$, i la consegüent entrada de Ca^{2+} extracel·lular estarien implicats en aquesta neurotoxicitat induïda per les amfetamines.

Tot i que els treballs *in vivo* citats anteriorment demostren la implicació dels nAChR $\alpha 7$ en la neurotoxicitat per l'MDMA, l'obtenció d'una menor neurotoxicitat en ratolins amb deleció d'aquests receptors seria una prova encara més contundent. Els experiments duts a terme amb els ratolins de la soca amb la deleció dels nAChR $\alpha 7$, però, mostraren que aquests també pateixen una neurotoxicitat dopaminèrgica per MDMA similar a la dels de la soca salvatge. De tota manera, els ratolins *knockout* tractats amb MDMA no van presentar hipertèrmia a diferència de la soca salvatge. Aquests resultats corroboren una certa implicació d'aquests receptors en els efectes tòxics de l'MDMA. De tota manera, cal tenir en compte que, donat el paper crucial que porten a terme els receptors alfa7, és probable que la seva funció hagi estat suplida per algun altre tipus de receptors homomèrics, com els $\alpha 8$ o $\alpha 9$. Seria interessant realitzar algun estudi encaminat a determinar la possible sobreexpressió d'aquests receptors en aquesta soca de ratolins.

D'acord amb la hipòtesi formulada, l'activació dels nAChR $\alpha 7$ induiria una major entrada de calci. Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, es va dur a terme una sèrie d'assajos per a determinar quin és el paper dels derivats amfetamínics sobre la funcionalitat dels nAChR i l'entrada de Ca^{2+} . La primera hipòtesi que es va plantejar era

que l'MDMA podria actuar com un modulador de la resposta de l'acetilcolina. Mitjançant experiments de fluorimetria, es va observar que l'MDMA inhibia la resposta de l'acetilcolina de manera concentració-dependent amb un valor de la CI_{50} en el rang micromolar baix, el qual coincideix amb els valors dels resultats dels assajos de fixació (Garcia-Ratés i col., 2007). Alhora, també va inhibir l'entrada de calci induïda per l'agonista selectiu $\alpha 7$, PNU282987. De tota manera, abans d'afegir l'agonista ACh o PNU282987, es va observar que l'aplicació prèvia d'MDMA induïa un increment concentració-depenent dels nivells basals de Ca^{2+} , el qual ens indica que l'MDMA per si sol pot induir l'entrada de Ca^{2+} en la cèl·lula, i alhora actuar com un antagonista en front d'un agonista. Això es va corroborar a l'obtenir una corba concentració-resposta d'entrada de Ca^{2+} induïda per MDMA. La resposta de l'MDMA no va arribar als nivells de l'ACh, agonista total dels nAChR. D'aquesta manera es va concloure que el comportament de l'MDMA és el d'un agonista parcial dels nAChR, ja que per una banda actua com a antagonista però ell sol indueix una resposta significativa. Es van corroborar aquests resultats mitjançant experiments de electrofisiologia amb ovòcits de *Xenopus* que expressaven nAChR $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ humans, on l'MDMA va inhibir els corrents induïts per ACh sobre ambdós tipus de receptors amb una CI_{50} del mateix ordre que en els experiments de fluorimetria. La resposta induïda per l'MDMA va ser inferior en el ovòcits que en les cèl·lules PC12 ja que s'ha de tenir en compte que l'activació dels nAChR està acoblada a d'altres vies de senyalització de Ca^{2+} que en una cèl·lula adulta i completa es poden donar i en canvi, en un sistema simple com els ovòcits no es donarien aquests mecanismes. Posteriorment es va assajar la METH, la qual, de la mateixa manera que succeeix amb l'MDMA, es va comportar com un agonista parcial induint una entrada de Ca^{2+} .

L'increment de Ca^{2+} induït pels derivats amfetamínics va portar a investigar les vies implicades en la seva regulació mitjançant l'ús de inhibidors a diferents nivells. L'MLA i l' α -Bungarotoxina, van inhibir quasi completament l'increment induït per l'MDMA i la METH, implicant als nAChR $\alpha 7$ com a principal via d'entrada de Ca^{2+} . Donat que ambdós derivats amfetamínics tenen afinitat pels receptors heteromèrics $\alpha 4\beta 2$, es va assajar l'antagonista $\beta 2$, DH β E. Segons el mecanisme descrit per Dajas-Bailador i Wonacott (2004) on l'activació dels nAChR $\alpha 4\beta 2$ induiria una entrada de Na^+ provocant una despolarització i una conseqüent obertura dels Canals de calci

dependents de voltatge (VOCC). La DH β E no va tenir cap efecte sobre l'increment de Ca²⁺, el qual ens indica que possiblement tant la METH com l'MDMA no actuarien com a agonistes d'aquests receptors, el qual es corrobora amb les corbes d'inhibició realitzades mitjançant electrofisiologia.

Està descrit que les cèl·lules PC12 expressen el VOCC de tipus L majoritàriament (Plummer i col., 1989). El tractament amb nitrendipí, un blocador dels L-VOCC, a una concentració de 0.3 μ M va inhibir l'increment de Ca²⁺ en un 30 %, i a la concentració de 30 μ M, es va doblar l'efecte. Respecte aquest últim resultat s'ha de tenir en compte que el nitrendipí a aquesta concentració també pot actuar com a inhibidor dels corrents a través dels nAChR (Donnelly-Roberts i col., 1995). Per aquesta raó, vam utilitzar el cadmi (Cd²⁺), un inhibidor no selectiu dels VOCC que no bloqueja els nAChR (Trousard i col., 1993). El tractament amb Cd²⁺ va inhibir, així com el nitrendipí 0.3 μ M, un 30% l'increment induït per MDMA. Aquest resultat ens mostra que la despolarització inicial induïda per l'activació dels nAChR α 7 induiria una activació dels canals VOCC de tipus L i una conseqüent entrada de Ca²⁺ a través d'aquests.

Està descrit que l'alliberació de Ca²⁺ del reticle endoplasmàtic induïda per calci (*calcium-induced calcium release*, CICR) està lligada a l'activació dels nAChR α 7 (Dajas-Bailador i Wonnacott, 2004; Dickinson i col., 2007). Alhora, treballs previs del nostre grup van demostrar que el bloqueig dels receptors implicats en l'alliberació de les reserves de Ca²⁺ del reticle endoplasmàtic, inhibia la producció de ROS induïdes per MDMA (Chipana i col., 2008). Així doncs, es va analitzar la implicació de el receptor IP₃ i del receptor de rianodina mitjançant el tractament amb els inhibidors 2-APB i el dantrolé, respectivament, els quals van inhibir significativament l'increment de Ca²⁺ induït per MDMA.

L'ús d'un quelant de Ca²⁺ extracel·lular, l'EGTA, demostrà que l'increment de Ca²⁺ intracel·lular s'inicia a través de l'entrada de Ca²⁺ extracel·lular pels nAChR α 7 i dels VOCC tipus L, seguit d'una alliberació de les reserves del reticle endoplasmàtic.

La preincubació durant 24 hores amb MDMA va induir un increment en els nivells basals de Ca²⁺ en cèl·lules PC12. Sorprenentment, l'increment de Ca²⁺ basal es va mantenir en el cas de l'MDMA a diferència de la nicotina en que a les 24 hores de tractament els nivells de Ca²⁺ eren iguals als nivells control. Aquests resultats demostren que la cèl·lula no té la capacitat de revertir l'increment de Ca²⁺ induït per

l'MDMA, a diferència de la nicotina, el qual ens indica que una elevació de Ca^{2+} sostinguda en el temps permetria l'activació de vies dependents de Ca^{2+} implicades en processos citotòxics, com és el cas de l'activació de la calpaïna, de manera similar al que ocorre en l'excitotoxicitat per glutamat.

La calpaïna, és una proteasa dependent de Ca^{2+} , la seva activació en el sistema nerviós central està implicada en la funció sinàptica i en la memòria, i els seus substrats són proteïnes estructurals, enzims i els receptors de glutamat. La seva hiperactivació està associada a danys cel·lular importants que donen lloc a l'apoptosi i la neurodegeneració. Una de les seves proteïnes diana és l'espectrina, que a conseqüència de l'activació de la calpaïna es fragmenta en dos fragments (spectrin breakdown products, SBDP) de 145 KDa i de 150 KDa (Harris i Morrow, 1988). Alhora, la Caspasa-3, una proteasa de cisteïnes implicada en la cascada apoptòtica també té com a diana l'espectrina, i la seva activació dona lloc a dos fragments de espectrina, un de 120 KDa (Wang, 2000) i l'altre de 150 KDa (Zhang i col., 2009). Està demostrat que l'increment de Ca^{2+} intracel·lular induït per METH està implicat en la proteòlisi de l'espectrina com a resultat de processos d'excitotoxicitat (Warren i col., 2005; Staszewsky i Yamamoto, 2006) el qual està relacionat amb el resultat recents del grup de Northrop i col. (2010) que han demostrat que la METH induïx un increment en l'alliberació de glutamat dels terminals glutamatèrgics de l'estriat de rata que pot ser modulada pel nAChR $\alpha 7$ el qual relacionaria la entrada de Ca^{2+} a través dels nAChR $\alpha 7$ directament amb l'alliberació de glutamat de l'estriat que activaria els receptors AMPA dels terminals dopaminèrgics de l'estriat i la conseqüent activació de la calpaïna. Es postula que la fragmentació de proteïnes estructurals com la espectrina o la proteïna Tau induïdes per calpaïna i per caspasa-3 podrien esdevenir biomarcadors de dany cerebral (Pineda i col., 2004; Ringger i col., 2004; Gabbita i col., 2005).

L'activació de la calpaïna és l'inici d'una cascada de senyalització que durà a la cèl·lula a la seva apoptosi; dues de les seves proteïnes diana són la GSK-3 (Goñi-Oliver i col., 2007) i l'NF κ B (Baghdiguian i col., 1999; Han i col., 1999; Orio i col., 2010).

La incubació de les cèl·lules PC12 amb MDMA durant 24 hores va donar lloc a un increment del SBDP 145KDa i el de 150 KDa, el qual implicava l'activació de la calpaïna; i alhora un increment en la SBDP de 120 KDa que juntament amb l'increment en la SBDP de 150 KDa indica l'activació de la caspasa-3 induïda per MDMA. Els

resultats descrits per Northrop i col. (2010), en un model *in vivo*, queden corroborats mitjançant els resultats obtinguts amb el tractament amb MLA, que va inhibir la fragmentació de l'espectrina per calpaïna i caspasa-3 induïda per MDMA, encara que el mecanisme d'activació de la calpaïna i la caspasa-3 que queda demostrat en aquest treball és un mecanisme alternatiu al descrit per Northrop ja que les cèl·lules PC12 no diferenciades no expressen receptors AMPA (Sudo i col., 1997). Això indica un efecte directe degeneratiu per activació $\alpha 7$ sense que estigui implicada l'alliberació de glutamat.

L'incubació amb MDMA durant 24 hores va donar lloc a l'activació de l'NF κ B i la GSK-3, que alhora va ser inhibida per l'MLA, activació dependent de l'entrada de Ca^{2+} extracel·lular, tal com descriu Goñi-Oliver i col. (2009). El mateix va succeir amb la cascada de senyalització de la caspasa-3. L'MDMA va induir l'activació del citocrom C, que és alliberat de la membrana mitocondrial al citosol on té com a diana la caspasa-3. Alhora, aquesta activació va ser inhibida per l'MLA, el qual indica que l'entrada de Ca^{2+} induïda per l'MDMA a través dels nAChR $\alpha 7$ estaria activant dos cascades de senyalització d'apoptosi que estarien implicades en la mort cel·lular induïda per aquesta droga.

Les diferències de l'efecte crònic *in vitro* amb MDMA i nicotina que trobem en aquests treballs podrien coincidir amb l'evidència que la nicotina és neuroprotectora (Pauly i col., 2004; Mudo i col., 2007). La nicotina pot ser neurotòxica en determinades circumstàncies o fins i tot, pot potenciar la neurotoxicitat induïda per altres substàncies (Messi i col., 1997; Pauly i col., 2004). En el nostre cas, l'MDMA induïx un increment en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} a través del nAChR $\alpha 7$ que no es tampona, el qual estaria implicat en la neurotoxicitat induïda per aquesta droga tal com l'activació de la calpaïna i la caspasa-3 ens demostra. Per altra banda, hem demostrat que l'MDMA inhibeix l'activació del nAChR $\alpha 4\beta 2$, el qual està descrit que està implicat en la dependència a nicotina. Per tant, per una banda, l'MDMA reduiria l'efecte neuroprotector de la nicotina i per l'altra, incrementaria la citotoxicitat a través de l'increment de Ca^{2+} sostingut. Aquests efectes, juntament amb el desplaçament de les monoamines vesiculars i l'oxidació citosòlica, donarien una sèrie d'events importants implicats en la citotoxicitat.

Com ja s'ha dit, l'exposició crònica a nicotina dona lloc a la regulació a l'alça dels nAChR, canvis en l'estequiometria i increment en la funcionalitat del receptor, fenomen anomenat regulació a l'alça funcional (Gaimarri i col., 2007). Per tal de determinar si la regulació a l'alça dels nAChR $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ induïda pels derivats amfetamínics estava relacionada amb un augment en la funcionalitat dels receptors, es van pretractar les cèl·lules PC12 durant 24 hores i es va mesurar la resposta d'agonistes específics sobre l'increment de Ca^{2+} . Les cèl·lules tractades van presentar una resposta incrementada a l'agonista, PNU282987, selectiu dels nAChR $\alpha 7$, i el 5-I-A-85380, selectiu dels nAChR amb la subunitat $\beta 2$, el qual indica que l'MDMA induïx una regulació a l'alça funcional.

Encara que l'MDMA interacciona i induïx una regulació a l'alça dels nAChR que contenen la subunitat $\beta 2$, mitjançant electrofisiologia es va demostrar que es comportava com un antagonista respecte aquests. Els nAChR que contenen la subunitat $\beta 2$ són poc permeables al Ca^{2+} , de manera que els assajos de fluorimetria amb els fluorocrom Fluo-4 no van esdevenir adients per a corroborar la hipòtesi. En canvi, aquests receptors són molt permeables al Na^+ , de tal manera que l'ús d'un fluorocrom sensible al Na^+ s'hi esqueia més. La determinació d'un increment de Na^+ citosòlic esdevé complicada d'observar ja que la diferència entre Na^+ intracel·lular i Na^+ extracel·lular que permeti la correcta viabilitat de la cèl·lula és de l'ordre de 10 vegades, a diferència del Ca^{2+} on la diferència és de l'ordre de 1000 vegades superior. El pretractament amb MDMA va inhibir l'increment de Na^+ citosòlic induït per el 5-I-A-85380, el qual ens indica que el mecanisme d'acció de l'MDMA sobre els nAChR $\alpha 4\beta 2$ és diferent que sobre els $\alpha 7$, mostrant un comportament antagonista com posteriorment es demostrà.

La presentació d'aquestes substàncies per al seu consum és una barreja racèmica dels dos isòmers, tan de l'MDMA com de la METH. Però en treballs recents s'ha observat que els efectes addictius atribuïts a aquestes substàncies són enantioselectius. Acquas i col. (2007) descriu que la potenciació de l'alliberació de dopamina en el nucli accumbens de rata per MDMA i el seu conseqüent efecte estimulador ve donat per l'acció de la S(+)-MDMA. Observen que el tractament *in vivo* amb dosis de 0.61 i 1 mg/Kg de S(+)-MDMA resulta el doble de potent que la barreja racèmica. Nichols i col. (1982) també observen que l'isòmer S(+)-MDMA és més potent

que l'R(-)MDMA però a nivell d'alliberació de serotonina en cervell de rata. En canvi, altres autors (Young i Glennon, 2008) demostren que l'isòmer R(-)MDMA indueix un increment en l'activitat motora vertical (ex: escalada) significatiu en ratolins respecte els animals que són tractats amb la barreja racèmica i demostra que la combinació amb l'isòmer S(+) indueix un antagonisme de l'efecte de l'isòmer R(-), i al revés. Altres autors han demostrat que l'isòmer R(-)MDMA esdevé més potent que l'isòmer S(+)MDMA (Bengel i col., 1998; Fantegrossi i col., 2005). Nash i col. (1994) estudien l'acumulació de monofosfat de inositol induïda per MDMA en cèl·lules que expressen els receptors serotoninèrgics 5-HT_{2A} o 5-HT_{2C}, i observen que l'isòmer R(-)MDMA és més potent que l'S(+). També existeix enantioselectivitat respecte a la farmacocinètica. Pizarro i col (2004) observen diferències a nivell d'inhibició del CYP2D6 i demostren, en un estudi en humans, que després de l'administració del compost, a partir de les primeres 12-24 h, els nivells plasmàtics de l'MDMA són deguts a l'enantiòmer R(-). Així doncs, l'estudi de l'enantioselectivitat esdevé clau en la descripció dels mecanismes estimulants induïts per aquestes substàncies.

Mitjançant assajos d'unió i de fluorimetria amb els enantiòmers R(-) i S(+) de l'MDMA vam observar que l'isòmer R(-) era el que presentava més afinitat pels nAChR $\alpha 4\beta 2$ i coincidia amb la concentració inhibidòria 50 per aquest subtipus de receptor, però en cap dels 2 casos l'MDMA va induir un increment de sodi intracel·lular, per tant, el comportament sobre aquest subtipus de receptor és d'antagonista sent el R(-) més afí i potent que l'S(+). Per altra banda, mitjançant assajos de fluorimetria per a determinar l'entrada de Na⁺, es va observar que la METH, encara que presentava diferències entre enantiòmers a nivell d'afinitat esdevenint la R(-)METH més afí, no presentava diferències funcionals sobre els receptors $\alpha 4\beta 2$, però, a diferència de l'MDMA, la METH es comporta com a agonista parcial dels nAChR $\alpha 4\beta 2$, la qual cosa podria explicar la major dependència que produeix, si es compara amb l'MDMA.

En el cas dels nAChR $\alpha 7$, no es van observar diferències d'afinitat de l'R(-) i l'S(+)MDMA, el qual coincideix amb els assajos funcionals d'entrada de Ca²⁺ ja que, en presència del modulador al·lostèric del receptor nicotínic $\alpha 7$ PNU120596, la resposta induïda per ambdós enantiòmers no era significativament diferent i les CE₅₀ no diferien entre elles. Per tant, en el cas de l'MDMA, l'efecte agonista parcial sobre els nAChR $\alpha 7$ a nivell funcional i d'unió no difereix entre enantiòmers. En el cas dels assaigs d'unió

pels nAChR $\alpha 7$, la S(+)-METH va presentar una afinitat d'ordre micromolar alt. Mitjançant assaigs de fluorimetria de calci, la S(+)-METH va presentar una CE_{50} i una CI_{50} més baixes i significativament diferents a les de la R(-)-METH, el qual indicava que la S(+)-METH és més potent que l'R(-)-METH sobre els nAChR $\alpha 7$.

El mecanisme d'acció de l'MDMA i la METH descrit en aquesta tesi complementa el mecanisme d'acció principal d'aquestes drogues sobre el transportador de dopamina i el VMAT, incrementant el nombre de receptors nicotínics presinàptics i la concentració de calci intracel·lular, el qual activarà la PKC i la nNOS incrementant la oxidació de la dopamina i la concentració de ROS i, per tant, potenciant la degeneració dels terminals dopaminèrgics.

A més, a diferència de la Nicotina que a llarg termini induïx una desensibilització dels receptors nicotínics, l'MDMA induïx una activació continuada dels receptors sense desensibilitzar-los, tal com s'ha demostrat amb els increments dels nivells basals de calci sostinguts al llarg del temps, el qual potenciarà la neurotoxicitat sobre els terminals dopaminèrgics a llarg termini. Així doncs podríem deduir que l'exposició repetida a aquestes substàncies induïria addicionalment una espècie d'excitotoxicitat mediada pels receptors nicotínics $\alpha 7$. L'efecte diferent sobre els receptors heteromèrics per part de la METH (agonista parcial) podria tenir conseqüències pel que respecta al poder addictiu.

L'MDMA induïx l'alliberació de dopamina i serotonina del terminal neuronal ja que reverteix els transportadors DAT i SERT. També s'ha vist que l'MDMA afavoreix l'alliberació d'acetilcolina la qual actuant sobre els nAChR $\alpha 4\beta 2$ contribuiria a l'augment de dopamina en el nucli accumbens, fet que estaria implicat directament en l'efecte psicoestimulant dels derivats amfetamínics. La R(-)-MDMA és més potent que la S(+)-MDMA i inhibeix l'entrada de Na^+ a través dels $\alpha 4\beta 2$. La CI_{50} és de $0.63 \mu M$, concentració que s'assoleix perfectament després de la seva administració a dosis recreatives, així doncs, a l'efecte pròpiament estimulador de l'MDMA se li afegiria el fet que l'isòmer R(-) actuaria com a antagonista $\alpha 4\beta 2$ el qual implicaria la inhibició de l'alliberació de dopamina induïda per acetilcolina. Podríem dir doncs, que probablement l'isòmer R(-) de l'MDMA és menys psicoestimulant i menys addictiu que l'isòmer S(+). La METH, en actuar com agonista parcial dels receptors $\alpha 4\beta 2$ (encara que a dosis més altes) estaria desprovista d'aquest efecte tamponant de l'addicció.

Conclusions

1. L'MDMA i la METH presenten afinitat pels receptors nicotínics $\alpha 7$ i $\alpha 4\beta 2$ d'ordre micromolar. En tots els assajos l'MDMA ha demostrat major afinitat pels diferents subtipus de nAChR. Les K_i obtingudes per ambdues drogues han estat concentracions d'ordre micromolar, les quals poden assolir-se al cervell després de l'administració d'aquestes drogues. És important destacar que els valor de la K_i més baixos són els de la METH i l'MDMA en front els nAChR $\alpha 4\beta 2$, el qual ens indica que aquestes drogues tenen més afinitat pels receptors nicotínics heteromèrics, implicats en els processos d'addicció, els quals són els més abundants en el sistema nerviós central (SNC) i per tant, mediaran part dels seus efectes finals.

2. L'MDMA i la METH provoquen una regulació a l'alça *in vitro* i *in vivo* d'ambdós tipus de nAChR mitjançant mecanismes a nivell postranscripcional.

3. La regulació a l'alça induïda per l' MDMA dona lloc a un augment en la funcionalitat dels receptors nicotínics tan $\alpha 7$ com $\alpha 4\beta 2$ ja que indueix un increment en la resposta als agonistes específics d'ambdós subtipus de receptors, a diferència de la nicotina que indueix la desensibilització dels receptors a llarg termini. Això ens fa pensar en que l'administració d'MDMA pot potenciar l'addicció a la nicotina.

4. L' MDMA i la METH indueixen l'entrada de calci en cèl·lules PC12 que no es tampona com passa amb la nicotina. La principal via d'increment de calci induït per aquests derivats amfetamínics és un agonisme parcial sobre els receptors nicotínics $\alpha 7$.

5. El tractament sostingut amb MDMA indueix un increment en els nivells basals de calci que podrien estar implicats en processos de neurotoxicitat, alhora que indueix una activació de les vies d'apoptosi de la calpaïna i la caspasa-3 en les quals està implicada en l'activació de l'NF κ B, la GSK-3 i la sortida del Citocrom C del mitocondri al citosol.

6. L'MDMA és antagonista dels receptors nicotínics $\alpha 4\beta 2$ i la METH agonista parcial d'aquests receptors, el qual explicaria diferències a nivell de dependència.

7. Sobre el receptor nicotínic $\alpha 4\beta 2$:

-Els enantiòmers de l'MDMA es comporten com antagonistes i presenten diferències d'afinitat i funcionalitat (CI_{50}) sent l'enantiòmer R(-) més afí que l'S(+). Donat que la funció d'aquest és com antagonista, cal deduir que la presència de l'enantiòmer R(-) disminuiria la capacitat adictiva de l'èxtasi.

-Els enantiòmers de la METH es comporten com agonistes parcials i presenten diferències significatives d'afinitat però no a nivell funcional.

8. En quant al receptor nicotínic $\alpha 7$:

-Els enantiòmers de l'MDMA són agonistes parcials i no presenten diferències d'afinitat ni de funcionalitat, ja que indueixen un increment de calci similar, i per tant, no presenten diferències a nivell neurotòxic.

-Els enantiòmers de la METH presenten diferències funcionals a nivell dels receptors nicotínics $\alpha 7$, esdevenint l'S(+)METH un agonista parcial més potent que l'R(-)METH.

9. La deleció del receptor nicotínic $\alpha 7$ no té efectes neuroprotectors sobre la neurotoxicitat dopaminèrgica induïda per l'MDMA en ratolins, però aquest resultat no descarta la implicació d'aquests receptors en la neurotoxicitat per derivats amfetamínics en els animals de soca salvatge.

Annex: Articles

Methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine interact with central nicotinic receptors and induce their up-regulation

Sara Garcia-Ratés, Jordi Camarasa, Elena Escubedo¹, David Pubill^{*,1}

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Nucli Universitari de Pedralbes, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Received 17 February 2007; revised 16 May 2007; accepted 19 May 2007

Available online 26 May 2007

Abstract

Previous work from our group indicated that $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$ nAChR) potentially play a role in methamphetamine (METH) and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity. The aims of the present study were two-fold: (1) to demonstrate the interaction of METH and MDMA with homomeric $\alpha 7$ nAChR ($[^3\text{H}]$ methyllycaconitine binding) and other heteromeric subtypes ($[^3\text{H}]$ epibatidine binding); and (2) to show the effects of amphetamine derivative pretreatment on the density of binding sites. METH and MDMA displaced $[^3\text{H}]$ methyllycaconitine and $[^3\text{H}]$ epibatidine binding in membranes from NGF-differentiated PC 12 cells and mouse brain, with K_i values in the micromolar range, MDMA revealing a greater affinity than METH. In addition, METH and MDMA induced a time- and concentration-dependent increase in $[^3\text{H}]$ methyllycaconitine and $[^3\text{H}]$ epibatidine binding; which had already been apparent after 6 h of pretreatment, and which peaked in differentiated PC 12 cells after 48 h. The highest increases were found in $[^3\text{H}]$ epibatidine binding, with MDMA inducing higher increases than METH. Treatment with METH and MDMA increased B_{max} of high-affinity sites for both radioligands without affecting K_d . The heightened binding was inhibited by pretreatment with cycloheximide, suggesting the participation of newly synthesised proteins while inhibition of protein trafficking to plasma membrane did not block up-regulation. The effects of protein kinase and cyclophilin inhibitors on such up-regulation were explored, revealing a rapid, differential and complex regulation, similar to that described for nicotinic ligands. All of these results demonstrate that METH and MDMA have affinity for, and can interact with, nAChR, inducing their up-regulation, specially when higher doses are used. Such effects may have a role in METH- and MDMA-induced neurotoxicity, cholinergic neurotransmission, and in processes related to addiction and dependence.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Methamphetamine; MDMA; Up-regulation; Nicotinic acetylcholine receptors; PC12 cells; Binding

Introduction

Amphetamine derivatives, such as methamphetamine (METH, speed) and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) are widely abused drugs, mainly by young people in recreational settings. Beside their stimulatory effects,

these drugs have been shown to be neurotoxic in animal models (see reviews by Davidson et al., 2001; Green et al., 2003) in which deleterious effects in dopamine (DA) and serotonin nerve terminals have been reported. In addition, signs derived from neurotoxicity have been described in humans who are heavy users of such drugs (Parrott et al., 2002; Quednow et al., 2006; Reneman et al., 2001; Volkow et al., 2001).

Although oxidative stress has been proposed as a key neurotoxic mechanism induced by these drugs (Cadet et al., 1995; Yamamoto and Zhu, 1998), several aspects surrounding the concrete pathways involved in METH- and MDMA-induced reactive oxygen species (ROS) generation remain unresolved. Our research group has recently reported not only that METH and MDMA induce ROS production inside rat and mouse striatal synaptosomes, but also that endogenous DA is needed for this reaction to occur (Pubill et al., 2005; Escubedo et al., 2005; Chipana et al., 2006). We also determined that methyl-

Abbreviations: BFA, Brefeldin A; CHX, cycloheximide; CsA, cyclosporin A; DA, dopamine; H-89, *N*-[2-((*p*-Bromocinnamyl)amino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide; HEPES, *N*-[2-hydroxyethyl]piperazine-*N'*-[2-ethanesulfonic acid]; MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; METH, methamphetamine; MLA, methyllycaconitine; nAChR, nicotinic acetylcholine receptors; NGF, nerve growth factor; PKA, protein kinase A; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. Fax: +34 934035982.

E-mail address: d.pubill@ub.edu (D. Pubill).

¹ Contributed equally to this work.

lycaconitine, an antagonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors ($\alpha 7$ nAChR), prevented *in vitro* ROS generation and attenuated *in vivo* neurotoxicity, thus implicating $\alpha 7$ nAChR in the toxicity of amphetamine derivatives.

$\alpha 7$ nAChR are homomeric ligand-gated ion channels whose activation induces calcium influx. Calcium entry could favour the activation of Ca^{2+} -dependent enzymes such as protein kinase C and nitric oxide synthase, which have similarly been implicated in the neurotoxicity of amphetamines (Deng and Cadet, 1999; Kramer et al., 1998).

In light of these findings, we believed it necessary to assess whether METH and MDMA have a direct interaction with $\alpha 7$ nAChR. Certain previous reports have suggested that amphetamines interact with different nicotinic receptors. Liu et al. (2003) reported that D-amphetamine acts as an agonist on nicotinic receptors (probably $\alpha 7$) in bovine chromaffin cells, inducing catecholamine release. In addition, Skau and Gerald (1978) had reported that D-amphetamine inhibits α -bungarotoxin binding at the neuromuscular junction in mice, while Klingler et al. (2005) recently identified nAChR as one of the physiological targets of MDMA in the neuromuscular junction. Our previous findings (Pubill et al., 2005; Escubedo et al., 2005; Chipana et al., 2006) relate such an interaction to neurotoxicity. Moreover, as it has been extensively reported that chronic treatment with nicotine and nicotinic ligands induces an up-regulation of nicotinic receptors in CNS (Marks et al., 1983; Flores et al., 1992), the effect of amphetamines on nicotinic receptor populations warrants further study.

The aim of this study was to demonstrate, using radioligand binding assays, the interaction of METH and MDMA with homomeric $\alpha 7$ nAChR and heteromeric subtypes of nicotinic receptors, such as $\alpha 4\beta 2$. In addition, we investigated the effects of pretreatment with METH and MDMA on nAChR densities. We used differentiated PC 12 cells as an experimental model due to the fact other authors have similarly utilised them to evaluate the neurotoxicity of amphetamines (Wei et al., 1997; Imam et al., 2002). Moreover, they not only express nAChR, including the $\alpha 7$ subtype (Henderson et al., 1994; Blumenthal et al., 1997), but also provide an *in vitro* model for the up-regulation of nAChR, which occurs *in vivo* following chronic exposure to nicotine (Madhok et al., 1995; Takahashi et al., 1999; Jonnala and Buccafusco, 2001). Additionally, the affinity of these compounds for nAChR in a mouse brain membrane preparation was assessed.

Methods

PC 12 cell cultures. Wild-type PC 12 cells were generously provided by Dr. J. Serratosa (Dept. of Neurochemistry, Pharmacology and Toxicology, CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain). The culture was routinely plated in 92 mm dishes (Nunc) coated with collagen and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with heat-inactivated 5% fetal bovine serum, 10% horse serum, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 25 UI/ml penicillin and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. Cells were cultured to semi-confluency in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37 °C and medium was changed every 2–3 days. For splitting, cells were dislodged from the dish using a pipette with medium, with a portion of these replated onto new culture dishes. Cells were used between passages 12 and 18.

To ensure their proper differentiation, cells were mechanically dislodged and seeded (200×10^3 cells per well) onto collagen-coated 24-well plates (Nunc) or

92 mm dishes in medium containing 50 ng/ml nerve growth factor (NGF, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), 1% horse serum, 10 mM HEPES and 2% glutamine in DMEM. Under these conditions, the cells developed a neuronal phenotype with neurite outgrowth that was already apparent 24 h after seeding. As the expression of $\alpha 7$ nAChR varies during the differentiation period, we always used the cells at day 4 of differentiation (Takahashi et al., 1999).

Cell membrane preparations. This preparation was used for competition and saturation experiments. PC 12 cells were grown and differentiated on 92 mm dishes. Four dishes were used for each experiment. Cells were mechanically detached, pelleted by centrifugation ($800 \times g$, 4 min, 4 °C), and homogenised in ice-cold 50 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4) containing 4.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ aprotinin and 0.1 mM phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) with a Polytron homogenizer. The homogenate was centrifuged for 20 min at $13,000 \times g$ (4 °C) and the resulting pellet resuspended and re-centrifuged. The final pellet was resuspended in buffer and the protein concentration determined using the BioRad Protein Reagent (Bio-Rad Labs. Inc., Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. The cell membrane preparation was stored at -80 °C until later use in binding experiments.

Whole brain membrane preparations. Adult male Swiss CD-1 mice (Charles River, Barcelona, Spain) weighing 28–32 g were used. Experimental protocols regarding the use of animals in this study were approved by the Animal Ethics Committee of the University of Barcelona under the supervision of the Autonomous Government of Catalonia, and in accordance with guidelines of the European Communities Council (86/609/ECC). Efforts were made to minimize suffering and reduce the number of animals used.

Mice were killed by cervical dislocation. Immediately after being euthanized, they were decapitated and the brains rapidly removed from the skull. The cerebellum was quickly dissected out and discarded and the rest of brain frozen on dry ice and stored at -80 °C until later use.

When required, brains were thawed, pooled and homogenised at 4 °C in 10 volumes of buffer consisting of 5 mM Tris–HCl, 320 mM sucrose and protease inhibitors (aprotinin 4.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.1 mM PMSF and 1 mM sodium orthovanadate), pH 7.4 using a Polytron homogenizer. The homogenates were centrifuged at $15,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The pellets were resuspended in fresh buffer and incubated at 37 °C for 10 min to remove endogenous neurotransmitters. The protein samples were subsequently re-centrifuged and washed two additional times. The final pellets (crude membrane preparations) were resuspended in 50 mM Tris–HCl buffer plus protease inhibitors and stored at -80 °C until later use in radioligand binding experiments. Protein concentration was determined as described above.

[^3H]Methyllycaconitine binding. [^3H]Methyllycaconitine binding was used to quantify homomeric $\alpha 7$ nAChR. For competition and saturation assays, binding of [^3H]MLA to brain and PC 12 cell membranes was measured as described by Davies et al. (1999). 0.25 ml of membranes (containing 500 μg of brain membranes or 50 μg of PC 12 membranes) was incubated in borosilicate glass tubes with 3 nM [^3H]MLA (60 Ci/mmol, American Radiolabeled Chemicals INC., St. Louis, MO), in the absence or presence of increasing concentrations of METH or MDMA, in a final volume of 0.5 ml for 2 h at 4 °C. For saturation experiments a range of nanomolar concentrations of [^3H]MLA was used. Incubation buffer consisted of 50 mM Tris–HCl, 120 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 and 0.1% bovine serum albumin. Non-specific binding was determined from tubes containing 1 μM unlabeled MLA and was subtracted from total binding values. Incubation was completed by rapid filtration under vacuum through Whatman GF/B glass fibre filters (Whatman Intl. Ltd., Maidstone, U.K.) pre-soaked in 0.5% polyethyleneimine. Tubes and filters were washed rapidly 3 times with 4 ml ice-cold 50 mM Tris–HCl.

To study the effects of METH and MDMA pretreatment on $\alpha 7$ nAChR populations, binding of [^3H]MLA was conducted on intact cells to ensure surface binding to functional receptors, since PC 12 cells reportedly contain intracellular non-functional nicotinic receptors (Blumenthal et al., 1997). Cells were pretreated as described for each experiment (see Results). The day of the experiment culture medium was removed and immediately replaced by identical medium containing 3 nM [^3H]MLA. Non-specific binding was determined in wells containing 1 μM unlabeled MLA. The cells were incubated for 1 h at 37 °C. Thereafter, they were harvested and immediately filtered as described above.

Wells and filters were washed 3 times with 2 ml of ice-cold 50 mM Tris–HCl buffer.

[³H]Epibatidine binding. [³H]Epibatidine binding was used to label heteromeric nAChR, which in CNS are mainly $\alpha 4\beta 2$. Competition binding experiments in PC 12 cells and mouse whole brain were carried out using the membrane preparations described above. They were performed in glass tubes containing 1 nM [³H]epibatidine (at this concentration primarily $\alpha 4\beta 2$ receptors are labeled; Avila et al., 2003), the competing drugs (METH and MDMA) at increasing concentrations, and either 50 μ g of PC 12 membranes or 300 μ g of brain membranes. For saturation experiments, a range of [³H]epibatidine concentrations was used. The incubation buffer consisted of 50 mM Tris–HCl plus protease inhibitors and incubation was carried out for 3 h at 25 °C. Non-specific binding was determined in the presence of 300 μ M nicotine. Binding was terminated by filtration and data were treated as explained below.

To measure variations on the surface receptors in PC 12 cells, a protocol similar to that described for [³H]MLA on intact cells was used with the difference that cells were incubated with 2 nM [³H]epibatidine (55.5 Ci/mmol, Perkin Elmer, Boston, MA) for 90 min at 37 °C and non-specific binding was determined in the presence of 300 μ M nicotine.

In all binding experiments, the radioactivity retained on the filters was counted by liquid scintillation spectrometry. Specific binding was defined as the difference between the radioactivity measured in the absence (total binding) and in the presence (non-specific binding) of an excess of unlabeled ligand. Different determinations were performed in duplicates or triplicates for each experiment with every experiment repeated at least three times with similar results.

Drugs and reagents. MDMA was provided by the National Health Laboratory (Barcelona, Spain); DMEM, culture serums and antibiotics were purchased to GIBCO (Invitrogen Corp., Paisley, U.K.); H-89 was from Calbiochem (La Jolla, CA); GF 109203X was from Tocris (Avonmouth, U.K.) and the rest of drugs and reagents, unless otherwise specified, were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Data analysis. Comparisons between single treatment groups and their respective control values were performed using the Student's *t*-test. When multiple treatment groups were compared with the same control, one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with Tukey's post-hoc tests. Statistical significance was taken at a *P* value < 0.05.

Saturation binding analysis was performed using Radlig 6.0 software (G.A. McPherson, Biosoft, Cambridge, U.K.). For [³H]MLA binding, experimental data were best fitted to a one-site model, while [³H]epibatidine binding data were best fitted to a two-site model including a high-affinity site (which was taken to make comparisons between treatments) and a low affinity site.

Competition binding curves were plotted and calculated by nonlinear regression using GraphPAD Prism (GraphPAD software, San Diego, CA). Data were best fitted to a one-site competition model and a value of IC_{50} was obtained. The K_i values (the concentration that occupies 50% of the receptor population) for competing drugs were calculated using the equation by Cheng and Prusoff: $K_i = IC_{50} / (1 + (L/K_d))$, where *L* is the total radioligand concentration and K_d is the dissociation constant of the radioligand. K_d values for [³H]MLA and [³H]epibatidine binding in PC 12 cells were obtained from the saturation experiments carried out in our laboratory (0.5 nM and 0.12 nM, respectively) while the K_d values in mouse brain were obtained from literature that used the same protocols, namely Whiteaker et al. (1999) for [³H]MLA in mouse brain membranes (2.2 nM) and Marks et al. (1998) for [³H]epibatidine in mouse brain membranes (18 pM).

Results

METH and MDMA displace [³H]MLA binding

METH and MDMA displaced [³H]MLA binding in both PC 12 cells and mouse brain (Fig. 1), with K_i values in the micromolar range for both substances and of the same order between each preparation (Table 1). MDMA showed higher affinity (lower K_i) for $\alpha 7$ nAChR than did METH. The Hill

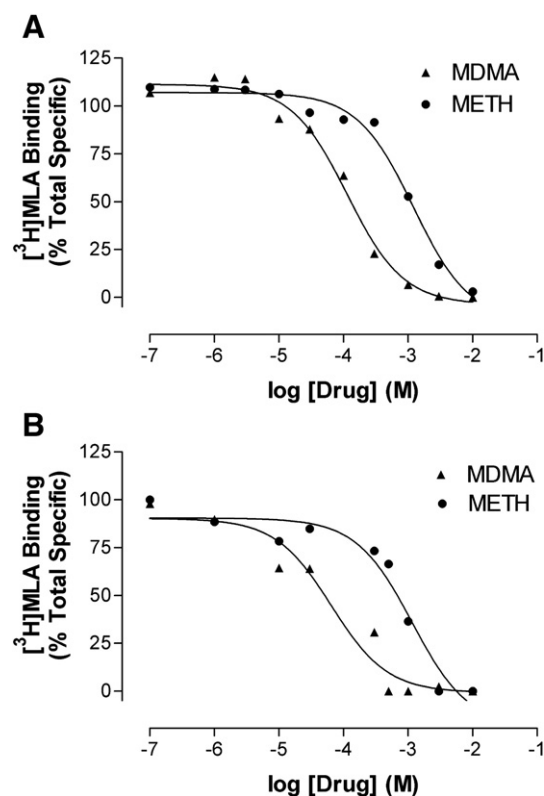


Fig. 1. Representative competition curves showing the inhibition of [³H]MLA binding by METH and MDMA in membranes from PC 12 cells (panel A) and mouse brain (panel B). Membranes were incubated for 2 h at 4 °C with 3 nM [³H]MLA in the absence or presence of increasing concentrations of METH or MDMA. Inhibition curves were calculated using the nonlinear least squares method and adjusted to a one-site model. Data represent the means of duplicates and the experiments were performed three times with similar results.

coefficients in PC 12 cells did not significantly differ from 1, indicating a competitive displacement, while in brain membranes values were significantly less than unity, suggesting a more complex interaction.

METH and MDMA displace [³H]epibatidine binding

When [³H]epibatidine was used as a radioligand to label heteromeric nAChR, a concentration-dependent binding displacement was found also for METH and MDMA (Fig. 2) with K_i values in the micromolar range (Table 2). Similarly, MDMA had higher affinity than METH. However, the affinity of METH for [³H]epibatidine binding sites was higher than that found for [³H]MLA-labeled sites. The highest affinities were found in brain membranes, where both substances displayed K_i values in the low micromolar range. The Hill coefficients resulting from our analysis of competition data were not significantly different from unity, thus indicating a competitive displacement profile.

METH and MDMA increase the density of nicotinic receptors

When PC 12 cells were pretreated with either METH or MDMA for 24 h, at concentrations ranging from 1 to 500 μ M, concentration-dependent increases in [³H]MLA and [³H]

Table 1

K_i values of METH and MDMA against [3 H]MLA binding in PC 12 cells and mouse brain

Drugs	PC 12 cells		Mouse brain	
	K_i (μ M)	n_H	K_i (μ M)	n_H
METH	283 \pm 109	1.20 \pm 0.15	369.77 \pm 95.61	0.29 \pm 0.08**
MDMA	15.35 \pm 1.03	1.35 \pm 0.11	34.21 \pm 6.71	0.40 \pm 0.27*

The K_i values from competition binding curves shown in Fig. 1 were calculated using the Cheng–Prusoff equation. The concentration of [3 H]MLA used in these assays was 3 nM. Competition curves were modeled to one site. Data are presented as the mean \pm S.E.M. from three independent experiments carried out on duplicates. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. 1 (one sample t -test).

epibatidine binding were found (Fig. 3), indicating up-regulation of homomeric $\alpha 7$ and heteromeric nAChR on the cell surface. In general, MDMA induced higher increases than METH and the highest increases were found in [3 H]epibatidine binding. These effects are in agreement with the relative affinities of these drugs for the two types of receptors. A concentration of 300 μ M was chosen for further experiments. Time-course experiments demonstrated that significant increases in [3 H]MLA (Fig. 4A) and [3 H]epibatidine binding (Fig. 4B) were already apparent after 6 h of pretreatment,

Table 2

K_i values of METH and MDMA against [3 H]epibatidine binding in PC 12 cells and mouse brain

Drugs	PC 12 cells		Mouse brain	
	K_i (μ M)	n_H	K_i (μ M)	n_H
METH	155.36 \pm 5.36	0.76 \pm 0.11	23.90 \pm 2.65	1.27 \pm 0.28
MDMA	25.71 \pm 3.13	0.92 \pm 0.04	0.76 \pm 0.11	0.83 \pm 0.12

The K_i values from competition binding curves shown in Fig. 2 were calculated using the Cheng–Prusoff equation. The concentration of [3 H]epibatidine used in these assays was 1 nM. Competition curves were modeled to one site. Data are presented as the mean \pm S.E.M. from three independent experiments carried out on duplicates.

increasing at 24 h and reaching a maximum at 48 h. Longer incubation periods were not tested to avoid any toxic effects from amphetamines at the concentrations used (Fornai et al., 2004). MDMA induced higher receptor increases than did METH when measured after 24 h of treatment, with and the greatest increases found in [3 H]epibatidine binding (Fig. 4).

Saturation experiments

Saturation binding experiments were performed to ascertain whether the treatment with amphetamine derivatives enhanced radioligand binding by increasing the number of receptors (increase in B_{max}) or by increasing their affinity for the ligand (reduction in K_d). The assays were performed on membranes from differentiated PC 12 cells untreated (control) and treated with 100 μ M MDMA or METH for 24 h.

[3 H]MLA saturation experiments revealed the existence of saturable and concentration-dependent specific binding to $\alpha 7$ nAChR. Data were best fitted to a one-site model (Fig. 5A) and, accordingly, the corresponding Scatchard plots were linear (Fig. 5B). Analysis provided that treatment with MDMA increased the density of $\alpha 7$ nAChR (B_{max} values: 532 \pm 43 fmol/mg, control; 690 \pm 16 fmol/mg, METH, $P < 0.05$ vs. control; 787 \pm 62 fmol/mg, MDMA, $P < 0.01$ vs. control) without significantly affecting the affinities (K_d values: 0.43 \pm 0.26 nM, control; 0.65 \pm 0.21 nM, METH; 0.51 \pm 0.16 nM, MDMA; all $P > 0.05$ vs. control). The Hill coefficients were 0.999, indicating the presence of a single or homogeneous population of binding sites in our cell line.

Data from [3 H]epibatidine saturations were best fitted to a two-site model bearing a high affinity and a low-affinity component (Fig. 5C). Accordingly, Scatchard plots were curvilinear (Fig. 5D). Treatment with METH and MDMA increased the density of receptors in high-affinity state (B_{max} values: 57 \pm 9 fmol/mg, control; 96 \pm 10 fmol/mg, METH, $P < 0.05$ vs. control; 129 \pm 15 fmol/mg, MDMA, $P < 0.05$ vs. control) while there were no significant differences in the affinities (K_d values: 109 \pm 20 pM, control; 105 \pm 15 pM, METH and 122 \pm 9 pM, MDMA, all $P > 0.05$ vs. control).

Role of protein synthesis, cyclophilin A and receptor trafficking

Cycloheximide (CHX, 1 μ g/ml, an inhibitor of protein synthesis) was tested against METH and MDMA (both at 300 μ M)

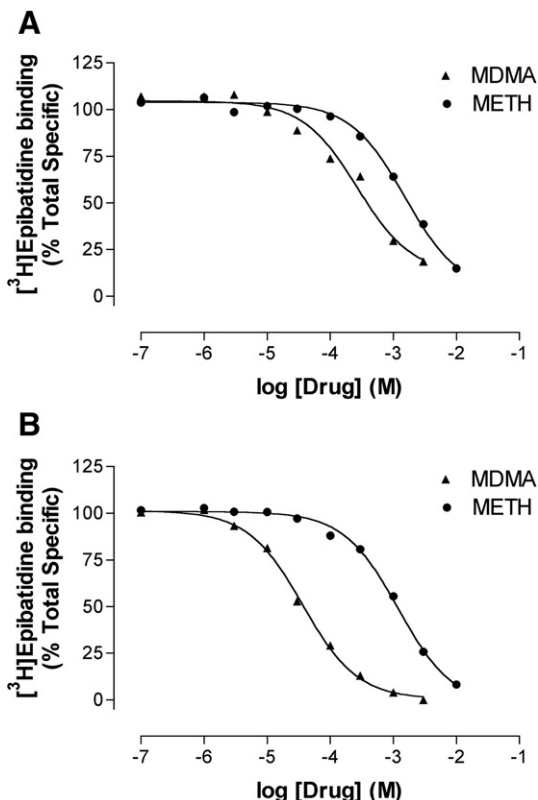


Fig. 2. Representative competition curves showing the inhibition of [3 H]epibatidine binding by METH and MDMA in membranes from PC 12 cells (panel A) and mouse brain (panel B). Membranes were incubated for 2 h at 4 $^{\circ}$ C with 2 nM [3 H]epibatidine in the absence or the presence of increasing concentrations of METH or MDMA. Inhibition curves were calculated using the nonlinear least squares method and adjusted to a one-site model. Data represent means of duplicates and the experiments were performed three times with similar results.

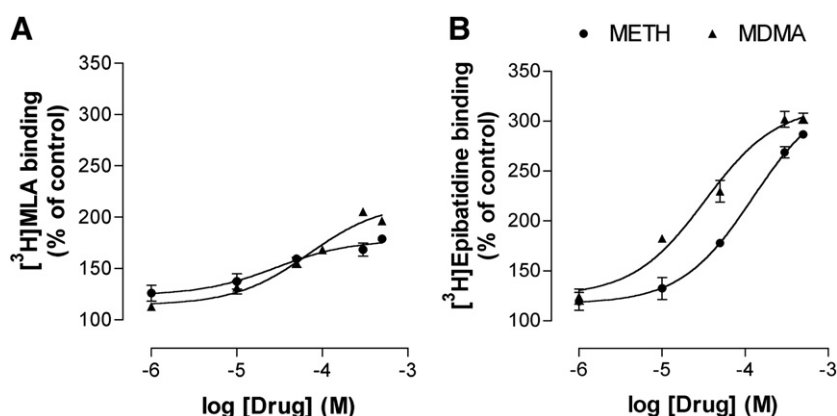


Fig. 3. Concentration–effect curves showing the effects of METH and MDMA on [3 H]MLA (panel A) and [3 H]epibatidine (panel B) binding in NGF-differentiated PC 12 cells. Cells were pretreated with different concentrations of METH or MDMA for 24 h and thereafter radioligand binding to cell surface receptors was carried out. Data are expressed as the percentage of increase with respect to control cells and represent the means \pm S.E.M. of three separate experiments carried out in triplicates. All the increases are statistically significant vs. untreated cells.

treatment (6 h). Longer incubation periods with CHX were not tested because we detected both a loss in cell viability and detachment from the culture plates. CHX inhibited the increase in both [3 H]MLA and [3 H]epibatidine binding sites, suggesting that such up-regulations require protein synthesis (Figs. 6A, B).

Cyclosporin A (CsA, 1 μ M, a cyclophilin A inhibitor) alone did not affect [3 H]MLA binding but significantly inhibited

METH- and MDMA-induced α 7-nAChR up-regulation after a 24 h treatment ($76 \pm 2\%$ increase METH vs. $46 \pm 6\%$ increase CsA + METH, $P < 0.01$; $135 \pm 3.8\%$ increase MDMA vs. $106 \pm 1.3\%$ CsA + MDMA, $P < 0.01$). By contrast, CsA induced up-regulation in [3 H]epibatidine binding (about 50% increase, data not shown), making it difficult to assess a neat effect on METH- and MDMA-induced up-regulation. The concentration of CsA used has been reported to be non-toxic for the cells (Schroeder et al., 2003).

To assess whether receptor trafficking to plasma membrane plays a role in METH/MDMA-induced up-regulation, cells were pretreated with brefeldin A (BFA, 3 μ M), a fungal metabolite that disrupts the Golgi apparatus, thereby inhibiting intracellular trafficking of proteins to the cell surface and interfering late steps of maturation (Klausner et al., 1992). Cells exposed to BFA alone for 18 h showed a marked decrease in receptor binding, which is indicative of the effectiveness of treatment with BFA. However, when cells were treated with METH or MDMA in the presence of BFA, the binding sites were still up-regulated in a similar percentage (about two-fold increase) over its respective control (BFA alone) than in cells not pretreated with BFA (Fig. 6C). This indicates that receptor trafficking is not crucial for nAChR up-regulation.

Role of protein kinases

To determine other possible pathways implicated in such up-regulation, the participation of several protein kinases was investigated.

H-89 (100 nM, a protein kinase A (PKA) inhibitor) was tested against METH and MDMA (both at 300 μ M) treatment (6 h). H-89 alone significantly increased the number of [3 H]epibatidine binding sites (Fig. 6B) (about a 70–80% increase after 6 h of treatment), making it difficult to assess the effects of PKA inhibition on the receptor increases induced by METH and MDMA. Although the highest values in [3 H]epibatidine binding were obtained from cells treated with H-89 plus METH or MDMA, such increases – when compared to their respective control (treated with H-89 alone) – were not

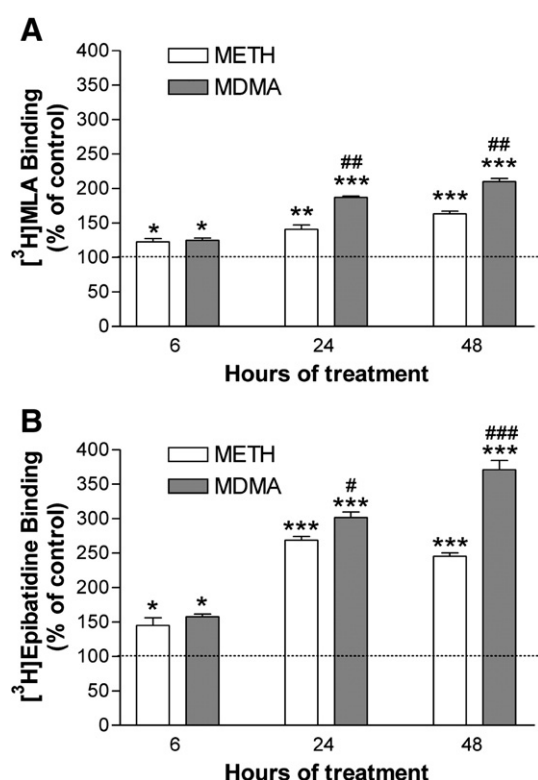


Fig. 4. Time-course study of the increases in [3 H]MLA (panel A) and [3 H]epibatidine (panel B) binding sites induced by METH and MDMA (300 μ M). PC 12 cells were incubated with amphetamine derivatives over 6, 24 and 48 h. Thereafter radioligand binding was performed on intact cells in culture. Data represent the means \pm S.E.M. of three separate experiments carried out in triplicates (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. untreated cells; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. METH at the same incubation time).

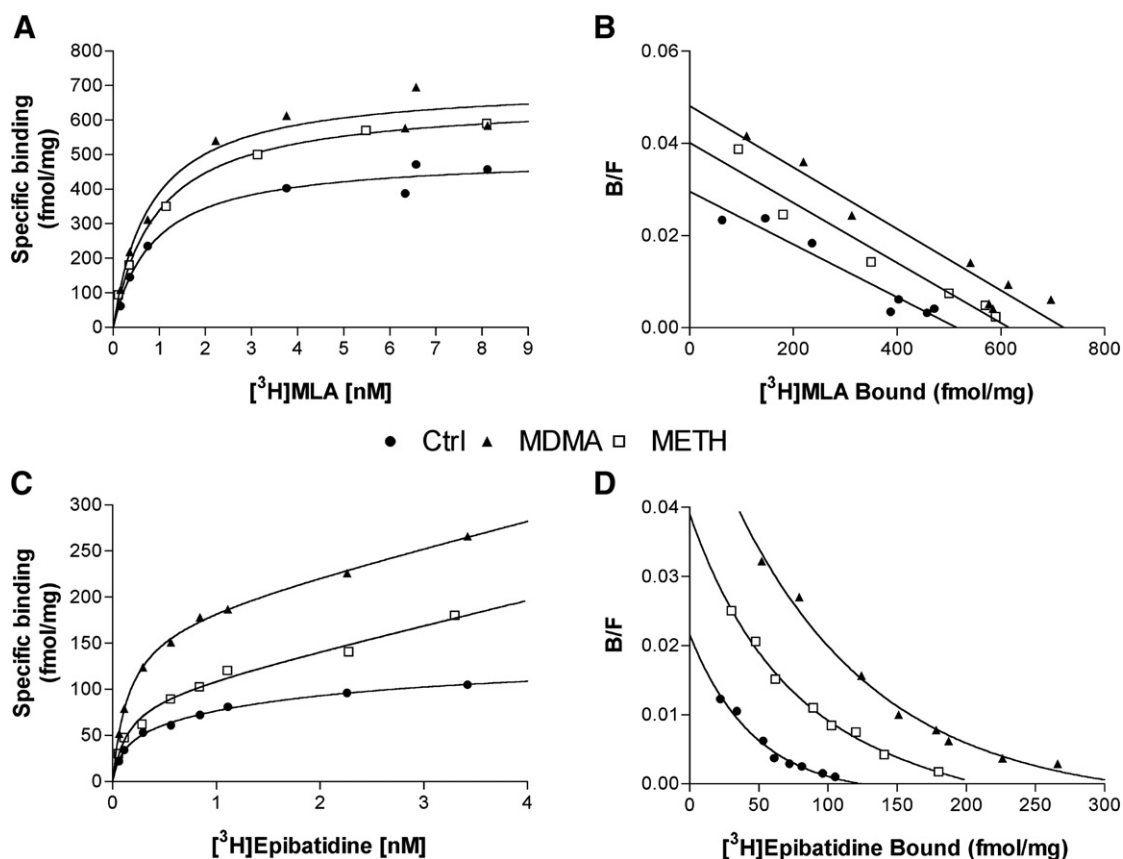


Fig. 5. Representative plots from saturation binding experiments using $[^3\text{H}]$ MLA (panels A and B) and $[^3\text{H}]$ epibatidine (panels C and D) as radioligands. The experiments were carried out on membranes from NGF-differentiated PC 12 cells untreated (Ctrl) or treated with 100 μM MDMA or METH for 24 h. $[^3\text{H}]$ MLA binding data were fitted to a one-site model yielding straight Scatchard plots (panel B), while $[^3\text{H}]$ epibatidine data were best fitted to a two-site model and gave curvilinear Scatchard plots.

significant. Interestingly, treatment with H-89 had no significant effect on $[^3\text{H}]$ MLA binding sites; in this case, the increase induced by METH or MDMA was not modified. H-89 alone also induced nAChR up-regulation when incubated for 24 h and its effects on METH and MDMA effects were similar to those obtained after a 6-h treatment (data not shown).

The PKC inhibitor GF-109203X (GF, 0.3 μM), tested in a 24 h treatment, did not affect either basal levels of $[^3\text{H}]$ epibatidine or $[^3\text{H}]$ MLA binding nor the increase in $[^3\text{H}]$ MLA binding induced by both amphetamine derivatives, but potentiated the increase in $[^3\text{H}]$ epibatidine binding induced by METH and MDMA ($161 \pm 1.6\%$ METH vs. $191.1 \pm 5.5\%$ GF+METH, $P < 0.01$; $124 \pm 10.3\%$ MDMA vs. $181 \pm 6\%$ GF+MDMA, $P < 0.05$).

The protein tyrosine-kinase inhibitor genistein (20 μM) was also tested against 300 μM METH- and MDMA-induced nAChR up-regulation. Genistein alone, when incubated with cells for 6 h, induced significant increases in both $[^3\text{H}]$ epibatidine and $[^3\text{H}]$ MLA binding that were not modified by METH or MDMA (data not shown). However, when incubation was carried out for 24 h, genistein induced significant decreases in binding levels ($[^3\text{H}]$ epibatidine: $36.18 \pm 2.9\%$ genistein vs. $100 \pm 6.7\%$ Ctrl, $P < 0.001$; $[^3\text{H}]$ MLA: $64 \pm 2.4\%$ genistein vs. $100 \pm 2.6\%$ Ctrl, $P < 0.001$). At this incubation time, when METH or MDMA were added in the presence of genistein, the nAChR up-regulation was significantly

reduced. The increases in binding with respect to its corresponding control (vehicle or genistein alone) were for $[^3\text{H}]$ epibatidine: $109.2 \pm 6.8\%$ MDMA vs. $42.9 \pm 4.2\%$ genistein+MDMA $P < 0.01$, $161 \pm 1.6\%$ METH vs. $91 \pm 5.3\%$ genistein+METH $P < 0.001$; and for $[^3\text{H}]$ MLA: $135 \pm 3.8\%$ MDMA vs. $88 \pm 5\%$ genistein+MDMA $P < 0.01$, $76 \pm 2\%$ METH vs. $35 \pm 2.6\%$ genistein+METH $P < 0.001$).

Discussion

Previous work from our group pointed to a role of $\alpha 7$ nAChR in METH and MDMA-induced neurotoxicity both *in vivo* and *in vitro* (Pubill et al., 2005; Escubedo et al., 2005; Chipana et al., 2006) because MLA, an $\alpha 7$ nAChR antagonist, attenuated such neurotoxic effects. From these results we found necessary to assess a possible interaction of these amphetamine derivatives with nAChR.

METH and MDMA displaced both $[^3\text{H}]$ MLA and $[^3\text{H}]$ epibatidine binding in PC 12 cells and in mouse brain, indicating that they can directly interact with nAChR. MDMA displayed higher affinity than METH for both subtypes of nAChR. The resulting K_i values fell in the micromolar range, although some of them are in the low micromolar range (i.e. effects of MDMA on both subtypes of nAChR) and others in the high micromolar range (i.e. METH effects on $[^3\text{H}]$ MLA binding). Such dif-

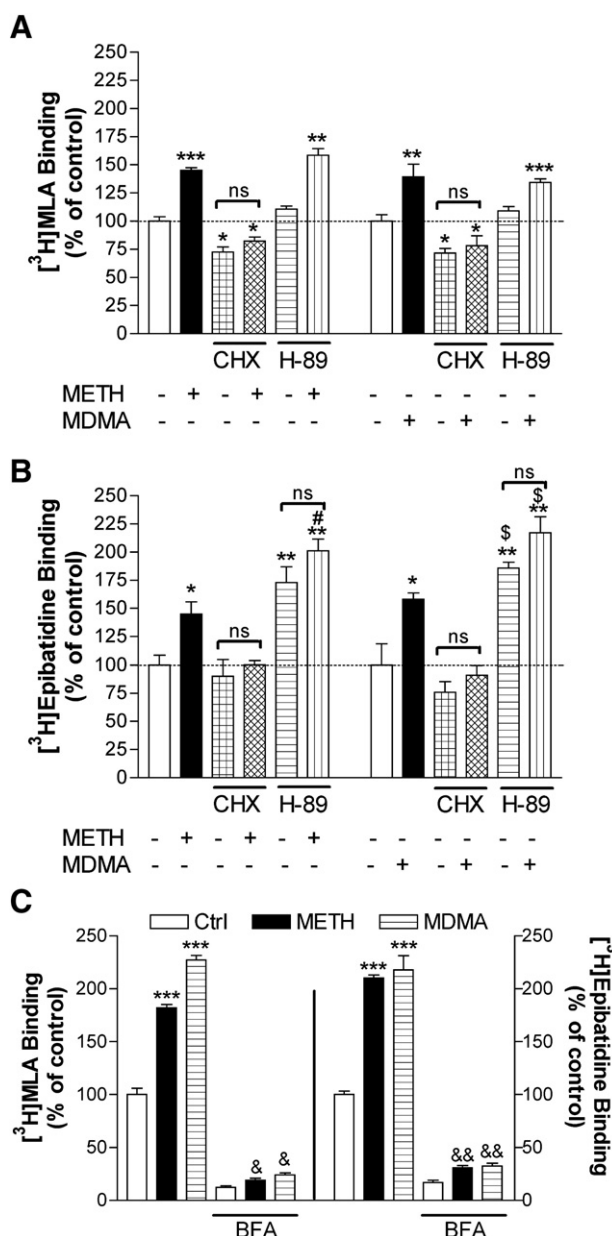


Fig. 6. Effects of cycloheximide (CHX, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and H-89 (100 nM) on the increase in [^3H]MMLA (panel A) and [^3H]epibatidine (panel B) binding sites induced by METH and MDMA in NGF-differentiated PC 12 cells. CHX and H-89 were added to the culture medium 30 min before METH or MDMA. Incubation with amphetamine derivatives was carried out for 6 h. Data represent the means \pm S.E.M. of three separate experiments carried out in triplicates (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 vs. untreated cells; # P < 0.05 vs. METH, $^{\$}$ P < 0.05 vs. MDMA). Panel C shows the effects of inhibition of protein trafficking to plasma membrane on METH/MDMA-induced nAChR up-regulation. Cells were treated with METH or MDMA (300 μM) for 18 h in the absence or presence of brefeldin A (BFA), which was added 15 min. before amphetamine derivatives. Data are the means \pm S.E.M. of three separate experiments carried out in triplicates (*** P < 0.001 vs. Ctrl; & P < 0.05, && P < 0.01 vs. BFA alone).

ferences suggest also a different physiological relevance among the effects of METH and MDMA on both subtypes of nAChR that would highly depend on the doses administered. Low micromolar concentrations are achievable in the brain after administration of these drugs (Chu et al., 1996, Kitaichi et al.,

2003; Johnson et al., 2004). Special attention must be paid in the affinity of MDMA for heteromeric receptors (K_i about 0.7 μM) which is practically the same that the K_i displayed by MDMA for the serotonin transporter, its main physiological target (0.61 μM , Battaglia et al., 1988). Therefore an interaction of MDMA on heteromeric nAChR at recreational doses is certainly possible. On the other hand, the effects derived from the interaction of METH with $\alpha 7$ nAChR would take place at high neurotoxic doses. However, the number of published kinetic studies in humans is limited and there are several factors that could increase the concentration of amphetamine derivatives in brain after a non-controlled consumption (i.e. smoked, intranasal or intravenous methamphetamine, association with other drugs, changes in blood–brain barrier permeability, etc.). Therefore, the interaction of METH and MDMA with nAChR *in vivo* could feasibly occur after drug intake. The fact that the lowest K_i values were found against [^3H]epibatidine binding indicates that METH and MDMA display higher affinity for heteromeric nAChR (which are the most abundant in CNS) than for the homomeric $\alpha 7$ subtype. The pharmacodynamic consequences of the interaction of METH and MDMA with nAChR remain to be determined but, according to our previous work it could be expected an agonistic or a positive allosteric effect that would enhance nicotinic neurotransmission.

Nicotinic receptors play a key role in neurotransmission and nicotine addiction. Tobacco is one of the most widely consumed drugs and very often people that consume METH and MDMA also smoke concomitantly. In these cases and according to our results, a pharmacodynamic interaction between nicotine and amphetamine derivatives can be expected and could have several consequences that will be suggested below.

A particular feature of nAChR is that chronic exposure to nicotine induces a higher level of either nicotine or epibatidine binding, termed as functional up-regulation (Buisson and Bertrand, 2002; Marks et al., 1983; Flores et al., 1992). Such up-regulation was thought to be initiated as a homeostatic response to the rapid receptor desensitisation that takes place after sustained stimulation (Fenster et al., 1999). Furthermore, self-administration of nicotine is reduced in $\beta 2$ -subunit knock-out mice (Picciotto et al., 1998). Therefore, the up-regulation of heteromeric nAChR could, via dopamine release, explain the reinforcing effect of nicotine on the mesolimbic system mediating nicotine addiction (Balfour et al., 2000). Accordingly, we tested whether METH and MDMA had any effect on $\alpha 7$ and heteromeric nAChR binding densities and found that both were increased in a time- and concentration-dependent manner. These results expand the nicotinic profile of METH and MDMA and support the direct interaction with nAChR reported above. Although for pharmacological modulation we performed up-regulation experiments at a concentration of 300 μM , we have to notice that significant up-regulation took place at a concentration as low as 1 μM . Higher concentrations *in vitro* allowed us a better appreciation of inhibitory effects.

The mechanism through which nicotine induces nAChR up-regulation is complex and not fully clarified to date. There are reports indicating that nicotine-induced increases in nAChR are not accompanied by changes in mRNA encoding for the

different subunits (Marks et al., 1992; Madhok et al., 1995; Pauly et al., 1996; Peng et al., 1997). This led to other hypotheses, such as reduced receptor turnover, promotion of the assembly and migration to the plasma membrane of pre-existing intracellular subunits (Blumenthal et al., 1997) or decrease in the rate of receptor turnover (Peng et al., 1994). More recently, Sallette et al. (2005) demonstrated that nicotine acts as a maturation enhancer of those intracellular nAChR precursors that would otherwise be degraded. However, different authors show controversial results which could be attributable to differences in the experimental models or the techniques used. For example, Vallejo et al. (2005), reported that $\alpha 4\beta 2$ nAChR up-regulation by nicotine is due to an increase/stabilisation of the proportion of receptors in a high affinity state and not to an enhancement in receptor maturation. Moreover, not only nicotinic agonists induce nAChR up-regulation, but also antagonists have been reported to cause such an effect (Peng et al., 1994; Gopalakrishnan et al., 1997). This means that this phenomenon is not related to the efficacy of the ligand to activate the receptor but that is only binding to either mature or immature forms which stabilises a high affinity state, promotes receptor maturation or prevents degradation. Regardless the mechanism behind and, according to our competition experiments demonstrating the affinity of METH and MDMA for nAChR, it could be hypothesised that the up-regulation of nAChR induced by these drugs would follow a similar mechanism. Nicotine has been proved to cross plasma membrane to interact with intracellular forms of nAChR and METH and MDMA can access inside the cell through the monoamine transporters localised in the plasma membrane.

An increase in radioligand binding after a drug treatment can be produced either by an increase in the total number of receptors or by an increase in the proportion of receptors in a high-affinity state. A classical experimental approach to ascertain which of these mechanisms is taking place is to perform saturation binding assays to find out whether B_{\max} (density of receptors) or K_d (affinity) is changing. When we performed these experiments we found an interesting difference between heteromeric and $\alpha 7$ nAChR up-regulation induced by MDMA and METH: $\alpha 7$ nAChR increased in number without changes in affinity while heteromeric nAChR increased the B_{\max} of the high-affinity component. It must be taken into account that epibatidine is an agonist that, at the low concentrations that we used, labels only receptors in high-affinity state while MLA is an antagonist which labels the whole population of $\alpha 7$ nAChR. These findings support that amphetamines would interact similarly than nicotine to regulate nAChR because they are in agreement with recent works that demonstrate that nicotine increases/stabilizes the proportion of $\alpha 4\beta 2$ in a high affinity state (Vallejo et al., 2005). As for $\alpha 7$ nAChR is concerned, the number of published works studying the concrete nature of nicotine-induced up-regulation is more limited but, according to our results, METH and MDMA, by binding to precursor or immature forms of these receptors, would enhance or induce the formation of receptors capable of binding [3 H]MLA.

Additionally, we explored the participation of protein synthesis in METH/MDMA-induced nAChR up-regulation.

The protein synthesis inhibitor cycloheximide inhibited the increase in both [3 H]MLA and [3 H]epibatidine binding sites, suggesting that such up-regulations require, at least in part, rapid protein synthesis. Similar results were obtained with another protein synthesis inhibitor, puromycin (data not shown). Moreover, the changes in nAChR expression induced by these inhibitors alone, after a 6-h incubation, support the rapid receptor turnover described by other authors (Cho et al., 2005; Charpantier et al., 2005). Accordingly, Gopalakrishnan et al. (1997) reported inhibition by cycloheximide of nicotine-induced $\alpha 4\beta 2$ nAChR up-regulation. As previous reports demonstrate the lack of modification of transcriptional activity of receptor subunits after treatment with nicotine (Marks et al., 1992; Madhok et al., 1995; Pauly et al., 1996; Peng et al., 1997) it can be deduced that post-transcriptional mechanisms are involved in nAChR up-regulation, as described above. As for $\alpha 7$ nAChR is concerned, Kawai and Berg (2001) also reported that protein synthesis inhibition abolishes nicotine-induced up-regulation. In this case they suggested that receptors must be synthesised *de novo* and cannot be recruited from a pre-existing intracellular pool of receptors because, conversely to $\alpha 4\beta 2$ receptors, this pool is too small to account for the up-regulation. This is in agreement with our results, in which cycloheximide alone for 6 h significantly reduced [3 H]MLA binding and inhibited METH- and MDMA-induced up-regulation, and by the fact that the percentage of increase in $\alpha 7$ nAChR is lower than in heteromeric receptors. Similarly to $\alpha 4\beta 2$ receptors, no changes in mRNA encoding $\alpha 7$ nAChR have been found after treatment with nicotine (Peng et al., 1997) corroborating that this drug (and by extension METH and MDMA) up-regulate these receptors via post-transcriptional mechanisms.

The chaperone cyclophilin A participates in $\alpha 7$ -nAChR maturation (Blumenthal et al., 1997; Schroeder et al., 2003). Therefore we tested the cyclophilin A inhibitor cyclosporin A (CsA) on METH/MDMA-induced nAChR up-regulation. CsA alone had no effect on basal $\alpha 7$ nAChR levels, but inhibited METH/MDMA-induced up-regulation. This result demonstrates that cyclophilin A participates in $\alpha 7$ receptor up-regulation in our cell line. The up-regulation of heteromeric receptors by CsA alone could be explained by the fact that CsA is also a phosphatase 2B inhibitor that has been reported to reduce heteromeric nAChR desensitisation (Marszalec et al., 2005), which would produce an increase in [3 H]epibatidine binding.

To assess whether receptor trafficking to the plasma membrane could be contributing to METH/MDMA-induced nAChR up-regulation we exposed the cells to BFA to inhibit such transport and late steps of maturation. Although BFA induced dramatic decreases in basal binding sites owing to its main mode of action, there was still up-regulation after treatment with METH/MDMA. This indicates that trafficking is not crucial for METH/MDMA-induced nAChR up-regulation and that this takes place previously to surface expression. This result is in agreement with those reported by Vallejo et al. (2005) and Darsow et al. (2005) studying the mechanisms involved in nicotine-induced up-regulation of heteromeric receptors. Moreover, the fact that BFA alone induced more pronounced decreases in radioligand binding than CHX indicates that, in

differentiated PC 12 cells, there is an important intracellular pool of receptors/precursors ready to undergo the up-regulation process regardless of *de novo* synthesis. In fact, although we performed these experiments on intact cells, internalisation of radioligands and binding to intracellular forms may occur (Davies et al., 1999). Overall, the lower increases found in $\alpha 7$ receptors, being the affinity of amphetamines similar to that for heteromeric receptors, indicate that $\alpha 7$ receptors need more processing than heteromeric to be up-regulated.

PKA- and PKC-dependent pathways have been found to play a role in the up-regulation of $\alpha 4\beta 2$ receptors induced by cholinergic ligands in several cell lines (Gopalakrishnan et al., 1997; Nuutinen et al., 2006). PKA is a cAMP-dependent protein kinase implicated in the desensitisation of nAChR (Nishizaki and Sumikawa, 1998) and in their up-regulation (Madhok et al., 1995), because PKA-devoid PC 12 cells do not express the increase in [3 H]nicotine binding that is induced by pretreatment with nicotine. For this reason we tested the PKA inhibitor H-89 on METH/MDMA-induced up-regulation. Surprisingly, H-89 alone significantly increased the number of [3 H]epibatidine binding sites, making it difficult to interpret its effects on METH/MDMA-induced up-regulation (see Results). However, the fact that no significant difference was found between cells treated with H-89 and H-89+METH/MDMA and that METH and MDMA alone can induce much higher increases in [3 H]epibatidine binding (Fig. 4B) leads us to deduce that there is an inhibition by H-89 because otherwise a significant increase over that induced by H-89 would have been induced in cells treated with H-89+MDMA/METH. Our results are in agreement with those of Gopalakrishnan et al. (1997) who reported that activation of adenyl cyclase with forskolin potentiated the nicotine-induced up-regulation of heteromeric nAChR in HEK 293 cells. As cAMP activates PKA, inhibition of this enzyme would have the opposite effect.

Pretreatment with H-89 did not affect basal binding of [3 H]MLA or METH/MDMA-induced up-regulation, corroborating that PKA plays a role in heteromeric nAChR regulation, but not in that of $\alpha 7$ nAChR (Nuutinen et al., 2006). In fact, in the study by Madhok et al. (1995), primarily heteromeric nAChRs were labelled at [3 H]nicotine concentration used by the authors (50 nM). The mechanism underlying the up-regulation induced by H-89 alone is difficult to explain assuming an increase in the number of receptors but, if we take into account that epibatidine, at the concentration that we used, labels only the receptors in high affinity state, it can be deduced that H-89, by reducing the natural rate of desensitisation (Nishizaki and Sumikawa, 1998) would increase the proportion of high affinity receptors, increasing [3 H]epibatidine binding. An alternative explanation could originate from the fact that nAChR are also regulated by phosphatases (Cho et al., 2005) and other kinases such as PKC and tyrosine kinase, and there are evidences of a crosstalk between the different kinases and an inhibition of PKA and PKC by desensitised nAChR (Sun et al., 2004). It might be that the pharmacological inhibition of PKA would induce the activation of other pathways that would promote the up-regulation process.

The role of PKC in nAChR up-regulation by nicotine is complex and seems to be the result of a complex interplay of

various signalling molecules (Nuutinen et al., 2006). The PKC inhibitor GF-109203X had no effect on basal levels of [3 H]epibatidine binding but potentiated the up-regulation in heteromeric receptors induced by METH and MDMA. Phosphorylation of heteromeric nAChR by PKC has also been reported to increase the rate of desensitisation of these receptors (Nishizaki and Sumikawa, 1998) and therefore inhibition of PKC would favour the increase in the proportion of receptors in high-affinity state induced by amphetamines. Accordingly, Gopalakrishnan et al. (1997) reported that chronic treatment with the PKC activator phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) leads to potentiation of nicotine-induced heteromeric nAChR up-regulation. Chronic treatment with PMA is supposed to down-regulate PKC and be equivalent to PKC inhibition. Although these authors ruled out this possibility after having no effect with several kinase inhibitors (staurosporine, sphingosine and chelerythrine) it must be pointed out that these inhibitors are not PKC-selective at the concentrations used (i.e. staurosporine also inhibits PKA and tyrosine kinases, sphingosine may activate PKC under certain conditions and chelerythrine activates MAPK pathways) while GF-109203X is. These other effects could interfere with a neat PKC inhibition effect on nAChR regulation. Other factors which could account for this discrepancy could be the different cell line used by us, which expresses more than one subtype of nAChR, whose regulation could have differences with those used by others.

By contrast, the PKC inhibitor did not affect $\alpha 7$ nAChR in our experiments with amphetamine derivatives. This result is in agreement with those reported by Nuutinen et al. (2006) who found no effect of this compound, at nanomolar concentration, on nicotine-induced $\alpha 7$ nAChR up-regulation. However, a role of PKC in $\alpha 7$ nAChR regulation can not be completely ruled out as these authors reported that its overexpression enhances nicotine-induced up-regulation without affecting basal receptor levels.

Protein tyrosine kinases have been reported to play a role in $\alpha 7$ nAChR regulation and their short-term inhibition induces receptor up-regulation and potentiation of receptor-mediated responses (Cho et al., 2005; Charpentier et al., 2005). Accordingly, when we tested the broad-spectrum protein tyrosine kinase inhibitor, genistein, in a 6-h treatment, we found an up-regulation of both $\alpha 7$ and heteromeric nAChR that masked any METH/MDMA-induced effect. However, when genistein was assayed for 24 h, it reduced METH/MDMA effects on nAChR densities, indicating that the role of tyrosine kinases depends on time and conditions and that they participate in the up-regulation induced by METH and MDMA.

All these results confirm that regulation of nAChR is a very complex process, with differences between receptor subtypes, host cell type and variations along time, that has not been fully elucidated to date and escapes from the purposes of the present work. However, the present results support that METH and MDMA up-regulate nAChR in a similar manner than nicotine.

To summarize, in this study we demonstrate that METH and MDMA can directly interact with nAChRs and induce their up-regulation as nicotinic ligands do. These effects are more likely

to occur *in vivo* when high doses of drug are taken, as plasma concentrations would be closer to the K_i values. Such an interaction might account for some of the effects of these drugs; i.e. desensitisation or stabilisation of receptors or increased neurotoxicity. The direct interaction of METH/MDMA with nAChR corroborates the hypothesis suggested in previous works (Pubill et al., 2005; Escubedo et al., 2005; Chipana et al., 2006) by which binding of amphetamines to nicotinic receptors would enhance their activation and this would in turn activate or potentiate calcium-dependent pathways involved in their neurotoxicity. For this reason, blockade of $\alpha 7$ nAChR results neuroprotective. Moreover, the nicotine-like effects of these drugs (i.e. inducing increases in nAChR densities) could potentiate processes of addiction and dependence to nicotine. Also, taking into account that $\alpha 7$ nAChR are related with cognitive function (Young et al., 2007) and, in addition to $\alpha 4\beta 2$, are implicated in psychiatric pathologies such as schizophrenia (Ripoll et al., 2004), the interaction of METH and MDMA with these receptors could explain the psychiatric disorders that appear after chronic consumption of these drugs.

Further investigation addressing the *in vivo* consequences of such interactions is warranted.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. J. Serratos (Dept. of Neurochemistry, Pharmacology and Toxicology, CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain) for generously providing PC 12 cells. We also thank Dr. F.X. Sureda for helpful technical advice concerning cell cultures, Cristina Mañé for technical support and the Linguistic Advice Service of the University of Barcelona for revising the language of the manuscript. We acknowledge Drs. M. Amat, J. Bosch and N. Llor from the Organic Chemistry Unit for the spectral analysis of MDMA demonstrating its chemical purity. This work was supported by grants of Generalitat de Catalunya (2005SGR00793), Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-0573; SAF2006-01456). C. Chipana is recipient of a grant from the University of Barcelona.

References

- Avila, A.M., Davila-Garcia, M.I., Ascarrunz, V.S., Xiao, Y., Kellar, K.J., 2003. Differential regulation of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells by nicotine and nerve growth factor. *Mol. Pharmacol.* 64, 974–986.
- Balfour, D.J.K., Wright, A.E., Benwell, M.E.M., Birrell, C.E., 2000. The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence. *Behav. Brain Res.* 113, 73–83.
- Battaglia, G., Brooks, B.P., Kulsakdinun, C., De Souza, E.B., 1988. Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur. J. Pharmacol.* 149, 159–163.
- Blumenthal, E.M., Conroy, W.G., Romano, S.J., Kassner, P.D., Berg, D.K., 1997. Detection of functional nicotinic receptors blocked by alpha-bungarotoxin on PC12 cells and dependence of their expression on post-translational events. *J. Neurosci.* 17, 6094–6104.
- Buisson, B., Bertrand, D., 2002. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 130–136.
- Cadet, J.L., Ali, S.F., Rothman, R.B., Epstein, C.J., 1995. Neurotoxicity, drugs and abuse, and the CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Mol. Neurobiol.* 11, 155–163.
- Charpentier, E., Wiesner, A., Huh, K.H., Ogier, R., Hoda, J.C., Allaman, G., Ragenbass, M., Feuerbach, D., Bertrand, D., Fuhrer, C., 2005. Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J. Neurosci.* 25, 9836–9849.
- Chipana, C., Camarasa, J., Pubill, D., Escubedo, E., 2006. Protection against MDMA-induced neurotoxicity in mice by methyllycaconitine: involvement of nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 51, 885–895.
- Cho, C.H., Song, W., Leitzell, K., Teo, E., Meleth, A.D., Quick, M.W., Lester, R.A., 2005. Rapid upregulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine dephosphorylation. *J. Neurosci.* 25, 3712–3723.
- Chu, T., Kumagai, Y., DiStefano, E.W., Cho, A.K., 1996. Disposition of methylenedioxymethamphetamine and three metabolites in the brains of different rat strains and their possible roles in acute serotonin depletion. *Biochem. Pharmacol.* 51, 789–796.
- Darsow, T., Booker, T.K., Pina-Crespo, J.C., Heinemann, S.F., 2005. Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 18311–18320.
- Davidson, C., Gow, A.J., Lee, T.H., Ellinwood, E.H., 2001. Methamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res. Rev.* 36, 1–22.
- Davies, A.R., Hardick, D.J., Blagbrough, I.S., Potter, B.V., Wolstenholme, A.J., Wonnacott, S., 1999. Characterisation of the binding of [3H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 38, 679–690.
- Deng, X., Cadet, J.L., 1999. Methamphetamine administration causes over-expression of nNOS in the mouse striatum. *Brain Res.* 851, 254–257.
- Escubedo, E., Chipana, C., Perez-Sanchez, M., Camarasa, J., Pubill, D., 2005. Methyllycaconitine prevents methamphetamine-induced effects in mouse striatum: Involvement of {alpha}7 nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 658–667.
- Fenster, C.P., Whitworth, T.L., Sheffield, E.B., Quick, M.W., Lester, R.A., 1999. Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J. Neurosci.* 19, 4804–4814.
- Flores, C.M., Rogers, S.W., Pabreza, L.A., Wolfe, B.B., Kellar, K.J., 1992. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol. Pharmacol.* 41, 31–37.
- Fornai, F., Lenzi, P., Gesi, M., Soldani, P., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Capobianco, L., Battaglia, G., De Blasi, A., Nicoletti, F., Paparelli, A., 2004. Methamphetamine produces neuronal inclusions in the nigrostriatal system and in PC12 cells. *J. Neurochem.* 88, 114–123.
- Gopalakrishnan, M., Molinari, E.J., Sullivan, J.P., 1997. Regulation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Mol. Pharmacol.* 52, 524–534.
- Green, A.R., Mehan, A.O., Elliott, J.M., O’Shea, E., Colado, M.I., 2003. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”). *Pharmacol. Rev.* 55, 463–508.
- Henderson, L.P., Gdovin, M.J., Liu, C., Gardner, P.D., Maue, R.A., 1994. Nerve growth factor increases nicotinic ACh receptor gene expression and current density in wild-type and protein kinase A-deficient PC12 cells. *J. Neurosci.* 14, 1153–1163.
- Imam, S.Z., Newport, G.D., Duhart, H.M., Islam, F., Slikker, W., Ali, S.F., 2002. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity and production of peroxynitrite are potentiated in nerve growth factor differentiated pheochromocytoma 12 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 965, 204–213.
- Johnson, E.A., O’Callaghan, J.P., Miller, D.B., 2004. Brain concentrations of d-MDMA are increased after stress. *Psychopharmacology (Berlin)* 173, 278–286.
- Jonnala, R.R., Buccafusco, J.J., 2001. Relationship between the increased cell surface alpha7 nicotinic receptor expression and neuroprotection induced by several nicotinic receptor agonists. *J. Neurosci. Res.* 66, 565–572.
- Kawai, H., Berg, D.K., 2001. Nicotinic acetylcholine receptors containing alpha 7 subunits on rat cortical neurons do not undergo long-lasting inactivation even when up-regulated by chronic nicotine exposure. *J. Neurochem.* 78, 1367–1378.
- Kitaichi, K., Morishita, Y., Doi, Y., Ueyama, J., Matsushima, M., Zhao, Y.L.,

- Takagi, K., Hasegawa, T., 2003. Increased plasma concentration and brain penetration of methamphetamine in behaviorally sensitized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 464, 39–48.
- Klausner, R.D., Donaldson, J.G., Lippincott-Schwartz, J., 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* 116, 1071–1080.
- Klingler, W., Heffron, J.J., Jurkat-Rott, K., O'sullivan, G., Alt, A., Schlesinger, F., Bufler, J., Lehmann-Horn, F., 2005. 3,4-Methylenedioxyamphetamine (ecstasy) activates skeletal muscle nicotinic acetylcholine receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314, 1267–1273.
- Kramer, H.K., Poblete, J.C., Azmitia, E.C., 1998. Characterization of the translocation of protein kinase C (PKC) by 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA/ecstasy) in synaptosomes: evidence for a presynaptic localization involving the serotonin transporter (SERT). *Neuropsychopharmacology* 19, 265–277.
- Liu, P.S., Liaw, C.T., Lin, M.K., Shin, S.H., Kao, L.S., Lin, L.F., 2003. Amphetamine enhances Ca²⁺ entry and catecholamine release via nicotinic receptor activation in bovine adrenal chromaffin cells. *Eur. J. Pharmacol.* 460, 9–17.
- Madhok, T.C., Matta, S.G., Sharp, B.M., 1995. Nicotine regulates nicotinic cholinergic receptors and subunit mRNAs in PC 12 cells through protein kinase A. *Mol. Brain Res.* 32, 143–150.
- Marks, M.J., Burch, J.B., Collins, A.C., 1983. Effects of chronic nicotine infusion on tolerance development and nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226, 817–825.
- Marks, M.J., Pauly, J.R., Gross, S.D., Deneris, E.S., Hermans-Borgmeyer, I., Heinemann, S.F., Collins, A.C., 1992. Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J. Neurosci.* 12, 2765–2784.
- Marks, M.J., Smith, K.W., Collins, A.C., 1998. Differential agonist inhibition identifies multiple epibatidine binding sites in mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 285, 377–386.
- Marszalec, W., Yeh, J.Z., Narahashi, T., 2005. Desensitization of nicotine acetylcholine receptors: modulation by kinase activation and phosphatase inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 514, 83–90.
- Nishizaki, T., Sumikawa, K., 1998. Effects of PKC and PKA phosphorylation on desensitization of nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* 812, 242–245.
- Nuutinen, S., Ekoski, E., Lahdensuo, E., Tuominen, R.K., 2006. Nicotine-induced upregulation of human neuronal nicotinic alpha7-receptors is potentiated by modulation of cAMP and PKC in SH-EP1-halalpha7 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 544, 21–30.
- Parrott, A.C., Buchanan, T., Scholey, A.B., Heffernan, T., Ling, J., Rodgers, J., 2002. Ecstasy/MDMA attributed problems reported by novice, moderate and heavy recreational users. *Hum. Psychopharmacol.* 17, 309–312.
- Pauly, J.R., Marks, M.J., Robinson, S.F., van de Kamp, J.L., Collins, A.C., 1996. Chronic nicotine and mecamylamine treatment increase brain nicotinic receptor binding without changing alpha 4 or beta 2 mRNA levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278, 361–369.
- Peng, X., Gerzanich, V., Anand, R., Whiting, P.J., Lindstrom, J., 1994. Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol. Pharmacol.* 46, 523–530.
- Peng, X., Gerzanich, V., Anand, R., Wang, F., Lindstrom, J., 1997. Chronic nicotine treatment up-regulates alpha3 and alpha7 acetylcholine receptor subtypes expressed by the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. *Mol. Pharmacol.* 51, 776–784.
- Picciotto, M.R., Zoli, M., Rimondini, R., Lena, C., Marubio, L.M., Pich, E.M., Fuxe, K., Changeux, J.P., 1998. Acetylcholine receptors containing the beta 2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* 391, 173–177.
- Pubill, D., Chipana, C., Camins, A., Pallas, M., Camarasa, J., Escubedo, E., 2005. Free radical production induced by methamphetamine in rat striatal synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 57–68.
- Quednow, B.B., Jessen, F., Kuhn, K.U., Maier, W., Daum, I., Wagner, M., 2006. Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction. *J. Psychopharmacol.* 20, 373–384.
- Reneman, L., Booij, J., de Bruin, K., Reitsma, J.B., de Wolff, F.A., Gunning, W.B., den Heeten, G.J., van den Brink, W., 2001. Effects of dose, sex, and long-term abstinence from use on toxic effects of MDMA (ecstasy) on brain serotonin neurons. *Lancet* 358, 1864–1869.
- Ripoll, N., Bronnec, M., Bourin, M., 2004. Nicotinic receptors and schizophrenia. *Curr. Med. Res. Opin.* 20, 1057–1074.
- Sallette, J., Pons, S., Devillers-Thiery, A., Soudant, M., Prado, D.C., Changeux, J.P., Corringier, P.J., 2005. Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron* 46, 595–607.
- Schroeder, K.M., Wu, J., Zhao, L., Lukas, R.J., 2003. Regulation by cycloheximide and lowered temperature of cell-surface alpha7-nicotinic acetylcholine receptor expression on transfected SH-EP1 cells. *J. Neurochem.* 85, 581–591.
- Skau, K.A., Gerald, M.C., 1978. Inhibition of alpha-bungarotoxin binding to rat and mouse diaphragms by amphetamine and related nonquaternary compounds. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205, 69–76.
- Sun, X., Liu, Y., Hu, G., Wang, H., 2004. Activities of cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C are modulated by desensitized nicotinic receptors in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 367, 19–22.
- Takahashi, T., Yamashita, H., Nakamura, S., Ishiguro, H., Nagatsu, T., Kawakami, H., 1999. Effects of nerve growth factor and nicotine on the expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in PC12 cells. *Neurosci. Res.* 35, 175–181.
- Vallejo, Y.F., Buisson, B., Bertrand, D., Green, W.N., 2005. Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism. *J. Neurosci.* 25, 5563–5572.
- Volkow, N.D., Chang, L., Wang, G.J., Fowler, J.S., Leonido-Yee, M., Franceschi, D., Sedler, M.J., Gatley, S.J., Hitzemann, R., Ding, Y.S., Logan, J., Wong, C., Miller, E.N., 2001. Association of dopamine transporter reduction with psychomotor impairment in methamphetamine abusers. *Am. J. Psychiatry* 158, 377–382.
- Wei, Q., Jurma, O.P., Andersen, J.K., 1997. Increased expression of monoamine oxidase-B results in enhanced neurite degeneration in methamphetamine-treated PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 50, 618–626.
- Whiteaker, P., Davies, A.R., Marks, M.J., Blagbrough, I.S., Potter, B.V., Wolstenholme, A.J., Collins, A.C., Wonnacott, S., 1999. An autoradiographic study of the distribution of binding sites for the novel alpha7-selective nicotinic radioligand [3H]-methyllycaconitine in the mouse brain. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2689–2696.
- Yamamoto, B.K., Zhu, W., 1998. The effects of methamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287, 107–114.
- Young, J.W., Crawford, N., Kelly, J.S., Kerr, L.E., Marston, H.M., Spratt, C., Finlayson, K., Sharkey, J., 2007. Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 17, 145–155.



The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on nicotinic receptors: Intracellular calcium increase, calpain/caspase 3 activation, and functional upregulation

Sara Garcia-Ratés^a, Jordi Camarasa^a, Ana I. Sánchez-García^b, Luis Gandía^b,
Elena Escubedo^{a,1}, David Pubill^{a,*}

^a Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia, Nucli Universitari de Pedralbes, Universitat de Barcelona, Institut de Biomedicina de la UB (IBUB), Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, C/ Arzobispo Morcillo, 4, 28029 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 November 2009

Revised 25 January 2010

Accepted 26 January 2010

Available online 2 February 2010

Keywords:

Calcium
Ecstasy
Fluo-4
MDMA
Nicotinic acetylcholine receptors
PC12 cells
Xenopus oocytes

ABSTRACT

Previous work by our group demonstrated that homomeric $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) play a role in the neurotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), as well as the binding affinity of this drug to these receptors. Here we studied the effect of MDMA on the activation of nAChR subtypes, the consequent calcium mobilization, and calpain/caspase 3 activation because prolonged Ca^{2+} increase could contribute to cytotoxicity. As techniques, we used fluorimetry in Fluo-4-loaded PC12 cells and electrophysiology in *Xenopus* oocytes. MDMA produced a rapid and sustained increase in calcium without reaching the maximum effect induced by ACh. It also concentration-dependently inhibited the response induced by ACh, nicotine, and the specific $\alpha 7$ agonist PNU 282987 with IC_{50} values in the low micromolar range. Similarly, MDMA induced inward currents in *Xenopus* oocytes transfected with human $\alpha 7$ but not with $\alpha 4\beta 2$ nAChR and inhibited ACh-induced currents in both receptors in a concentration-dependent manner. The calcium response was inhibited by methyllycaconitine (MLA) and α -bungarotoxin but not by dihydro- β -erythroidine. These results therefore indicate that MDMA acts as a partial agonist on $\alpha 7$ nAChRs and as an antagonist on the heteromeric subtypes. Subsequently, calcium-induced Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum and entry through voltage-operated calcium channels are also implicated as proved using specific antagonists. In addition, treatment with MDMA for 24 h significantly increased basal Ca^{2+} levels and induced an increase in α -spectrin breakdown products, which indicates that calpain and caspase 3 were activated. These effects were inhibited by pretreatment with MLA. Moreover, pretreatment with MDMA induced functional upregulation of calcium responses to specific agonists of both heteromeric and $\alpha 7$ nAChR. Sustained calcium entry and calpain activation could favor the activation of Ca^{2+} -dependent enzymes such as protein kinase C and nitric oxide synthase, which are involved in the generation of ROS and the blockade of the dopamine transporter. This, together with caspase 3 activation, must play a role in MDMA-induced cytotoxicity.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) is an amphetamine derivative that is used in developed countries for recreational purposes, often by young people in dance clubs and discotheques. A number of fatalities have been reported after acute consumption of this stimulant, but there is also experimental evidence that MDMA can induce serotonergic (in rats and primates) and dopaminergic (in mice) neurotoxicity (see Lyles and Cadet, 2003, for a review). In addition, serotonergic (Reneman et al., 2002) and cognitive (Parrott et al., 1998; Quednow et al., 2006; McCann et al., 2008) deficits have been reported in human chronic MDMA abusers, which could be due to neurotoxicity or to drug-induced long-lasting neurochemical changes.

Abbreviations: 2-APB, 2-aminoethyl diphenyl borate; α -BgTx, α -bungarotoxin; ACh, acetylcholine; CICR, calcium-induced calcium release; DH β E, dihydro- β -erythroidine; EGTA, ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ER, endoplasmic reticulum; MDMA, 3,4-methylenedioxymethamphetamine; MA, methamphetamine; MLA, methyllycaconitine; nAChR, nicotinic acetylcholine receptors; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; PAM, positive allosteric modulator; PMSF, phenylmethanesulfonyl fluoride; ROS, reactive oxygen species; SBDP, spectrin breakdown product; TSS, Tyrode's salt solution; VOCC, voltage-operated calcium channel.

* Corresponding author. Fax: +34 934035982.

E-mail address: d.pubill@ub.edu (D. Pubill).

¹ Contributed equally to this work.

The neurotoxicity of amphetamine derivatives could be the consequence of coordinated oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation (reviewed by Yamamoto and Raudensky, 2008). In addition, we recently reported that neuronal acetylcholine nicotinic receptors (nAChRs) (mainly the homomeric $\alpha 7$ subtype) play a key role in MDMA-induced neurotoxicity, as this is prevented *in vitro* and *in vivo* by blocking nAChRs with methyllycaconitine (MLA) or memantine (Chipana et al., 2006, 2008a,b,c). These receptors are also involved in cognitive impairment in rats (Camarasa et al., 2008). In radioligand binding experiments, we demonstrated that MDMA has an affinity for both homomeric $\alpha 7$ and heteromeric nAChRs (Garcia-Rates et al., 2007; Chipana et al., 2008a,c).

As *in vitro* neurotoxicity was prevented by calcium chelation, an enhanced influx of this cation induced by MDMA, probably through $\alpha 7$ nAChR, would be a feasible event. The formation of more lesive ROS, such as peroxynitrite, would be brought about by activation of Ca^{2+} -dependent enzymes (i.e., nitric oxide synthase (nNOS)) together with the products (i.e., peroxide or superoxide) of the cytosolic oxidation of monoamine neurotransmitters (mainly dopamine and 5-HT), which are displaced from synaptic vesicles by the amphetamine derivative (Hansen et al., 2002). Apart from inducing damage to cell structures, this highly reactive compound has been found to inhibit dopamine transporter functionality (Demiryurek et al., 1998; Park et al., 2002). Such inhibition would favor cytosolic neurotransmitter accumulation, which in turn would increase ROS inside nerve terminals and toxicity.

nAChRs are a family of ligand-gated cation channels that are widely distributed in the brain and the peripheral nervous system, whose subunit composition and signaling effects depend on the subtype and their localization (reviewed by Gotti et al., 2007 and Albuquerque et al., 2009). They exert a number of effects on brain functions including fast synaptic transmission, cognitive enhancement, memory, or reinforcement and are the main target of smoked nicotine. Structurally, nAChRs are pentamers formed by the association of α and β subunits and can be either homomeric or heteromeric. The most abundant of these combinations in the central nervous system are homomeric $\alpha 7$ and heteromeric $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ receptors. nAChRs are permeable to monovalent Na^+ and K^+ ions and to Ca^{2+} . The cation permeability of the subtypes depends on their subunit composition and has been reviewed (Fucile, 2004). Thus, heteromeric nAChRs, comprising α and β subunits, generally have low permeability for Ca^{2+} (a fractional current of 2–5%). In contrast, homomeric $\alpha 7$ subtypes have the highest fractional Ca^{2+} current, which ranges from 6% to 12%, depending on the species and matches that of heteromeric *N*-methyl-D-aspartate receptors (Jatzke et al., 2002). In addition, depolarization induced by Na^+ entry (in various ways, including heteromeric nAChRs) or Ca^{2+} could open voltage-gated calcium channels and enhance Ca^{2+} influx. These two mechanisms can be physiologically complementary and play important roles in cell signaling by activating different downstream intracellular pathways in neurons (reviewed by Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004), such as protein kinase C (PKC) and nNOS. These pathways have been implicated in the neurotoxicity of amphetamines (Deng and Cadet, 1999; Kramer et al., 1997; Chipana et al., 2008a). Therefore, pharmacological or pathological $\alpha 7$ nAChR overactivation together with other circumstances (i.e., oxidation of cytosolic monoamines) could lead to a sort of excitotoxicity, due to sustained Ca^{2+} increase.

In fact, in previous work, we demonstrated *in vitro* that Ca^{2+} chelation with EGTA prevented the production of reactive oxygen species (ROS) to a similar extent as nAChR blockade (Pubill et al., 2005; Escubedo et al., 2005; Chipana et al., 2006, 2008a). This indicates that calcium influx, probably through $\alpha 7$ nAChR, is a key step in this process.

A particular feature of some nAChR subtypes is that they undergo radioligand binding upregulation, changes in stoichiometry, and an increase in their functional state (functional upregulation) after

chronic nicotine exposure (reviewed by Gaimarri et al., 2007). In a previous work on PC12 cells, we demonstrated that MDMA pretreatment induced *in vitro* radioligand binding upregulation of both homomeric and heteromeric receptors through a mechanism that seemed to mimic that of nicotine (Garcia-Rates et al., 2007).

Consequently, the main objective of this work was to use a fluorimetric method to investigate the effect of MDMA on Ca^{2+} levels in cultured PC12 cells and the involvement of different nAChR subtypes and other cell pathways related to Ca^{2+} mobilization. PC12 cells have been utilized by other scientists to study the neurotoxicity of amphetamines (Wei et al., 1997; Imam et al., 2002; Fornai et al., 2004). In addition, this cell line expresses nAChRs, including the $\alpha 7$ subtype (Henderson et al., 1994; Blumenthal et al., 1997; Garcia-Rates et al., 2007), and also provides an *in vitro* model for the upregulation of nAChR, which occurs following chronic exposure to nicotine (Madhok et al., 1995; Takahashi et al., 1999; Jonnala and Buccafusco, 2001). Moreover, the pathways involved in cytosolic Ca^{2+} increase induced by different selective nicotinic agonists have been characterized in this cell line (Dickinson et al., 2007). For this reason, we chose this model as the most appropriate for our purposes.

In addition, we used electrophysiology in transfected *Xenopus* oocytes to corroborate the effects on $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChR. Moreover, we sought to assess whether pretreatment with MDMA induces functional upregulation by potentiating the effects of specific nAChR agonists or whether it provokes a persistent Ca^{2+} increase, leading to calpain and caspase 3 activation, which could be involved in toxicity.

Materials and methods

Drugs and reagents. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), culture serums, and antibiotics were purchased from GIBCO (Invitrogen Corp., Paisley, UK). Fluo-4 AM and Pluronic F127 solution were purchased from Molecular Probes (Leiden, The Netherlands). MDMA was provided by the National Health Laboratory (Barcelona, Spain). 5-Iodo-A-85380 dihydrochloride (5-I-A), PNU 120596, and PNU 282987 were purchased from Tocris (Avonmouth, UK). Acetylcholine (ACh), methyllycaconitine (MLA), probenecid, ethylene glycol-bis(2-aminoethyl)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), ionomycin, dihydro- β -erythroidine (DH β E), dantrolene, nitrendipine, 2-aminoethyl diphenyl borate (2-APB), cadmium chloride, and α -bungarotoxin (α -BgTx) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the drugs were used from stocks made up in water, with the exception of PNU 120596 (10 mM stock in dimethylsulfoxide), EGTA, and probenecid, which were made up in water plus the minimum amount of 1 N NaOH. Fluo-4 AM working solution was prepared extemporaneously from frozen stock solutions made in 10% Pluronic F127 in dimethylsulfoxide. ACh and MDMA were freshly prepared directly in assay buffer for each experiment. The rest of the general reagents and salts were obtained from different commercial sources and were of analytical grade.

PC12 cell cultures. Wild-type PC12 cells were generously provided by Dr. J. Serratos (Department of Neurochemistry, Pharmacology and Toxicology, CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain). The culture was routinely plated in 92-mm dishes (Nunc) coated with collagen and maintained in DMEM supplemented with heat-inactivated 5% fetal bovine serum, 10% horse serum, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine, 25 UI/ml penicillin, and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin. Cells were cultured to semi-confluency in a humidified 5% CO_2 atmosphere at 37°C, and the medium was changed every 2–3 days. For the splitting procedure, cells were dislodged from the dish using a pipette containing medium. A portion of the cells were replated onto new culture dishes. For calcium fluorimetry, cells were plated at a density of 300,000 cells/well into black-walled, clear bottom 96-well plates (Corning-Costar, Schiphol-Rijk, The Netherlands) coated with collagen. Assays were conducted 24 h later.

Calcium fluorimetry. Increases in intracellular Ca^{2+} were monitored as described by Dickinson et al. (2007), with minor modifications. The culture medium was removed from the wells, and the cells were washed with warm Tyrode's salt solution (TSS, in mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 2.5 CaCl_2 , 0.86 MgCl_2 , 12 NaHCO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5.5 D-glucose; pH 7.4) and incubated with loading medium (100 μl /well) at room temperature for 40 min in the dark. The loading medium was made up of the Ca^{2+} -sensitive dye Fluo-4 AM (6 μM) and probenecid (2 mM) in TSS. After incubation, the cells were washed with warm TSS and 200 μl of de-esterification medium (TSS containing 2 mM probenecid) was added. The cells were incubated at 37°C for 20 min in the dark. After incubation, 10 μM PNU 120596 was added to each well as appropriate. PNU 120596 is a positive allosteric modulator (PAM) of $\alpha 7$ nAChR that allows measurable responses to be generated using this technique by inhibiting receptor desensitization and increasing the mean open time while having relatively little or no effect on either the unitary conductance or ion selectivity of the channel (Hurst et al., 2005; Dickinson et al., 2007). Then the plate was transferred to a Perkin Elmer Victor³ microplate reader for the measurements.

The measurements were performed in a room with the temperature set at 25°C. To avoid an excessive drop in well temperature and subsequent differences between the first and the last well read, each experiment was carried out only using half or less than the 96 wells of each plate. Measurements of different experimental conditions were performed in different arrays and order among different plates to compensate for any possible variation due to temperature. Taking these measures, the results of replicates were consistent and repetitive. When antagonists and other blockers were used, they were manually added (5–10 μl /well), mixed with the medium by gentle repetitive pipetting, and pre-incubated with the cells for 10 min at 37°C with the exception of α -BgTx, which was pre-incubated for 30 min. Basal fluorescence (excitation 485 nm, emission 535 nm) was monitored for 5 s, and then the agonists were automatically dispensed (20 μl /well) by means of the built-in injector. The fluorescence measurements were continued for a further 60 s. None of the vehicles used significantly altered the basal level of the fluorescence readings. The liquid volume of each well was of 200 μl and added drug concentrations were calculated taking into account the final increase in volume. All drug dilutions were made in TSS to ensure proper diffusion and mixing.

Increases in fluorescence reached a maximum within 5–15 s after agonist/stimulus injection and this response was sustained throughout the reading time. To normalize Fluo-4 signals, responses from each well were calibrated by determining the maximum and minimum fluorescence values. This was done by adding 2 μM ionomycin (F_{max}) followed by 10 mM EGTA (F_{min}). Peak fluorescence responses in each well were calculated as a percentage of ($F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$). In inhibition and concentration–effect curves, the responses were expressed as the percentage of that elicited by 100 μM ACh or nicotine, or 15 μM PNU 282987, whereas we used the percentage of the response induced by 50 μM MDMA in experiments with MDMA-induced responses using specific blockers (performed in parallel with an absence of blockers for each experiment). The maximum responses that were measured were below 40%, which is not close to the saturation point of the dye.

The EC_{50} values for ACh and MDMA and the IC_{50} of MDMA on ACh, nicotine, and PNU 282987 were calculated by fitting the experimental data points to a single site Hill equation using a non-linear regression curve. This was fitted by means of GraphPad Prism 3.0 (GraphPAD software, San Diego, CA, USA).

Data represent the mean \pm SEM of at least three independent experiments, each performed with four replicates for each condition. The statistical analysis was performed using GraphPad Instat 3.0, and significance was determined using a one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Statistical significance was taken at a P value < 0.05.

Preparation of mRNAs for subunits of human nicotinic receptor and their expression in *Xenopus* oocytes. cDNAs of human neuronal nAChR subunits $\alpha 7$, $\alpha 4$, and $\beta 2$ were inserted into the pSP64T vector or a derivative thereof. Details of the production of these constructions have been described previously (Criado et al., 2005). After linearization by restriction enzyme digestion, DNA was purified by ethanol precipitation, and capped mRNA was synthesized *in vitro* using SP6 RNA polymerase and the mMESSEAGEmMACHINE kit (Applied Biosystems Hispania, Madrid, Spain). cRNA was purified by phenol:chloroform extraction and isopropanol precipitation, and stored at -80°C .

Mature female *Xenopus laevis* African frogs were used as a source of oocytes. The frogs were anesthetized by placing the animals in a 2 g/l solution of tricaine (ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt) for 30 min. Oocytes were removed from an incision made in the abdomen. In order to remove the follicular cell layer, harvested oocytes were treated with 0.5 mg/ml collagenase for 45 min at room temperature in calcium-free Barth's solution (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO_4 , 2.4 mM NaHCO_3 , 7.5 mM Tris, buffered to pH 7.4 with HCl).

Defolliculated *Xenopus* oocytes were injected with 46 nl of mRNA at a final concentration of 250 ng/ μl . After injection, oocytes were incubated at 16–18°C for 3 to 5 days in a calcium Barth's solution (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.82 mM MgSO_4 , 2.4 mM NaHCO_3 , 7.5 mM Tris, 0.41 mM CaCl_2 , 0.33 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, buffered to pH 7.4 with HCl) containing 10 U/ml penicillin and 10 μg /ml streptomycin. Oocytes were examined for functional expression of hnAChRs 3 to 5 days after RNA injection.

Electrophysiological recordings. Membrane currents were recorded by means of two-electrode voltage clamps (Campos-Caro et al., 1997), using microelectrodes with resistances of 0.2–1 M Ω made from borosilicate glass (Sutter Instrument Co., Novato, CA, USA) and filled with 3 M KCl. The oocyte was held in a chamber of 0.6 ml volume. Voltage protocols were run, and the current was recorded and analyzed using a Digidata 1200 Interface, driven by pCLAMP 5.2 software (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Experiments were carried out at room temperature (22–24°C) in the extracellular recording solution that contained (in mM) 82.5 NaCl, 2.5 KCl, 2.5 BaCl_2 , 1 MgCl_2 , and 5 HEPES, buffered to pH 7.4 with NaOH. We used barium instead of calcium to minimize the contribution of calcium-gated chloride conductance (Sands et al., 1993). Agonists were applied through a gravity-driven pipette with an internal diameter of 1.2 mm, with its tip located close to the animal hemisphere of the oocyte. The flow of solutions containing agonists was 12 ml/min, and the basal perfusion rate was 7 ml/min. This perfusion system allows a fast exchange of solutions, and the concentration of agonist is the same all over the oocyte surface and equal to the drug concentration in the pipette. The holding potential was usually fixed at -70 mV. Currents were filtered at 1000 Hz with a low-pass Bessel filter. Uninjected oocytes were also tested with the drugs to ensure that there was no background response.

For the concentration–response curves, data correspond to mean \pm standard error (SEM). The different responses used to create the concentration-dependent inhibition curve were fitted with Origin software (Microcalc Software Inc.) to the following pharmacological dose–response equation:

$$Y = A_1 + [A_2 - A_1] / \left[1 + 10^{[(\log(X_0) - X) * p]} \right],$$

where Y represents the current response at a given agonist concentration (X); A_2 is the ligand concentration that produces the maximum response; A_1 is the ligand concentration that produces the minimal response; X_0 represents the ligand concentration that produces a half-maximal response (for example, EC_{50} or IC_{50}); and p represents the Hill coefficient. The curve data are expressed as the

percent response to 100 μM ACh. Differences between the groups were compared by ANOVA/Manova and Duncan's test. A value of $P < 0.05$ was taken as the limit of statistical significance.

Immunodetection of specific α -spectrin breakdown products. A general Western blot and immunodetection protocol was used to determine specific α -spectrin breakdown products of 145–150 kDa and 120 kDa produced by the calcium-dependent protease calpain and caspase 3. PC12 cells were cultured onto 92-mm plates and treated with either MDMA (50 μM) or DMEM (control) for 24 h. Then the cells were washed with ice-cold phosphate buffer, scrapped and collected from the plate, pelleted by low-speed centrifugation, and solubilized in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, and 1% Nonidet P-40) by incubation for 2 h at 4°C under gentle rotation. Thereafter, the samples were centrifuged at 15,000 $\times g$ for 30 min at 4°C, and the supernatants containing solubilized proteins were stored at -80°C, after determination of protein content using the Bio-Rad Protein Reagent. For each sample, 40 μg of protein was mixed with sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% (w/v) sodium dodecyl sulphate, 5% (v/v) 2- β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue, final concentrations), boiled for 10 min, and loaded onto an 8% acrylamide gel. Proteins were separated by electrophoresis until the elution of the migration front and the 64-kDa colored marker, to allow proper separation of high molecular weight fragments. Proteins were then transferred from gels to polyvinylidene fluoride sheets (Immobilon-P; Millipore, Billerica, MA, USA). These sheets were blocked for 1 h at room temperature with 5% defatted milk in Tris-buffered saline buffer plus 0.05% Tween 20 (TBS-T buffer). They were then incubated for 2 h with mouse monoclonal antibody against non-erythroid α -spectrin (MAB1622; Chemicon, Temecula, CA, USA, 1:5000 dilution), diluted in TBS-T buffer plus 5% defatted milk. Thereafter, the membranes were washed with TBS-T buffer and incubated for 45 min with anti-mouse IgG peroxidase-conjugated secondary antibody (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK; 1:2500 dilution).

After washing, immunoreactive protein was visualized using an enhanced chemoluminescence-based detection kit, following the manufacturer's protocol (Immobilon Western, Millipore) and a BioRad ChemiDoc XRS gel documentation system (BioRad Labs., Hercules, CA, USA). Scanned blots were analyzed using BioRad Quantity One software and dot densities were expressed as a percentage of those taken from the control cultures. The statistical analysis was performed as described above.

Results

Effects of MDMA on Ca^{2+} increases induced by ACh, nicotine, and PNU 282987

We first tested the effects of increasing concentrations of MDMA on the responses induced by the nAChR agonists PNU 282987 ($\alpha 7$ selective, 0.1 μM ; Bodnar et al., 2005) nicotine and ACh (both non-selective nAChR agonists, 100 μM), in the presence of the $\alpha 7$ -positive allosteric modulator PNU 120596 (10 μM , Dickinson et al., 2007). PNU 120596 allowed measurable responses using this technique by inhibiting receptor desensitization and increasing the mean open time while having relatively little or no effect on either the unitary conductance or ion selectivity of the channel (Hurst et al., 2005). MDMA concentration-dependently attenuated the increase in Ca^{2+} induced by the three agonists (Fig. 1A). Non-linear regression of these data yielded IC_{50} values of $10.42 \pm 3.96 \mu\text{M}$ for ACh, $18.70 \pm 2.31 \mu\text{M}$ for nicotine, and $29.88 \pm 2.52 \mu\text{M}$ for PNU 282987 ($n = 3$ for each agonist). However, when we examined the basal Ca^{2+} levels after MDMA and before adding the agonist, we found a concentration-dependent increase (Fig. 1B). This indicates that MDMA alone had an effect on cytosolic Ca^{2+} levels.

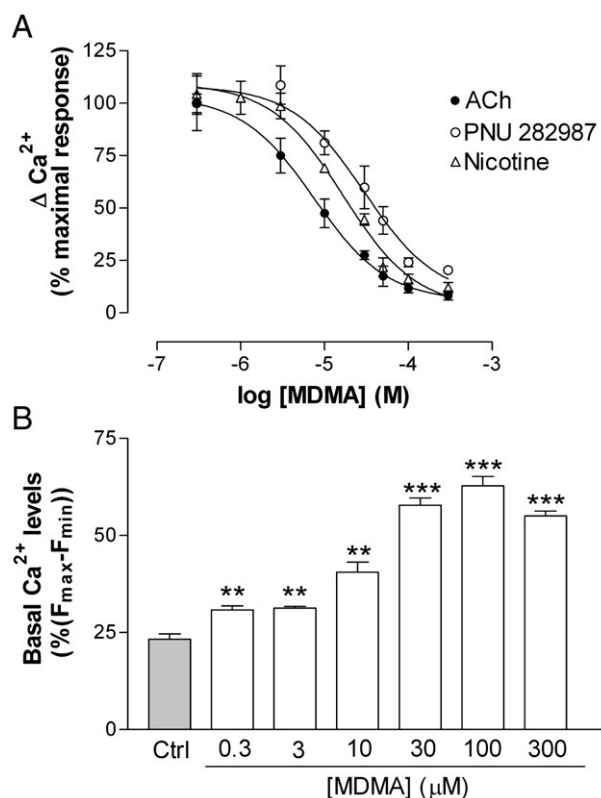


Fig. 1. (A) Effect of increasing concentrations of MDMA on the responses to the nicotinic agonists ACh (100 μM), nicotine (100 μM), and PNU 282987 (0.1 μM) in PC12 cells loaded with Fluo-4. MDMA was added to the cells 5 min before the agonist. Basal fluorescence levels were measured for 5 s before the agonist and for a further 95 s after its addition by means of an automated injector. (B) Basal Ca^{2+} levels 5 min after the addition of MDMA and before adding the agonist. All the measurements were performed in the presence of the positive allosteric modulator PNU 120596 (10 μM). The results were normalized as percentage ($F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$) and are the means \pm SEM of at least three experiments, carried out in quadruplicates for each condition. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. control basal levels.

MDMA induces cytosolic Ca^{2+} increase in PC12 cells

As MDMA acutely inhibited the effects of nAChR agonists, and due to its effects on basal levels, we explored the possibility of a partial agonist mode of action. When added alone and acutely by the automated injector to cells loaded with Fluo-4, MDMA induced a concentration-dependent increase in intracellular Ca^{2+} that did not reach the maximum effect induced by 100 μM ACh and peaked within the first 15 s after addition. Representative response tracings are shown in Fig. 2A. Concentration-effect curves were built for ACh and MDMA (Fig. 2B), which gave EC_{50} values of $0.50 \pm 0.16 \mu\text{M}$ for ACh and $49.75 \pm 5.74 \mu\text{M}$ for MDMA ($n = 3$).

MDMA behaves as a partial agonist in oocytes expressing human $\alpha 7$ and as an antagonist in those expressing $\alpha 4\beta 2$ nAChRs

As in the calcium measurement experiments, MDMA inhibited ACh-induced currents in a concentration-dependent manner. To characterize these blocking effects of MDMA, inward currents in oocytes injected with mRNA for human $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChR subunits were generated by the application of 5-s pulses of ACh (100 μM), in the absence (control) or presence of increasing concentrations of MDMA. Fig. 3A shows the concentration-response curve for the inhibition by MDMA of ACh-induced peak currents in oocytes expressing $\alpha 7$ nAChR. MDMA inhibited the current with an IC_{50} value of $16.79 \pm 0.77 \mu\text{M}$ ($n = 3$). The maximum blockade of the ACh-

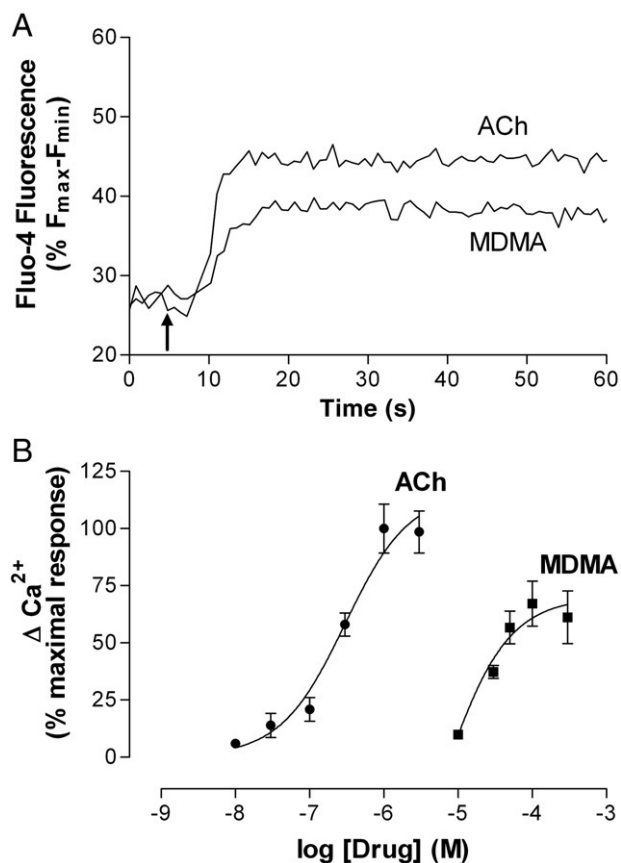


Fig. 2. (A) Representative tracings of the increases in Fluo-4 fluorescence in PC12 cells after the addition of ACh (1 μ M) and MDMA (50 μ M). (B) Representative concentration-response curves showing the increase in cytosolic Ca²⁺ induced by MDMA and ACh as a total agonist. Responses were normalized as percentage ($F_{\max} - F_{\min}$) and represented as a percentage of the maximum response (ACh 100 μ M) for both curves. After 5 s of basal recording, ACh and MDMA were added by means of an automated injector to PC12 cells loaded with Fluo-4 and the fluorescence was measured for a further 95 s. Represented data are the mean \pm SEM of four replicates for each condition.

induced inward current was observed at 100 μ M MDMA (97.78 \pm 2.22%). On the other hand, MDMA concentration-dependently inhibited ACh-induced currents in α 4 β 2-transfected oocytes, with an IC₅₀ value of 9.77 \pm 0.22 μ M (n = 3) and, at a concentration of 100 μ M, it almost totally inhibited the response (Fig. 3B).

To characterize the possible agonistic properties of MDMA, inward currents in oocytes injected with mRNA for α 7 human nAChR subunits were generated by application of 5-s pulses of ACh (1 mM) or MDMA (100 μ M), applied at 120-s intervals. The application of ACh elicited an inward current of about 638 \pm 107.26 nA (n = 6 oocytes), which was characterized by its fast activation as well as its slow desensitization phase. Application of MDMA (100 μ M) to the same oocyte induced an inward current of 36.67 \pm 13.82 nA. To further characterize the nicotinic nature of the response evoked by MDMA in α 7 oocytes, the effect of PNU 120596 was tested on inward currents that were induced by either ACh or MDMA. Pulses of ACh (1 mM) or MDMA (100 μ M) were applied in the absence (control) and presence of 1 μ M PNU 120596, which was perfused from 2 min before and during the ACh pulses. Fig. 3C shows the two representative inward current traces obtained upon application of ACh in the absence (control; left trace) and presence of 1 μ M PNU 120596 (second trace). Fig. 3C also shows current traces obtained in response to pulses of MDMA, which were applied in the absence or presence of PNU 120596. Note that when oocytes were pretreated with PNU 120596, a marked increase in both ACh- and MDMA-induced inward currents was observed, together with a marked delay in the inactivation of the inward

currents, which is a typical effect of this PAM (Hurst et al., 2005). The enhancement of inward currents by PNU 120596 was 7.6-fold for ACh- and 9.6-fold for MDMA-induced currents (no significant differences were found between enhancements for both compounds) (Fig. 3D).

MDMA had no effect in currents when applied alone to α 4 β 2-transfected oocytes (data not shown).

Pathways involved in MDMA-induced Ca²⁺ increase

Specific nAChR antagonists as well as inhibitors of other pathways involved in calcium mobilization were tested to study the mechanism by which MDMA induces an increase in cytosolic calcium (Fig. 4A). The specific α 7 antagonists methyllycaconitine (MLA, 10 nM) and α -BgTx (100 nM) completely inhibited the response induced by MDMA. The antagonist of heteromeric receptors containing the β 2 subunit, dihydro- β -erythroidine (DH β E, 1 μ M) had no significant effect on MDMA-induced response. The blockers of endoplasmic-reticulum Ca²⁺ mobilization, dantrolene (20 μ M, an antagonist at the ryanodine receptor), and 2-aminoethyl diphenyl borate (2-APB, 150 μ M, a blocker of IP₃ receptor-induced Ca²⁺ release and of store-operated cation channels) also partially inhibited the MDMA-induced response, which indicates the role of intracellular Ca²⁺ stores. Nitrendipine (0.3 μ M), which is a blocker of L-type voltage-operated Ca²⁺ channels (VOCC), inhibited the MDMA effect by 30% although at a higher concentration (30 μ M) the inhibition increased up to 60% (data not shown). CdCl₂ (50 μ M), which is a nonselective blocker of voltage-gated Ca²⁺ channels, also inhibited MDMA-induced response to a similar extent than nitrendipine. Finally, atropine (0.1 μ M), a muscarinic AChR antagonist, did not modify the MDMA effect.

The response to MDMA was completely abolished when the experiments were carried out in a Ca²⁺-free medium containing EGTA (Figs. 4B and C), which indicates that extracellular calcium is needed for the response to be initiated.

Effects of preincubation with MDMA on basal Ca²⁺ levels

To study the longer term effect of MDMA on cytosolic Ca²⁺ levels, cells were incubated with MDMA (50 μ M) for 1, 6, and 24 h. They were then washed, loaded with Fluo-4 and the fluorescence was measured. Preincubation with nicotine (50 μ M) and its association with MDMA were also studied for comparison as nicotine is not neurotoxic regardless of its potent nicotinic effects and is often concomitantly consumed with MDMA. As shown in Fig. 5, after 1 h of preincubation, only nicotine-pretreated cells showed a slight but significant (12 \pm 2.95%, n = 3, P < 0.05) increase in basal Ca²⁺ levels. However, when preincubation was carried out for 6 and 24 h, nicotine-pretreated cells showed the same basal levels as controls, while cells pretreated with MDMA had significant increases of about 30% over control levels. The association of nicotine with MDMA did not modify the MDMA effects.

MDMA induces α -spectrin cleavage by calpain

As a sustained cytosolic Ca²⁺ increase induced by MDMA might induce activation of the calcium-dependent protease calpain, the levels of the breakdown products of one of the main substrates of this compound (α -spectrin) were analyzed by Western blot. Cultured PC12 cells were treated for 24 h with 50 μ M MDMA or culture medium, then harvested, and subjected to gel electrophoresis and immunoblot. As can be seen in Fig. 6, MDMA treatment induced a significant increase in specific spectrin breakdown products (SBDP) of 145 and 150 kDa, indicating calpain activation. In addition, a very significant increase in the 120 kDa SBDP was detected, pointing to caspase 3 activation. Caspase 3 can also produce the 150 kDa SBDP product (Zhang et al., 2009). When the cells were co-incubated with MDMA plus MLA (10 nM), the increases in SBDPs were inhibited. MLA alone was devoid of effect on SBDPs.

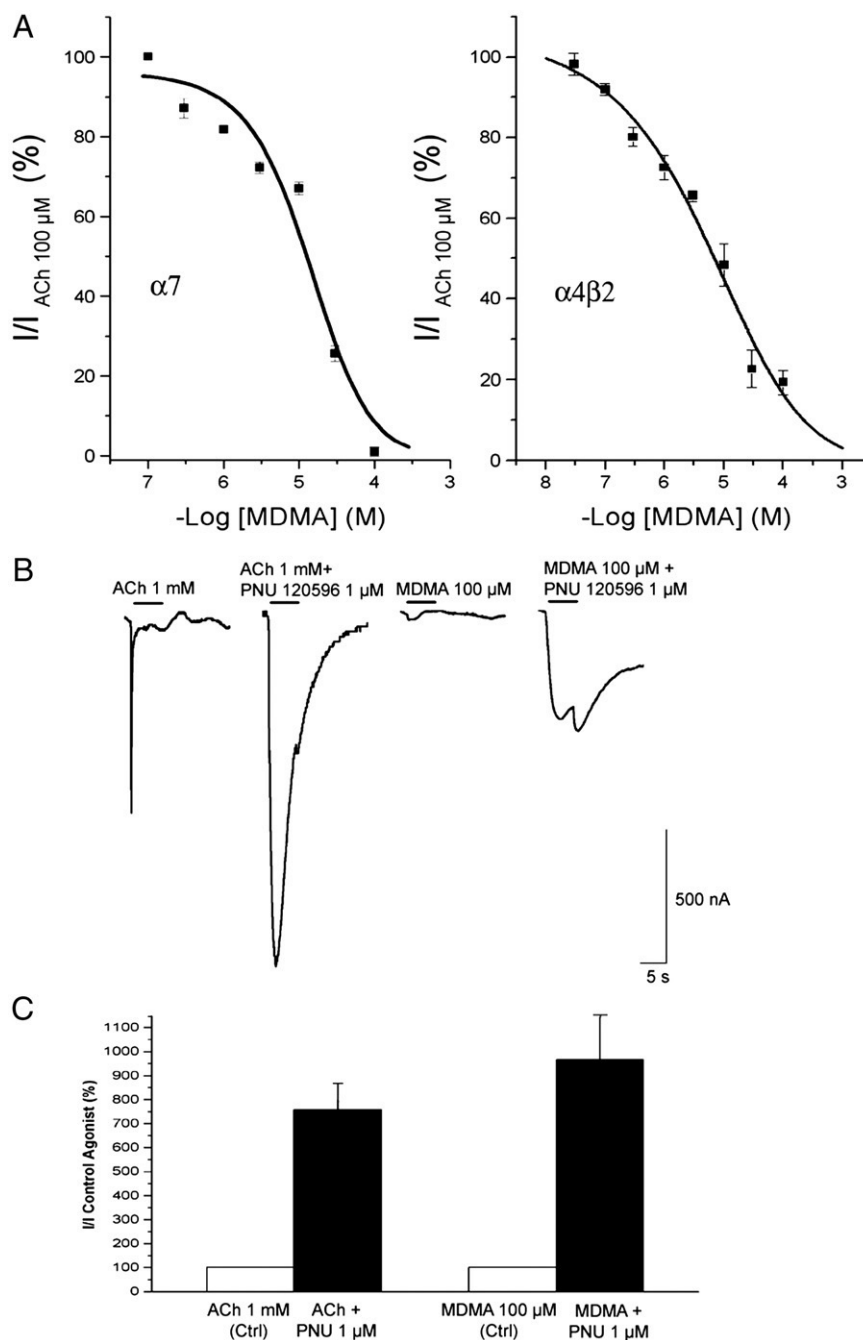


Fig. 3. Inward currents elicited by the application of ACh or MDMA to *Xenopus* oocytes expressing human nAChR. Panel A shows the concentration–response inhibition of ACh (100 μM)-induced currents by MDMA in oocytes expressing α7 (left) or α4β2 (right) human nAChR. The responses are expressed as the percentage of the current elicited by 100 μM ACh. Data are means ± SEM of 3 oocytes from at least two donors. (B) Representative recordings of inward currents elicited by ACh (1 mM) and MDMA (100 μM) in the absence and presence of PNU120596 (1 μM) in oocytes expressing α7 human nicotinic receptors. Oocytes maintained at a holding potential of –70 mV were stimulated with pulses of agonists of 5-s duration as indicated by the top horizontal bars, at 2-min intervals. Panel C shows pooled results for currents generated by ACh and MDMA on α7 human oocytes. Superfusion of α7 oocytes with PNU120596 produced marked potentiation of the inward nicotinic current elicited by ACh (1 mM) or MDMA (100 μM). The potentiated responses are expressed as the percentage of the current elicited by 1 mM ACh or 100 μM MDMA. Data are means ± SEM of 6 oocytes from at least three donors.

Functional upregulation

When cells were pretreated with MDMA (50 μM) for 24 h and their response to specific nicotinic agonists was measured, a significant increase in response was observed (Fig. 7). This demonstrates that, like nicotine, chronic MDMA can induce functional upregulation of nicotinic responses. Specifically, the response to the α7-selective agonist PNU 282987 (0.1 μM) was increased by about 20% (119.1 ± 1.95, $n=3$, $P<0.05$ vs. control) while the response to the specific agonist of heteromeric nAChR containing β2 subunits, 5-I-A-85380

(15 μM, Mogg et al., 2004), was increased by about 25% (126.27 ± 4.99, $n=3$, $P<0.05$ vs. control).

Discussion

When we started studying the effects of MDMA on nAChR-mediated Ca²⁺ response, our first hypothesis was that MDMA would enhance endogenous ACh action on nAChRs. Thus, we tested its effects on ACh-induced cytosolic Ca²⁺ increase. In these experiments, a concentration-dependent inhibitory effect of MDMA was found with

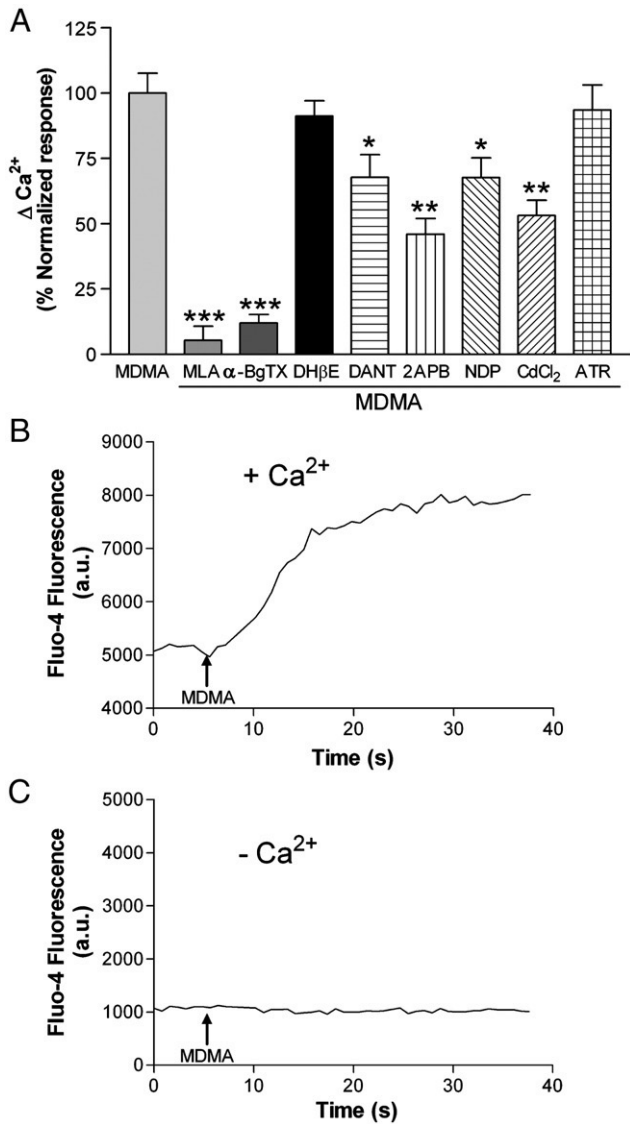


Fig. 4. (A) Pharmacological modulation of MDMA-induced increase in cytosolic Ca²⁺. Drugs were manually added to cultured PC12 cells loaded with Fluo-4, 10 min before the automated addition of MDMA (50 μM). The response was measured for 5 s before and 95 s after MDMA, then normalized as percentage ($F_{max} - F_{min}$) and expressed as a percentage of the response induced by MDMA alone. All the measurements were carried out in the presence of PNU 120596 (10 μM). Abbreviations and concentrations used: MLA (methyllycaconitine, 1 μM), DHβE (dihydro-β-erythroidine, 50 μM), DANT (dantrolene, 20 μM), 2-APB (2-aminoethyl diphenyl borate, 150 μM), NDP (nitrendipine, 30 μM), ATR (atropine, 0.1 μM). Results are mean ± SEM of three experiments carried out in quadruplicates. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs. MDMA. Panels B and C are representative tracings of the response to MDMA in a medium containing Ca²⁺ (B) and in a calcium-free medium (C).

an IC₅₀ value in the low micromolar range, in agreement with former radioligand binding results (Garcia-Rates et al., 2007). MDMA also inhibited the effects of nicotine and the selective α7 agonist PNU 282987, with low micromolar IC₅₀ values. However, the basal fluorescence levels (after vehicle/MDMA and before the agonist) were higher in MDMA-treated cells, which suggest that MDMA alone has an agonistic effect. Then we tested the effect of acute application of MDMA and found a concentration–effect relationship in the micromolar concentration range. The effect of MDMA did not reach the maximum values induced by ACh, which indicates a partial agonist mode of action. The EC₅₀ value was in the micromolar range, which is in agreement with previous binding results. These results were confirmed by electrophysiology experiments on *Xenopus* oocytes expressing the human α7 and α4β2 nAChR: in a concentra-

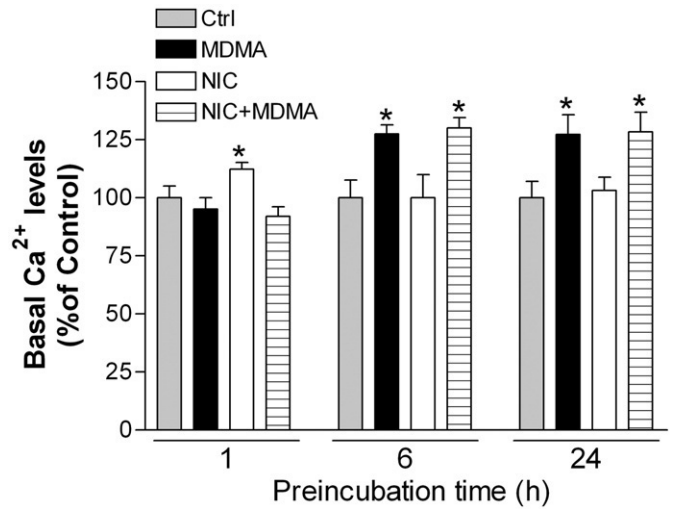


Fig. 5. Effect of preincubation with MDMA or nicotine (both at 50 μM) for different times on basal cytosolic Ca²⁺ levels. Cultured PC12 cells were treated with either MDMA, nicotine (both at a concentration of 50 μM) or their combination for 1, 6, and 24 h, then washed and loaded with Fluo-4 to measure the fluorescence corresponding to basal Ca²⁺ levels. Values are normalized to those from cells treated with vehicle (control) and are the means of three different experiments ± SEM. **P*<0.05 vs. control.

tion-dependent manner, MDMA inhibited ACh-induced currents with IC₅₀ values similar to those obtained in calcium experiments. Applied alone, MDMA was able to induce currents through α7 nAChR in the presence of the PAM PNU 120596. Although the response was small compared with the calcium signal obtained in PC12 cells, it must be taken into account that, in cells, α7 nAChR activation can couple to other pathways involved in Ca²⁺ increase, while this does not occur

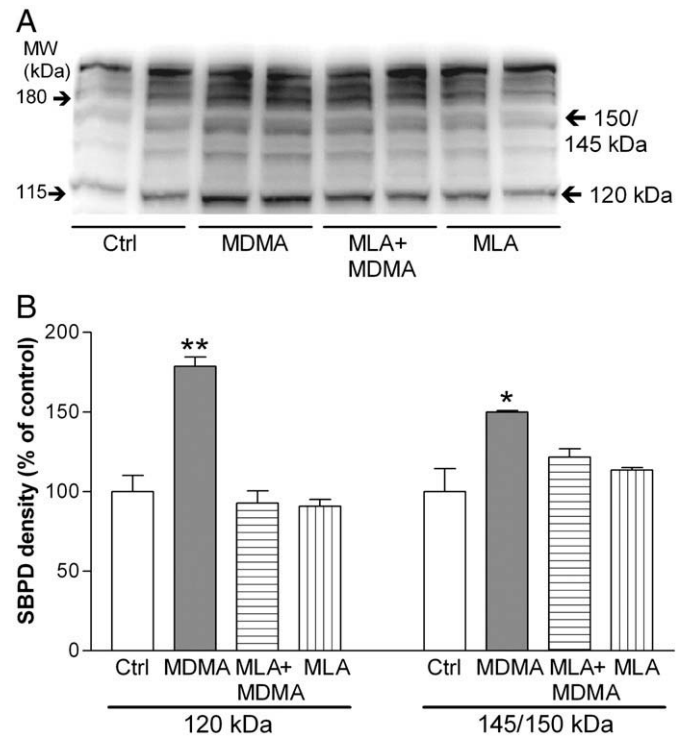


Fig. 6. (A) Representative Western blot of α-spectrin breakdown products (SBDP) originated by calpain activation (145 and 150 kDa) and caspase 3 (120 and 150 kDa) after 24-h treatment with culture medium (Ctrl), MDMA (50 μM), MDMA + MLA (10 nM), and MLA alone. The localization of the molecular weight (MW) markers is shown on the left of the picture. (B) Quantification of dot intensity of the SBDPs. Data are the means ± SEM of three different cultures, loaded in duplicates. **P*<0.05 and ***P*<0.001 vs. control.

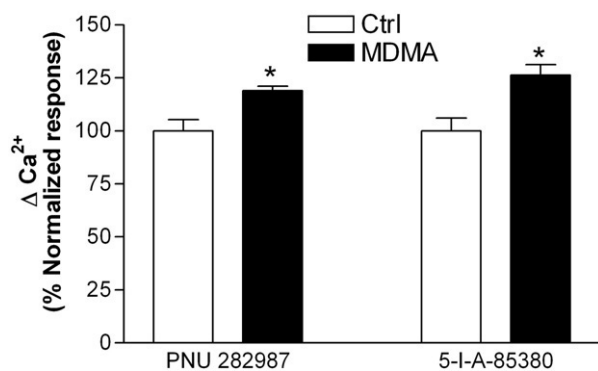


Fig. 7. Effect of 24-h preincubation with MDMA (50 μM) on the response induced by selective nAChR agonists PNU 282987 ($\alpha 7$, 0.1 μM) and 5-I-A-85380 ($\beta 2$ -containing nAChRs, 15 μM). After preincubation, the cells were washed, loaded with Fluo-4 and the increases in fluorescence after the addition of the agonists were monitored. Values were normalized to the response from cells treated with vehicle (control) and are the means of three different experiments \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. control.

and cannot be measured in oocytes. In cells, $\alpha 7$ subunits can also associate other subunits to build heteromeric nAChR, but this occurs rarely. In fact, Drisdell and Green (2000) demonstrated that α -BgTx binding sites in PC12 cells are $\alpha 7$ homomers.

The fact that MDMA induced an increase in cytosolic Ca^{2+} led us to study the pathways involved using specific blockers. According to our previous work, the $\alpha 7$ nAChR blockers MLA and α -BgTx abolished the effect of MDMA, which showed that such effects take place mainly through activation of these receptors. However, as we had previously described that MDMA also has affinity for heteromeric receptors (Garcia-Rates et al., 2007; Chipana et al., 2008b), we tested the effect of DH β E, an antagonist of these receptors. These receptors are permeant to Na^+ , which could induce depolarization and open VOCCs. This coupling mechanism was described by Dajas-Bailador and Wonnacott (2004). At 1 μM , a concentration that ensures selectivity on nAChRs containing the $\beta 2$ subunit (Alkondon and Albuquerque, 1993), DH β E had no significant effect on MDMA-induced response, ruling out an agonistic effect on these receptors. This finding, together with the previously reported binding affinity and the inhibition of currents through $\alpha 4\beta 2$ receptors in oocytes, suggests that MDMA behaves as an antagonist at heteromeric receptors while it is a partial agonist at $\alpha 7$ nAChRs. In fact, at the concentrations employed of ACh and nicotine in the inhibition curves (100 μM), it can be supposed that there is a predominant effect on heteromeric receptors because at this concentration the EC_{50} for the $\alpha 7$ type is hardly reached while it is supramaximal at $\alpha 4\beta 2$ receptors (Gopalakrishnan et al., 1995). Moreover, it must be noticed that the IC_{50} value for MDMA in $\alpha 4\beta 2$ -transfected oocytes is practically the same as that obtained in the inhibition of ACh responses in PC12 cells.

Also, we tested the L-type VOCC inhibitor nitrendipine. L-type channels have been reported to be the most prevalent VOCC in PC12 cells (Plummer et al., 1989), which is why we used nitrendipine. Nitrendipine, at a concentration of 0.3 μM , inhibited the MDMA response by 30%, while at a concentration of 30 μM , such inhibition was doubled. This result must be taken with caution because L-type VOCC blockers have been found to block nAChR currents at the most commonly used concentrations (Donnellyroberts et al., 1995). For this reason, we tested Cd^{2+} , a nonselective blocker of VOCC that does not inhibit ion flux through nAChRs (Trousard et al., 1993), and found that it inhibited MDMA-induced Ca^{2+} increase to a similar extent that 0.3 μM nitrendipine. This result suggests that, in our model, the initial depolarization induced after $\alpha 7$ receptor activation by MDMA, partially couples to L-type channel opening.

Calcium-induced calcium release (CICR) from endoplasmic reticulum (ER) stores has been shown to be coupled to $\alpha 7$ nAChR activation (Dajas-Bailador and Wonnacott, 2004; Dickinson et al., 2007). CICR

could occur after activation of two intracellular calcium release channels localized in the ER: IP_3 receptors and ryanodine receptors (Ehrlich et al., 1994; Rizzuto, 2001). Accordingly, we tested two blockers of these receptors (2-APB and dantrolene, respectively) with MDMA. We found that the MDMA effect was significantly inhibited by these blockers, which demonstrates the participation CICR. In fact, these blockers had also been effective in preventing MDMA-induced ROS generation in striatal synaptosomes (Chipana et al., 2008a). However, 2-APB has been reported to have effects on other Ca^{2+} -signaling pathways, mainly inhibiting store-operated Ca^{2+} influx (reviewed by Bootman et al., 2002) that is activated when Ca^{2+} has been released from ER. Therefore, we cannot affirm that blockade by 2-APB takes place only at IP_3 receptors, but the participation of CICR is anyway confirmed.

The MDMA response was dependent on extracellular Ca^{2+} , as suppression of this cation totally inhibited its effect. Extracellular Ca^{2+} could enter through either $\alpha 7$ channels or L-type VOCCs and, as stated above, this Ca^{2+} increase would also induce subsequent CICR.

Although mechanisms other than nAChR activation cannot be totally ruled out in the MDMA-induced increase in cytosolic Ca^{2+} , the practically complete inhibition by MLA and α -BgTx indicates that $\alpha 7$ nAChR activation plays a major role in this process. Also, as it will be discussed below, the long-lasting increase in Ca^{2+} basal levels indicates that $\alpha 7$ nAChR activation by MDMA induces a more prolonged increase of this cation than that induced by specific nicotinic agonists. This could induce a robust increase in cytosolic Ca^{2+} that may lead to Ca^{2+} dysregulation and activation of cytotoxic pathways, such as calpain and caspase 3, or affect mitochondria Ca^{2+} buffering capacity (Rizzuto, 2001).

Preincubation with MDMA for 24 h induced an increase in basal cytosolic Ca^{2+} levels, as measured after drug washout. Surprisingly, preincubation with nicotine increased basal levels when it was carried out for 1 h, but not after longer preincubation times. This indicates that cells are able to buffer sustained activation by nicotine, but not that induced by MDMA, which suggests increased vulnerability to this drug.

Sustained Ca^{2+} influx after MDMA could favor cytotoxicity through activation of Ca^{2+} -dependent pathways (i.e., calpain). Calpain is a calcium-dependent protease whose activation is a primary mechanism that contributes to several types of neurodegenerative conditions, including the excitatory amino acid-induced neurotoxicity that is associated with traumatic brain injury, ischemia, and hyperthermia (Pike et al., 1998; Buki et al., 1999). Calpain specifically degrades the cytoskeletal membrane protein, spectrin, into 145 and 150 kDa breakdown products (Harris and Morrow, 1988). Caspase 3 is another cysteine protease that is involved in apoptotic pathways. It also degrades spectrin but produces a 120 kDa spectrin fragment (Wang, 2000) and also can produce a 150-kDa fragment (Zhang et al., 2009). Incubation of PC12 cells with MDMA for 24 h induced a significant increase in SBDPs of 145 and 150 kDa, which indicates calpain activation, and a rise in the 120 kDa band that, together with the increase in the 150 kDa SBDP, points to caspase 3 activation. In fact, in a previous work using cerebellar granule cells, we demonstrated the proapoptotic role of caspase 3 in the neurotoxic effects of amphetamines (Jimenez et al., 2004).

Spectrin proteolysis has been reported *in vivo* after treatment with the amphetamine derivative methamphetamine (MA) (Staszewski and Yamamoto, 2006) and was attributed to a MA-induced excitotoxic response, mediated by glutamate AMPA-receptors (but not NMDA receptors). Moreover, the increases in SBDPs induced by MDMA were prevented by MLA, indicating that $\alpha 7$ nAChRs play a key role in this process. Although *in vivo* participation of glutamate receptors in amphetamine-induced neurotoxicity has been demonstrated and cannot be ruled out, here we provide an additional mechanism, as undifferentiated PC12 cells do not express functional AMPA receptors (Sudo et al., 1997). Scaling drug concentrations from *in vitro* to *in vivo* experiments is always controversial. Tumor-derived

cell lines, and therefore, could be more resistant to toxic insults than other cells and thus require higher concentrations of toxin are needed. Here we used 50 μM MDMA to obtain a robust response in 24 h, which allows sufficient margin for measurable inhibition, but it must be pointed out that, as can be seen in the concentration–effect curve, the calcium increase is already induced at concentrations around 1 μM , and low micromolar concentrations are achieved in brain after administration of amphetamines (Kitaichi et al., 2003; Johnson et al. 2004). In addition, such concentrations are compatible with those reported to interact with the serotonin transporter, the main target of MDMA ($K_i = 0.61 \mu\text{M}$, Battaglia et al., 1988).

Our results contrast with the compelling evidence that nicotine, rather than nAChR antagonists, is neuroprotective (reviewed by Pauly et al., 2004 and Mudo et al., 2007). However, nicotine can be toxic under some circumstances or potentiate the neurotoxicity induced by other agents (Pauly et al., 2004; Messi et al., 1997). The results of the present work suggest that MDMA induces increase in cytosolic Ca^{2+} mainly through $\alpha 7$ nAChR and that this would enhance neurotoxicity, as calpain/caspase activation indicates. Moreover, here we demonstrate that MDMA inhibits heteromeric nAChRs activation, which have been reported to be the main responsible for nicotine neuroprotective effects. Therefore, MDMA would on the one hand inhibit neuroprotective inputs and on the other hand induce cytotoxicity through Ca^{2+} raise. This, together with MDMA-induced displacement of vesicular monoamines and further cytosolic oxidation, would account for its cytotoxic effects.

After chronic nicotine exposure, some nAChR subtypes undergo radioligand binding upregulation, changes in stoichiometry, and an increase in functional state (functional upregulation) (reviewed by Gaimarri et al., 2007). Such upregulation occurs at a post-transcriptional level and has been reported in cell cultures for $\alpha 4\beta 2$ nAChRs (Gopalakrishnan et al., 1997; Nashmi and Lester, 2007) as well as for $\alpha 7$ nAChRs (Kawai and Berg, 2001). For this reason, we measured cytosolic Ca^{2+} levels to test whether pretreatment with MDMA induced persistent changes in nAChRs, leading to an increased response to agonists. Our experiments showed that, when incubated for 24 h with MDMA, PC12 cells exhibited increased responses to PNU 282987 ($\alpha 7$ -selective) and to 5-I-A-85380 (selective for $\beta 2$ subunit-containing receptors), measured after drug washout. This indicates that MDMA also induces functional nAChR upregulation. The mechanism by which nicotinic ligands induce nAChR upregulation is complex and is still under investigation. However, the work done to date indicates that upregulation can occur if the drug has a particular affinity to one or more nAChR subunits; regardless of the agonist/antagonist properties of the drug (i.e., the antagonist DH β E is also able to induce it, Gopalakrishnan et al., 1997). In addition, upregulation is enhanced when the drug crosses the cell membrane to interact with immature forms of the receptor (Nashmi and Lester, 2007). The affinity of MDMA towards both heteromeric and $\alpha 7$ nAChRs has been demonstrated (Garcia-Rates et al., 2007), and this drug can reach the cytoplasm after transport through the dopamine transporter (Metzger et al., 1998; Hansen et al., 2002), which is abundant in PC12 cells. Therefore, the interaction of MDMA with immature receptor subunits is feasible. *In silico* docking experiments are to be performed to find out where in the complex nAChR structure MDMA can bind.

$\alpha 7$ nAChRs play an important role in dependence on nicotine and other drugs (Nomikos et al., 2000). It has been noticed that MDMA users are more likely to take other drugs than non-users (Rodgers, 2000). Psychostimulant drugs such as amphetamines and cocaine share the ability to induce behavioral and neurochemical sensitization that contribute to their addictive potential. It has been demonstrated that activation of nAChRs plays a predominant role in such sensitization (Schoffelmeer et al., 2002), when $\alpha 7$ and $\beta 2$ subunit-containing nAChRs are involved (Zanetti et al., 2006). Therefore, direct and persistent activation of $\alpha 7$ receptors by MDMA might contribute to its reinforcing effects.

To sum up, MDMA activates homomeric $\alpha 7$ nAChR and induces an increase in cytosolic Ca^{2+} . Such an increase is maintained and can activate Ca^{2+} -dependent pathways such as calpain and caspase 3, which are involved in neurotoxicity. In addition, sustained $\alpha 7$ nAChR activation could be responsible for neurochemical changes that result in the psychiatric disorders related with chronic MDMA abuse. Also, MDMA blocks activation of heteromeric nAChRs, which would also contribute to its neurotoxic effects. This work describes and demonstrates a new mechanism of action for MDMA, which was proposed in our previous publications.

Conflict of interest statement

The authors disclose that they had no financial, personal, or other relationships with people or organizations in 3 years from the start of the research that could have inappropriately influenced this article.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. J. Serratosa (Department of Neurochemistry, Pharmacology and Toxicology, CSIC-IDIBAPS, Barcelona, Spain) for generously providing PC12 cells. We also thank the Language Services of the University of Barcelona for revising the text of this article. We acknowledge Drs. M. Amat, J. Bosch, and N. Llor from the Organic Chemistry Unit for the spectral analysis of MDMA to demonstrate its chemical purity and Maria Olivas for technical assistance.

We thank Professor Jon Lindstrom (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) for kindly providing the cDNAs for human brain nAChR subunits. This work was supported by grants from the Plan Nacional sobre Drogas (2008, to D.P.), the Generalitat de Catalunya (2005SGR00793, to D.P.), the Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2006-01456, to E.E.), the Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2007-65181 to L.G.), and the Fundación Mutua Madrileña (to L.G.).

References

- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F., Alkondon, M., Rogers, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89, 73–120.
- Alkondon, M., Albuquerque, E.X., 1993. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I: pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 265, 1455–1473.
- Battaglia, G., Brooks, B.P., Kulsakdinun, C., De Souza, E.B., 1988. Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur. J. Pharmacol.* 149, 159–163.
- Blumenthal, E.M., Conroy, W.G., Romano, S.J., Kassner, P.D., Berg, D.K., 1997. Detection of functional nicotinic receptors blocked by alpha-bungarotoxin on PC12 cells and dependence of their expression on post-translational events. *J. Neurosci.* 17, 6094–6104.
- Bodnar, A.L., Cortes-Burgos, L.A., Cook, K.K., Dinh, D.M., Groppi, V.E., Hajos, M., Higdon, N.R., Hoffmann, W.E., Hurst, R.S., Myers, J.K., Rogers, B.N., Wall, T.M., Wolfe, M.L., Wong, E., 2005. Discovery and structure–activity relationship of quinuclidine benzamides as agonists of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J. Med. Chem.* 48, 905–908.
- Bootman, M.D., Collins, T.J., Mackenzie, L., Roderick, H.L., Berridge, M.J., Peppiatt, C.M., 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced Ca^{2+} release. *FASEB J.* 16, 1145–1150.
- Buki, A., Koizumi, H., Povlishock, J.T., 1999. Moderate posttraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury. *Exp. Neurol.* 159, 319–328.
- Camarasa, J., Marimon, J.M., Rodrigo, T., Escubedo, E., Pubill, D., 2008. Memantine prevents the cognitive impairment induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 132–139.
- Campos-Caro, A., Smillie, F.I., Dominguez del, T.E., Rovira, J.C., Vicente-Agullo, F., Chapuli, J., Juiz, J.M., Sala, S., Sala, F., Ballesta, J.J., Criado, M., 1997. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J. Neurochem.* 68, 488–497.
- Chipana, C., Camarasa, J., Pubill, D., Escubedo, E., 2006. Protection against MDMA-induced dopaminergic neurotoxicity in mice by methyllycaconitine: involvement of nicotinic receptors. *Neuropharmacology* 51, 885–895.
- Chipana, C., Garcia-Rates, S., Camarasa, J., Pubill, D., Escubedo, E., 2008a. Different oxidative profile and nicotinic receptor interaction of amphetamine and 3,4-methylenedioxy-methamphetamine. *Neurochem. Int.* 52, 401–410.
- Chipana, C., Camarasa, J., Pubill, D., Escubedo, E., 2008b. Memantine prevents MDMA-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* 29, 179–183.

- Chipana, C., Torres, I., Camarasa, J., Pubill, D., Escubedo, E., 2008c. Memantine protects against amphetamine derivatives-induced neurotoxic damage in rodents. *Neuropharmacology* 54, 1254–1263.
- Criado, M., Mulet, J., Bernal, J.A., Gerber, S., Sala, S., Sala, F., 2005. Mutations of a conserved lysine residue in the N-terminal domain of $\alpha 7$ nicotinic receptors affect gating and binding of nicotinic agonists. *Mol. Pharmacol.* 68, 1669–1677.
- Dajas-Bailador, F., Wonnacott, S., 2004. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 317–324.
- Demiryurek, A.T., Cakici, I., Kanzik, I., 1998. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol. Toxicol.* 82, 113–117.
- Deng, X., Cadet, J.L., 1999. Methamphetamine administration causes overexpression of nNOS in the mouse striatum. *Brain Res.* 851, 254–257.
- Dickinson, J.A., Hanrott, K.E., Mok, M.H., Kew, J.N., Wonnacott, S., 2007. Differential coupling of $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells. *J. Neurochem.* 100, 1089–1096.
- Donnellyroberts, D.L., Arneric, S.P., Sullivan, J.P., 1995. Functional modulation of human "ganglionic-like" neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) by L-type calcium-channel antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 213, 657–662.
- Drisdell, R.C., Green, W.N., 2000. Neuronal α -bungarotoxin receptors are $\alpha 7$ subunit homomers. *J. Neurosci.* 20, 133–139.
- Ehrlich, B.E., Kaftan, E., Bezprozvannaya, S., Bezprozvanny, I., 1994. The pharmacology of intracellular Ca^{2+} -release channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 145–149.
- Escubedo, E., Chipana, C., Perez-Sanchez, M., Camarasa, J., Pubill, D., 2005. Methyllycaconitine prevents methamphetamine-induced effects in mouse striatum: involvement of $\alpha 7$ nicotinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 315, 658–667.
- Fornai, F., Lenzi, P., Gesi, M., Soldani, P., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Capobianco, L., Battaglia, G., de Blasi, A., Nicoletti, F., Paparelli, A., 2004. Methamphetamine produces neuronal inclusions in the nigrostriatal system and in PC12 cells. *J. Neurochem.* 88, 114–123.
- Fucile, S., 2004. Ca^{2+} permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35, 1–8.
- Gaimarri, A., Moretti, M., Riganti, L., Zanardi, A., Clementi, F., Gotti, C., 2007. Regulation of neuronal nicotinic receptor traffic and expression. *Brain Res. Rev.* 55, 134–143.
- Garcia-Rates, S., Camarasa, J., Escubedo, E., Pubill, D., 2007. Methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine interact with central nicotinic receptors and induce their up-regulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 223, 195–205.
- Gopalakrishnan, M., Buisson, B., Touma, E., Giordano, T., Campbell, J.E., Hu, I.C., Donnelly-Roberts, D., Arneric, S.P., Bertrand, D., Sullivan, J.P., 1995. Stable expression and pharmacological properties of the human $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 290, 237–246.
- Gopalakrishnan, M., Molinari, E., Sullivan, J.P., 1997. Regulation of human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Mol. Pharmacol.* 52, 524–534.
- Gotti, C., Moretti, M., Gaimarri, A., Zanardi, A., Clementi, F., Zoli, M., 2007. Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochem. Pharmacol.* 74, 1102–1111.
- Hansen, J.P., Riddle, E.L., Sandoval, V., Brown, J.M., Gibb, J.W., Hanson, G.R., Fleckenstein, A.E., 2002. Methylenedioxymethamphetamine decreases plasmalemmal and vesicular dopamine transport: mechanisms and implications for neurotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 1093–1100.
- Harris, A.S., Morrow, J.S., 1988. Proteolytic processing of human brain alpha spectrin (fodrin): identification of a hypersensitive site. *J. Neurosci.* 8, 2640–2651.
- Henderson, L.P., Gdovin, M.J., Liu, C., Gardner, P.D., Maue, R.A., 1994. Nerve growth factor increases nicotinic ACh receptor gene expression and current density in wild-type and protein kinase A-deficient PC12 cells. *J. Neurosci.* 14, 1153–1163.
- Hurst, R.S., Hajos, M., Raggenbass, M., Wall, T.M., Higdon, N.R., Lawson, J.A., Rutherford-Root, K.L., Berkenpas, M.B., Hoffmann, W.E., Piotrowski, D.W., Groppi, V.E., Allaman, G., Ogier, R., Bertrand, S., Bertrand, D., Arneric, S.P., 2005. A novel positive allosteric modulator of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor: in vitro and in vivo characterization. *J. Neurosci.* 25, 4396–4405.
- Imam, S.Z., Newport, G.D., Duhart, H.M., Islam, F., Slikker Jr., W., Ali, S.F., 2002. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity and production of peroxynitrite are potentiated in nerve growth factor differentiated pheochromocytoma 12 cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 965, 204–213.
- Jatzke, C., Watanabe, J., Wollmuth, L.P., 2002. Voltage and concentration dependence of Ca^{2+} permeability in recombinant glutamate receptor subtypes. *J. Physiol.* 538, 25–39.
- Jimenez, A., Jorda, E.G., Verdague, E., Pubill, D., Sureda, F.X., Canudas, A.M., Escubedo, E., Camarasa, J., Camins, A., Pallas, M., 2004. Neurotoxicity of amphetamine derivatives is mediated by caspase pathway activation in rat cerebellar granule cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 223–234.
- Johnson, E.A., O'Callaghan, J.P., Miller, D.B., 2004. Brain concentrations of d-MDMA are increased after stress. *Psychopharmacology (Berl)* 173, 278–286.
- Jonnala, R.R., Buccafusco, J.J., 2001. Relationship between the increased cell surface $\alpha 7$ nicotinic receptor expression and neuroprotection induced by several nicotinic receptor agonists. *J. Neurosci. Res.* 66, 565–572.
- Kawai, H., Berg, D.K., 2001. Nicotinic acetylcholine receptors containing $\alpha 7$ subunits on rat cortical neurons do not undergo long-lasting inactivation even when up-regulated by chronic nicotine exposure. *J. Neurochem.* 78, 1367–1378.
- Kitaiichi, K., Morishita, Y., Doi, Y., Ueyama, J., Matsushima, M., Zhao, Y.L., Takagi, K., Hasegawa, T., 2003. Increased plasma concentration and brain penetration of methamphetamine in behaviorally sensitized rats. *Eur. J. Pharmacol.* 464, 39–48.
- Kramer, H.K., Poblete, J.C., Azmitia, E.C., 1997. Activation of protein kinase C (PKC) by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) occurs through the stimulation of serotonin receptors and transporter. *Neuropsychopharmacology* 17, 117–129.
- Lyles, J., Cadet, J.L., 2003. Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) neurotoxicity: cellular and molecular mechanisms. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42, 155–168.
- Madhok, T.C., Matta, S.G., Sharp, B.M., 1995. Nicotine regulates nicotinic cholinergic receptors and subunit mRNAs in PC 12 cells through protein kinase A. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 32, 143–150.
- McCann, U.D., Szabo, Z., Vranesic, M., Palermo, M., Mathews, W.B., Ravert, H.T., Dannels, R.F., Ricaurte, G.A., 2008. Positron emission tomographic studies of brain dopamine and serotonin transporters in abstinent (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") users: relationship to cognitive performance. *Psychopharmacology (Berl.)* 200, 439–450.
- Messi, M.L., Renganathan, M., Grigorenko, E., Delbono, O., 1997. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor promotes survival of spinal cord motoneurons. *FEBS Lett.* 411, 32–38.
- Metzger, R.R., Hanson, G.R., Gibb, J.W., Fleckenstein, A.E., 1998. 3,4-Methylenedioxy-methamphetamine-induced acute changes in dopamine transporter function. *Eur. J. Pharmacol.* 349, 205–210.
- Mogg, A.J., Jones, F.A., Pullar, I.A., Sharples, C.G., Wonnacott, S., 2004. Functional responses and subunit composition of presynaptic nicotinic receptor subtypes explored using the novel agonist 5-iodo-A-85380. *Neuropharmacology* 47, 848–859.
- Mudo, G., Belluardo, N., Fuxe, K., 2007. Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. Progress in molecular mechanisms. *J. Neural Transm.* 114, 135–147.
- Nashmi, R., Lester, H., 2007. Cell autonomy, receptor autonomy, and thermodynamics in nicotine receptor up-regulation. *Biochem. Pharmacol.* 74, 1145–1154.
- Nomikos, G.G., Schilström, B., Hildebrand, B.E., Panagis, G., Grenhoff, J., Svensson, T.H., 2000. Role of $\alpha 7$ nicotinic receptors in nicotine dependence and implications for psychiatric illness. *Behav. Brain Res.* 113, 97–103.
- Park, S.U., Ferrer, J.V., Javitch, J.A., Kuhn, D.M., 2002. Peroxynitrite inactivates the human dopamine transporter by modification of cysteine 342: potential mechanism of neurotoxicity in dopamine neurons. *J. Neurosci.* 22, 4399–4405.
- Parrott, A.C., Lees, A., Garnham, N.J., Jones, M., Wesnes, K., 1998. Cognitive performance in recreational users of MDMA of 'ecstasy': evidence for memory deficits. *J. Psychopharmacol.* 12, 79–83.
- Pauly, J.R., Charriez, C.M., Guseva, M.V., Scheff, S.W., 2004. Nicotinic receptor modulation for neuroprotection and enhancement of functional recovery following brain injury or disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1035, 316–334.
- Pike, B.R., Zhao, X., Newcomb, J.K., Posmantur, R.M., Wang, K.K., Hayes, R.L., 1998. Regional calpain and caspase-3 proteolysis of α -spectrin after traumatic brain injury. *NeuroReport* 9, 2437–2442.
- Plummer, M.R., Logothetis, D.E., Hess, P., 1989. Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* 2, 1453–1463.
- Pubill, D., Chipana, C., Camins, A., Pallas, M., Camarasa, J., Escubedo, E., 2005. Free radical production induced by methamphetamine in rat striatal synaptosomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 57–68.
- Quednow, B.B., Jessen, F., Kuhn, K.U., Maier, W., Daum, I., Wagner, M., 2006. Memory deficits in abstinent MDMA (ecstasy) users: neuropsychological evidence of frontal dysfunction. *J. Psychopharmacol.* 20, 373–384.
- Reneman, L., Endert, E., de Bruin, K., Lavalaye, J., Feenstra, M.G., de Wolff, F.A., Booij, J., 2002. The acute and chronic effects of MDMA ("ecstasy") on cortical 5-HT_{2A} receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology* 26, 387–396.
- Rizzuto, R., 2001. Intracellular Ca^{2+} pools in neuronal signalling. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 306–311.
- Rodgers, J., 2000. Cognitive performance amongst recreational users of "ecstasy". *Psychopharmacology (Berl)* 151, 19–24.
- Sands, S.B., Costa, A.C., Patrick, J.W., 1993. Barium permeability of neuronal nicotinic receptor $\alpha 7$ expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J.* 65, 2614–2621.
- Schoffmeier, A.N., de Vries, T.J., Wardeh, G., van de Ven, H.V., Vanderschuren, L.J., 2002. Psychostimulant-induced behavioral sensitization depends on nicotinic receptor activation. *J. Neurosci.* 22, 3269–3276.
- Staszewski, R.D., Yamamoto, B.K., 2006. Methamphetamine-induced spectrin proteolysis in the rat striatum. *J. Neurochem.* 96, 1267–1276.
- Sudo, M., Tsuzuki, K., Okado, H., Miwa, A., Ozawa, S., 1997. Adenovirus-mediated expression of AMPA-type glutamate receptor channels in PC12 cells. *Brain Res.* 75, 91–99.
- Takahashi, T., Yamashita, H., Nakamura, S., Ishiguro, H., Nagatsu, T., Kawakami, H., 1999. Effects of nerve growth factor and nicotine on the expression of nicotinic acetylcholine receptor subunits in PC12 cells. *Neurosci. Res.* 35, 175–181.
- Trouslard, J., Marsh, S.J., Brown, D.A., 1993. Calcium entry through nicotinic receptor channels and calcium channels in cultured rat superior cervical ganglion cells. *J. Physiol.* 468, 53–71.
- Wang, K.K., 2000. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23, 20–26.
- Wei, Q., Jurma, O.P., Andersen, J.K., 1997. Increased expression of monoamine oxidase-B results in enhanced neurite degeneration in methamphetamine-treated PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 50, 618–626.
- Yamamoto, B.K., Raudensky, J., 2008. The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 3, 203–217.
- Zanetti, L., de Kerchove, D.E., Zanardi, A., Changeux, J.P., Picciotto, M.R., Zoli, M., 2006. Inhibition of both $\alpha 7^*$ and $\beta 2^*$ nicotinic acetylcholine receptors is necessary to prevent development of sensitization to cocaine-elicited increases in extracellular dopamine levels in the ventral striatum. *Psychopharmacology (Berl)* 187, 181–188.
- Zhang, Z., Larner, S.F., Liu, M.C., Zheng, W., Hayes, R.L., Wang, K.K., 2009. Multiple α -spectrin breakdown products distinguish calpain and caspase dominated necrotic and apoptotic cell death pathways. *Apoptosis* 14, 1289–1298.

Bibliografia

Accuas E, Pisanu A, Spiga S, Plumitallo A, Zernig G, Di CG (2007) Differential effects of intravenous R,S-(+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) and its S(+)- and R(-)-enantiomers on dopamine transmission and extracellular signal regulated kinase phosphorylation (pERK) in the rat nucleus accumbens shell and core. *J.Neurochem.* **102**, 121-132.

Araud T, Wonnacott S, Bertrand D (2010) Associated proteins: The universal toolbox controlling ligand gated ion channel function. *Biochem.Pharmacol.* **80**, 160-169.

Arias HR (1997) Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Res.Brain Res.Rev.* **25**, 133-191.

Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LV, Lopez de MA, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS, Lefranc G (1999) Calpain 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat.Med.* **5**, 503-511.

Battaglia G, Brooks BP, Kulsakdinun C, De Souza EB (1988) Pharmacologic profile of MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) at various brain recognition sites. *Eur.J.Pharmacol.* **149**, 159-163.

Battaglia G, De Souza EB (1989) Pharmacologic profile of amphetamine derivatives at various brain recognition sites: selective effects on serotonergic systems. *NIDA Res.Monogr* **94**, 240-258.

Bencherif M, Fowler K, Lukas RJ, Lippiello PM (1995) Mechanisms of up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in clonal cell lines and primary cultures of fetal rat brain. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **275**, 987-994.

Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mossner R, Westphal H, Lesch KP (1998) Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol.Pharmacol.* **53**, 649-655.

Besson M, Granon S, Mameli-Engvall M, Cloez-Tayarani I, Maubourguet N, Cormier A, Cazala P, David V, Changeux JP, Faure P (2007) Long-term effects of chronic nicotine exposure on brain nicotinic receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **104**, 8155-8160.

Bianchi i Driscoll (2006) *Wormbook*.

Biniecki S, Moll M (1960) [Establishment of optimal parameters for the preparation of calcium gluconate by the electrolytic oxidation of D-glucose, also for the oxidation by potassium chlorate]. *Ann.Pharm.Fr.* **18**, 295-308.

Blumenthal EM, Conroy WG, Romano SJ, Kassner PD, Berg DK (1997) Detection of functional nicotinic receptors blocked by alpha-bungarotoxin on PC12 cells and dependence of their expression on post-translational events. *J.Neurosci.* **17**, 6094-6104.

Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le PC, Changeux JP, Delarue M, Corringer PJ (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* **457**, 111-114.

Bond CE, Zimmermann M, Greenfield SA (2009) Upregulation of alpha7 Nicotinic Receptors by Acetylcholinesterase C-Terminal Peptides. *PLoS.One.* **4**, e4846.

Bowyer JF, Davies DL, Schmued L, Broening HW, Newport GD, Slikker W, Jr., Holson RR (1994) Further studies of the role of hyperthermia in methamphetamine neurotoxicity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **268**, 1571-1580.

Bowyer JF, Ali S (2006) High doses of methamphetamine that cause disruption of the blood-brain barrier in limbic regions produce extensive neuronal degeneration in mouse hippocampus. *Synapse* **60**, 521-532.

Buisson B, Vallejo YF, Green WN, Bertrand D (2000) The unusual nature of epibatidine responses at the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropharmacology* **39**, 2561-2569.

Buisson B, Bertrand D (2001) Chronic exposure to nicotine upregulates the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor function. *J.Neurosci.* **21**, 1819-1829.

Buisson B, Bertrand D (2002) Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol.Sci.* **23**, 130-136.

Burrows KB, Gudelsky G, Yamamoto BK (2000) Rapid and transient inhibition of mitochondrial function following methamphetamine or 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration. *Eur.J.Pharmacol.* **398**, 11-18.

Cadet JL, Ali SF, Rothman RB, Epstein CJ (1995) Neurotoxicity, drugs and abuse, and the CuZn-superoxide dismutase transgenic mice. *Mol.Neurobiol.* **11**, 155-163.

Cadet JL, Krasnova IN, Jayanthi S, Lyles J (2007) Neurotoxicity of substituted amphetamines: molecular and cellular mechanisms. *Neurotox.Res.* **11**, 183-202.

Campos-Caro A, Smillie FI, Dominguez del TE, Rovira JC, Vicente-Agullo F, Chapuli J, Juiz JM, Sala S, Sala F, Ballesta JJ, Criado M (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors on bovine chromaffin cells: cloning, expression, and genomic organization of receptor subunits. *J.Neurochem.* **68**, 488-497.

Carlsson A, Falck B, Hillarp NA, Thieme G, Torp A (1961) A new histochemical method for visualization of tissue catechol amines. *Med.Exp.Int.J.Exp.Med.* **4**, 123-125.

Carvalho M, Carvalho F, Bastos ML (2001) Is hyperthermia the triggering factor for hepatotoxicity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy)? An in vitro study using freshly isolated mouse hepatocytes. *Arch.Toxicol.* **74**, 789-793.

Celie PH, Kasheverov IE, Mordvintsev DY, Hogg RC, van NP, van ER, van Rossum-Fikkert SE, Zhmak MN, Bertrand D, Tsetlin V, Sixma TK, Smit AB (2005) Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant. *Nat.Struct.Mol.Biol.* **12**, 582-588.

Chan J, Quik M (1993) A role for the nicotinic alpha-bungarotoxin receptor in neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience* **56**, 441-451.

Changeux JP, Edelstein SJ (2005) Allosteric mechanisms of signal transduction. *Science* **308**, 1424-1428.

Changeux JP (2010) Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat.Rev.Neurosci.* **11**, 389-401.

Charpantier E, Wiesner A, Huh KH, Ogier R, Hoda JC, Allaman G, Raggenbass M, Feuerbach D, Bertrand D, Fuhrer C (2005) Alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors are negatively regulated by tyrosine phosphorylation and Src-family kinases. *J.Neurosci.* **25**, 9836-9849.

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

Chipana C, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E (2008) Memantine prevents MDMA-induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* **29**, 179-183.

Chipana C, Torres I, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E (2008) Memantine protects against amphetamine derivatives-induced neurotoxic damage in rodents. *Neuropharmacology* **54**, 1254-1263.

Cho CH, Song W, Leitzell K, Teo E, Meleth AD, Quick MW, Lester RA (2005) Rapid upregulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors by tyrosine dephosphorylation. *J.Neurosci.* **25**, 3712-3723.

Christianson JC, Green WN (2004) Regulation of nicotinic receptor expression by the ubiquitin-proteasome system. *EMBO J.* **23**, 4156-4165.

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

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.

Cole JC, Sumnall HR (2003) The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Neurosci.Biobehav.Rev.* **27**, 199-217.

Coupland RE (1965) Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. *J.Anat.* **99**, 231-254.

Court JA, Martin-Ruiz C, Graham A, Perry E (2000) Nicotinic receptors in human brain: topography and pathology. *J.Chem.Neuroanat.* **20**, 281-298.

Covernton PJ, Connolly JG (1997) Differential modulation of rat neuronal nicotinic receptor subtypes by acute application of ethanol. *Br.J.Pharmacol.* **122**, 1661-1668.

Crawshaw LI (1973) Effect of intracranial acetylcholine injection on thermoregulatory responses in the rat. *J.Comp Physiol Psychol.* **83**, 32-35.

Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J.Cell Biol.* **158**, 507-517.

Crespi D, Mennini T, Gobbi M (1997) Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine. *Br.J.Pharmacol.* **121**, 1735-1743.

Criado M, Mulet J, Bernal JA, Gerber S, Sala S, Sala F (2005) Mutations of a conserved lysine residue in the N-terminal domain of alpha7 nicotinic receptors affect gating and binding of nicotinic agonists. *Mol.Pharmacol.* **68**, 1669-1677.

Cubells JF, Rayport S, Rajendran G, Sulzer D (1994) Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J.Neurosci.* **14**, 2260-2271.

Dajas-Bailador F, Wonnacott S (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol.Sci.* **25**, 317-324.

Darsow T, Booker TK, Pina-Crespo JC, Heinemann SF (2005) Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.* **280**, 18311-18320.

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.

Davies AR, Hardick DJ, Blagbrough IS, Potter BV, Wolstenholme AJ, Wonnacott S (1999) Characterisation of the binding of [3H]methyllycaconitine: a new radioligand for labelling alpha 7-type neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* **38**, 679-690.

De la TR, Farre M (2004) Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol.Sci.* **25**, 505-508.

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**, 682-697.

Demiryurek AT, Cakici I, Kanzik I (1998) Peroxynitrite: a putative cytotoxin. *Pharmacol.Toxicol.* **82**, 113-117.

Deng X, Cadet JL (1999) Methamphetamine administration causes overexpression of nNOS in the mouse striatum. *Brain Res.* **851**, 254-257.

Dickinson JA, Hanrott KE, Mok MH, Kew JN, Wonnacott S (2007) Differential coupling of alpha7 and non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors to calcium-induced calcium release and voltage-operated calcium channels in PC12 cells. *J.Neurochem.* **100**, 1089-1096.

Donnelly-Roberts DL, Arneric SP, Sullivan JP (1995) Functional modulation of human "ganglionic-like" neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) by L-type calcium channel antagonists. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **213**, 657-662.

Escubedo E, Chipana C, Perez-Sanchez M, Camarasa J, Pubill D (2005)

Methyllycaconitine prevents methamphetamine-induced effects in mouse striatum: involvement of alpha7 nicotinic receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **315**, 658-667.

Fantegrossi WE, Godlewski T, Karabenick RL, Stephens JM, Ullrich T, Rice KC, Woods JH

(2003) Pharmacological characterization of the effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("ecstasy") and its enantiomers on lethality, core temperature, and locomotor activity in singly housed and crowded mice. *Psychopharmacology (Berl)* **166**, 202-211.

Fantegrossi WE, Kiessel CL, De la GR, Woods JH (2005) Serotonin synthesis inhibition reveals distinct mechanisms of action for MDMA and its enantiomers in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* **181**, 529-536.

Fenster CP, Whitworth TL, Sheffield EB, Quick MW, Lester RA (1999) Upregulation of surface alpha4beta2 nicotinic receptors is initiated by receptor desensitization after chronic exposure to nicotine. *J.Neurosci.* **19**, 4804-4814.

Ficklin MB, Zhao S, Feng G (2005) Ubiquilin-1 regulates nicotine-induced up-regulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.* **280**, 34088-34095.

Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, Hanson GR (2007) New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **47**, 681-698.

Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ (1992) A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol.Pharmacol.* **41**, 31-37.

Fornai F, Lenzi P, Frenzilli G, Gesi M, Ferrucci M, Lazzeri G, Biagioni F, Nigro M, Falleni A, Giusiani M, Pellegrini A, Blandini F, Ruggieri S, Paparelli A (2004) DNA damage and ubiquitinated neuronal inclusions in the substantia nigra and striatum of mice following MDMA (ecstasy). *Psychopharmacology (Berl)* **173**, 353-363.

Freudenmann RW, Oxler F, Bernschneider-Reif S (2006) The origin of MDMA (ecstasy) revisited: the true story reconstructed from the original documents. *Addiction* **101**, 1241-1245.

Frith CH, Chang LW, Lattin DL, Walls RC, Hamm J, Doblin R (1987) Toxicity of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in the dog and the rat. *Fundam.Appl.Toxicol.* **9**, 110-119.

Gabbita SP, Scheff SW, Menard RM, Roberts K, Fugaccia I, Zemlan FP (2005)

Cleaved-tau: a biomarker of neuronal damage after traumatic brain injury. *J.Neurotrauma* **22**, 83-94.

Gaimarri A, Moretti M, Riganti L, Zanardi A, Clementi F, Gotti C (2007) Regulation of neuronal nicotinic receptor traffic and expression. *Brain Res.Rev.* **55**, 134-143.

Garcia-Ratés S, Camarasa J, Escubedo E, Pubill D (2007) Methamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine interact with central nicotinic receptors and induce their up-regulation. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **223**, 195-205.

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

Geffen LB, Livett BG (1971) Synaptic vesicles in sympathetic neurons. *Physiol Rev.* **51**, 98-157.

Goncalves J, Martins T, Ferreira R, Milhazes N, Borges F, Ribeiro CF, Malva JO, Macedo TR, Silva AP (2008) Methamphetamine-induced early increase of IL-6 and TNF-alpha mRNA expression in the mouse brain. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1139**, 103-111.

Goni-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernandez F (2007) N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J.Biol.Chem.* **282**, 22406-22413.

Goni-Oliver P, Avila J, Hernandez F (2009) Memantine inhibits calpain-mediated truncation of GSK-3 induced by NMDA: implications in Alzheimer's disease. *J.Alzheimers.Dis.* **18**, 843-848.

Gopalakrishnan M, Molinari EJ, Sullivan JP (1997) Regulation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors by cholinergic channel ligands and second messenger pathways. *Mol.Pharmacol.* **52**, 524-534.

Gotti C, Zoli M, Clementi F (2006) Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends Pharmacol.Sci.* **27**, 482-491.

Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, Moretti M, Pedrazzi P, Pucci L, Zoli M (2009) Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochem.Pharmacol.* **78**, 703-711.

Govind AP, Vezina P, Green WN (2009) Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochem.Pharmacol.* **78**, 756-765.

Green AR, Cross AJ, Goodwin GM (1995) Review of the pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or "Ecstasy"). *Psychopharmacology (Berl)* **119**, 247-260.

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.

Green WN, Ross AF, Claudio T (1991) cAMP stimulation of acetylcholine receptor expression is mediated through posttranslational mechanisms. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 854-858.

Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**, 2424-2428.

Grillo MA (1966) Electron microscopy of sympathetic tissues. *Pharmacol.Rev.* **18**, 387-399.

Gundersen CB, Miledi R, Parker I (1983) Voltage-operated channels induced by foreign messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **220**, 131-140.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G (1971) Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* **233**, 177-182.

Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR (1999) Tumor necrosis factor-alpha-inducible I κ B α proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation. *J.Biol.Chem.* **274**, 787-794.

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

Harkness PC, Millar NS (2002) Changes in conformation and subcellular distribution of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors revealed by chronic nicotine treatment and expression of subunit chimeras. *J.Neurosci.* **22**, 10172-10181.

Harris AS, Morrow JS (1988) Proteolytic processing of human brain alpha spectrin (fodrin): identification of a hypersensitive site. *J.Neurosci.* **8**, 2640-2651.

Haughey HM, Fleckenstein AE, Metzger RR, Hanson GR (2000) The effects of methamphetamine on serotonin transporter activity: role of dopamine and hyperthermia. *J.Neurochem.* **75**, 1608-1617.

Henderson LP, Gdovin MJ, Liu C, Gardner PD, Maue RA (1994) Nerve growth factor increases nicotinic ACh receptor gene expression and current density in wild-type and protein kinase A-deficient PC12 cells. *J.Neurosci.* **14**, 1153-1163.

Hilf RJ, Dutzler R (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **452**, 375-379.

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**, 269-275.

Holtzman E, Teichberg S, Abrahams SJ, Citkowitz E, Crain SM, Kawai N, Peterson ER (1973) Notes on synaptic vesicles and related structures, endoplasmic reticulum, lysosomes and peroxisomes in nervous tissue and the adrenal medulla. *J.Histochem.Cytochem.* **21**, 349-385.

Ihara M, Okajima T, Yamashita A, Oda T, Hirata K, Nishiwaki H, Morimoto T, Akamatsu M, Ashikawa Y, Kuroda S, Mega R, Kuramitsu S, Sattelle DB, Matsuda K (2008) Crystal structures of *Lymnaea stagnalis* AChBP in complex with neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin. *Invert.Neurosci.* **8**, 71-81.

Imam SZ, Crow JP, Newport GD, Islam F, Slikker W, Jr., Ali SF (1999) Methamphetamine generates peroxynitrite and produces dopaminergic neurotoxicity in mice: protective effects of peroxynitrite decomposition catalyst. *Brain Res.* **837**, 15-21.

Imam SZ, Ali SF (2000) Selenium, an antioxidant, attenuates methamphetamine-induced dopaminergic toxicity and peroxynitrite generation. *Brain Res.* **855**, 186-191.

Imam SZ, el-Yazal J, Newport GD, Itzhak Y, Cadet JL, Slikker W, Jr., Ali SF (2001) Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **939**, 366-380.

Imam SZ, Newport GD, Duhart HM, Islam F, Slikker W, Jr., Ali SF (2002) Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity and production of peroxynitrite are potentiated in nerve growth factor differentiated pheochromocytoma 12 cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **965**, 204-213.

Jayanthi S, Deng X, Noailles PA, Ladenheim B, Cadet JL (2004) Methamphetamine induces neuronal apoptosis via cross-talks between endoplasmic reticulum and mitochondria-dependent death cascades. *FASEB J.* **18**, 238-251.

Jeanclos EM, Lin L, Treuil MW, Rao J, DeCoster MA, Anand R (2001) The chaperone protein 14-3-3eta interacts with the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit. Evidence for a dynamic role in subunit stabilization. *J.Biol.Chem.* **276**, 28281-28290.

Johnson EA, O'Callaghan JP, Miller DB (2004) Brain concentrations of d-MDMA are increased after stress. *Psychopharmacology (Berl)* **173**, 278-286.

Kitaichi K, Morishita Y, Doi Y, Ueyama J, Matsushima M, Zhao YL, Takagi K, Hasegawa T (2003) Increased plasma concentration and brain penetration of methamphetamine in behaviorally sensitized rats. *Eur.J.Pharmacol.* **464**, 39-48.

Kiyatkin EA, Sharma HS (2009) Acute methamphetamine intoxication brain hyperthermia, blood-brain barrier, brain edema, and morphological cell abnormalities. *Int.Rev.Neurobiol.* **88**, 65-100.

Klesse LJ, Meyers KA, Marshall CJ, Parada LF (1999) Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells. *Oncogene* **18**, 2055-2068.

Konradsson-Geuken A, Gash CR, Alexander K, Pomerleau F, Huettl P, Gerhardt GA, Bruno JP (2009) Second-by-second analysis of alpha 7 nicotine receptor regulation of glutamate release in the prefrontal cortex of awake rats. *Synapse* **63**, 1069-1082.

Krasnova IN, Cadet JL (2009) Methamphetamine toxicity and messengers of death. *Brain Res.Rev.* **60**, 379-407.

Kuhn DM, Francescutti-Verbeem DM, Thomas DM (2006) Dopamine quinones activate microglia and induce a neurotoxic gene expression profile: relationship to methamphetamine-induced nerve ending damage. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1074**, 31-41.

Kuryatov A, Luo J, Cooper J, Lindstrom J (2005) Nicotine acts as a pharmacological chaperone to up-regulate human alpha4beta2 acetylcholine receptors. *Mol.Pharmacol.* **68**, 1839-1851.

Larsen KE, Fon EA, Hastings TG, Edwards RH, Sulzer D (2002)

Methamphetamine-induced degeneration of dopaminergic neurons involves autophagy and upregulation of dopamine synthesis. *J.Neurosci.* **22**, 8951-8960.

Lee MR (2011) The history of Ephedra (ma-huang). *J.R.Coll.Physicians Edinb.* **41**, 78-84.

Levi-Montalcini R, Cohen S (1956) In vitro and in vivo effects of a nerve growth-stimulating agent isolated from snake venom. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **42**, 695-699.

Leviel V (2001) The reverse transport of DA, what physiological significance? *Neurochem.Int.* **38**, 83-106.

Li Y, Papke RL, He YJ, Millard WJ, Meyer EM (1999) Characterization of the neuroprotective and toxic effects of alpha7 nicotinic receptor activation in PC12 cells. *Brain Res.* **830**, 218-225.

Li Y, King MA, Meyer EM (2000) alpha7 nicotinic receptor-mediated protection against ethanol-induced oxidative stress and cytotoxicity in PC12 cells. *Brain Res.* **861**, 165-167.

Lippincott Williams & Wilkins (2007) Llibre.

Liu PS, Liaw CT, Lin MK, Shin SH, Kao LS, Lin LF (2003) Amphetamine enhances Ca²⁺ entry and catecholamine release via nicotinic receptor activation in bovine adrenal chromaffin cells. *Eur.J.Pharmacol.* **460**, 9-17.

Madhok TC, Matta SG, Sharp BM (1995) Nicotine regulates nicotinic cholinergic receptors and subunit mRNAs in PC 12 cells through protein kinase A. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **32**, 143-150.

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.

Malysz J, Anderson DJ, Grønlien JH, Ji J, Bunnelle WH, Hakerud M, Thorin-Hagene K, Ween H, Helfrich R, Hu M, Gubbins E, Gopalakrishnan S, Puttfarcken PS, Briggs CA, Li J, Meyer MD, Dyhring T, Ahring PK, Nielsen E, Peters D, Timmermann DB, Gopalakrishnan M (2010) In vitro Pharmacological Characterization of a Novel Selective $\alpha 7$ Neuronal nicotinic Acetylcholine receptor agonist ABT-107. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **334**, 863-874.

Mao D, Perry DC, Yasuda RP, Wolfe BB, Kellar KJ (2008) The $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ nicotinic cholinergic receptor in rat brain is resistant to up-regulation by nicotine in vivo. *J.Neurochem.* **104**, 446-456.

Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann SF, Collins AC (1992) Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J.Neurosci.* **12**, 2765-2784.

Marks MJ, Smith KW, Collins AC (1998) Differential agonist inhibition identifies multiple epibatidine binding sites in mouse brain. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **285**, 377-386.

Marszalec W, Yeh JZ, Narahashi T (2005) Desensitization of nicotine acetylcholine receptors: modulation by kinase activation and phosphatase inhibition. *Eur.J.Pharmacol.* **514**, 83-90.

Maskos U, Molles BE, Pons S, Besson M, Guiard BP, Guilloux JP, Evrard A, Cazala P, Cormier A, Mameli-Engvall M, Dufour N, Cloez-Tayarani I, Bemelmans AP, Mallet J, Gardier AM, David V, Faure P, Granon S, Changeux JP (2005) Nicotine reinforcement and cognition restored by targeted expression of nicotinic receptors. *Nature* **436**, 103-107.

McCann UD, Szabo Z, Seckin E, Rosenblatt P, Mathews WB, Ravert HT, Dannals RF, Ricaurte GA (2005) Quantitative PET studies of the serotonin transporter in MDMA users and controls using [11C]McN5652 and [11C]DASB. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1741-1750.

McGuinness T (2006) Methamphetamine abuse. *Am.J.Nurs.* **106**, 54-59.

McKenna DJ, Guan XM, Shulgin AT (1991) 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDA) analogues exhibit differential effects on synaptosomal release of 3H-dopamine and 3H-5-hydroxytryptamine. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **38**, 505-512.

Messi ML, Renganathan M, Grigorenko E, Delbono O (1997) Activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor promotes survival of spinal cord motoneurons. *FEBS Lett.* **411**, 32-38.

Metzger RR, Hanson GR, Gibb JW, Fleckenstein AE (1998) 3-4-Methylenedioxymethamphetamine-induced acute changes in dopamine transporter function. *Eur.J.Pharmacol.* **349**, 205-210.

Miledi R, Parker I, Sumikawa K (1983) Recording of single gamma-aminobutyrate- and acetylcholine-activated receptor channels translated by exogenous mRNA in *Xenopus* oocytes. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **218**, 481-484.

Millar NS, Harkness PC (2008) Assembly and trafficking of nicotinic acetylcholine receptors (Review). *Mol.Membr.Biol.* **25**, 279-292.

Miller PS, Smart TG (2010) Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* **31**, 161-174.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* **423**, 949-955.

Molinari EJ, Delbono O, Messi ML, Renganathan M, Arneric SP, Sullivan JP, Gopalakrishnan M (1998) Up-regulation of human alpha7 nicotinic receptors by chronic treatment with activator and antagonist ligands. *Eur.J.Pharmacol.* **347**, 131-139.

Monod J, Wyman J, Changeux JP (1965) On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *J.Mol.Biol.* **12**, 88-118.

Moroni M, Zwart R, Sher E, Cassels BK, Bermudez I (2006) alpha4beta2 nicotinic receptors with high and low acetylcholine sensitivity: pharmacology, stoichiometry, and sensitivity to long-term exposure to nicotine. *Mol.Pharmacol.* **70**, 755-768.

Mudo G, Belluardo N, Fuxe K (2007) Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. Progress in molecular mechanisms. *J.Neural Transm.* **114**, 135-147.

Nash JF, Yamamoto BK (1992) Methamphetamine neurotoxicity and striatal glutamate release: comparison to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Brain Res.* **581**, 237-243.

Nash JF, Roth BL, Brodtkin JD, Nichols DE, Gudelsky GA (1994) Effect of the R(-) and S(+) isomers of MDA and MDMA on phosphatidyl inositol turnover in cultured cells expressing 5-HT2A or 5-HT2C receptors. *Neurosci Lett.* **177**, 111-5.

Nashmi R, Dickinson ME, McKinney S, Jareb M, Labarca C, Fraser SE, Lester HA (2003) Assembly of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors assessed with functional fluorescently labeled subunits: effects of localization, trafficking, and nicotine-induced upregulation in clonal mammalian cells and in cultured midbrain neurons. *J.Neurosci.* **23**, 11554-11567.

Nelson ME, Kuryatov A, Choi CH, Zhou Y, Lindstrom J (2003) Alternate stoichiometries of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol.Pharmacol.* **63**, 332-341.

Nguyen HN, Rasmussen BA, Perry DC (2003) Subtype-selective Up-Regulation by chronic nicotine of high-affinity nicotinic receptors in rat brain demonstrated by receptor autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther.* **307**, 1090-7.

Nichols DE, Lloyd DH, Hoffman AJ, Nichols MB, Yim GK (1982) Effects of certain hallucinogenic amphetamine analogues on the release of [3H]serotonin from rat brain synaptosomes. *J Med Chem.* **25**, 530-5.

Nishizaki T, Sumikawa K (1998) Effects of PKC and PKA phosphorylation on desensitization of nicotinic acetylcholine receptors. *Brain Res.* **812**, 242-245.

Northrop NA, Smith LP, Yamamoto BK, Eyerman DJ (2010) Regulation of Glutamate Release by Alpha 7 Nicotinic Receptors: Differential Role in Methamphetamine-Induced Damage to Dopaminergic and Serotonergic Terminals. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*

Nuutinen S, Ekokoski E, Lahdensuo E, Tuominen RK (2006) Nicotine-induced upregulation of human neuronal nicotinic alpha7-receptors is potentiated by modulation of cAMP and PKC in SH-EP1-alpha7 cells. *Eur.J.Pharmacol.* **544**, 21-30.

O'Callaghan JP, Miller DB (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 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.

Orio L, Llopis N, Torres E, Izco M, O'Shea E, Colado MI (2010) A study on the mechanisms by which minocycline protects against MDMA ('ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT cortical neurons. *Neurotox.Res.* **18**, 187-199.

Pacheco MA, Pastoor TE, Wecker L (2003) Phosphorylation of the alpha4 subunit of human alpha4beta2 nicotinic receptors: role of cAMP-dependent protein kinase (PKA) and protein kinase C (PKC). *Brain Res.Mol.Brain Res.* **114**, 65-72.

Pauly JR, Charriez CM, Guseva MV, Scheff SW (2004) Nicotinic receptor modulation for neuroprotection and enhancement of functional recovery following brain injury or disease. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **1035**, 316-334.

Peng X, Gerzanich V, Anand R, Whiting PJ, Lindstrom J (1994) Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *Mol.Pharmacol.* **46**, 523-530.

Picciotto MR, Zoli M, Rimondini R, Lena C, Marubio LM, Pich EM, Fuxe K, Changeux JP (1998) Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature* **391**, 173-177.

Pineda JA, Wang KK, Hayes RL (2004) Biomarkers of proteolytic damage following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* **14**, 202-209.

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.

Plummer MR, Logothetis DE, Hess P (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**, 1453-1463.

Pollock VV, Pastoor TE, Wecker L (2007) Cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) phosphorylates Ser362 and 467 and protein kinase C phosphorylates Ser550 within the M3/M4 cytoplasmic domain of human nicotinic receptor alpha4 subunits. *J.Neurochem.* **103**, 456-466.

Pollock VV, Pastoor T, Katnik C, Cuevas J, Wecker L (2009) Cyclic AMP-dependent protein kinase A and protein kinase C phosphorylate alpha4beta2 nicotinic receptor subunits at distinct stages of receptor formation and maturation. *Neuroscience* **158**, 1311-1325.

Prince RJ, Sine SM (1999) Acetylcholine and epibatidine binding to muscle acetylcholine receptors distinguish between concerted and uncoupled models. *J.Biol.Chem.* **274**, 19623-19629.

Pubill D, Canudas AM, Pallas M, Camins A, Camarasa J, Escubedo E (2003) Different glial response to methamphetamine- and methylenedioxymethamphetamine-induced neurotoxicity. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **367**, 490-499.

Pubill D, Chipana C, Camins A, Pallas M, Camarasa J, Escubedo E (2005) Free radical production induced by methamphetamine in rat striatal synaptosomes. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **204**, 57-68.

Reed JC (1997) Cytochrome c: can't live with it--can't live without it. *Cell* **91**, 559-562.

Ren K, Puig V, Papke RL, Itoh Y, Hughes JA, Meyer EM (2005) Multiple calcium channels and kinases mediate alpha7 nicotinic receptor neuroprotection in PC12 cells. *J.Neurochem.* **94**, 926-933.

Ren XQ, Cheng SB, Treuil MW, Mukherjee J, Rao J, Braunewell KH, Lindstrom JM, Anand R (2005) Structural determinants of alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor trafficking. *J.Neurosci.* **25**, 6676-6686.

Rezvani K, Teng Y, Shim D, De BM (2007) Nicotine regulates multiple synaptic proteins by inhibiting proteasomal activity. *J.Neurosci.* **27**, 10508-10519.

Ricaurte GA, Schuster CR, Seiden LS (1980) Long-term effects of repeated methylamphetamine administration on dopamine and serotonin neurons in the rat brain: a regional study. *Brain Res.* **193**, 153-163.

Ricaurte GA, Forno LS, Wilson MA, DeLanney LE, Irwin I, Molliver ME, Langston JW (1988) (+/-)3,4-Methylenedioxymethamphetamine selectively damages central serotonergic neurons in nonhuman primates. *JAMA* **260**, 51-55.

Ringger NC, O'Steen BE, Brabham JG, Silver X, Pineda J, Wang KK, Hayes RL, Papa L (2004) A novel marker for traumatic brain injury: CSF alphaII-spectrin breakdown product levels. *J.Neurotrauma* **21**, 1443-1456.

Ross AF, Green WN, Hartman DS, Claudio T (1991) Efficiency of acetylcholine receptor subunit assembly and its regulation by cAMP. *J.Cell Biol.* **113**, 623-636.

Rothman RB, Baumann MH, Dersch CM, Romero DV, Rice KC, Carroll FI, Partilla JS (2001) Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* **39**, 32-41.

Royo-Isach J, Magrane M, Velilla A, Ruiz L (2004) [Speed users (metamphetamines): a return journey between ecstasy (MDMA) and cocaine. Clinical, preventive and health-care questions]. *Aten.Primaria* **34**, 553-556.

- S**allete J, Pons S, villers-Thiery A, Soudant M, Prado de CL, Changeux JP, Corringer PJ (2005) Nicotine upregulates its own receptors through enhanced intracellular maturation. *Neuron* **46**, 595-607.
- Sandoval V, Riddle EL, Ugarte YV, Hanson GR, Fleckenstein AE (2001) Methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporter function: an in vitro model. *J.Neurosci.* **21**, 1413-1419.
- Sands SB, Costa AC, Patrick JW (1993) Barium permeability of neuronal nicotinic receptor alpha 7 expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys.J.* **65**, 2614-2621.
- Scatchard G. (1976) Equilibrium in solutions and Surface and Colloid Chemistry. *Cambridge: Harvard Univ. Press.*
- 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**, 747-755.
- Shih JC, Thompson RF (1999) Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *Am.J.Hum.Genet.* **65**, 593-598.
- Shulgin AT, Shulgin LA, Jacob P, III (1986) A protocol for the evaluation of new psychoactive drugs in man. *Methods Find.Exp.Clin.Pharmacol.* **8**, 313-320.
- Sprague JE, Nichols DE (1995) Inhibition of MAO-B protects against MDMA-induced neurotoxicity in the striatum. *Psychopharmacology (Berl)* **118**, 357-359.
- Sprague JE, Mallett NM, Rusyniak DE, Mills E (2004) UCP3 and thyroid hormone involvement in methamphetamine-induced hyperthermia. *Biochem.Pharmacol.* **68**, 1339-1343.

Staszewski RD, Yamamoto BK (2006) Methamphetamine-induced spectrin proteolysis in the rat striatum. *J.Neurochem.* **96**, 1267-1276.

Stone DM, Hanson GR, Gibb JW (1987) Differences in the central serotonergic effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA) in mice and rats. *Neuropharmacology* **26**, 1657-1661.

Sudo M, Tsuzuki K, Okado H, Miwa A, Ozawa S (1997) Adenovirus-mediated expression of AMPA-type glutamate receptor channels in PC12 cells. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **50**, 91-99.

Sulzer D, Chen TK, Lau YY, Kristensen H, Rayport S, Ewing A (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J.Neurosci.* **15**, 4102-4108.

Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005) Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog.Neurobiol.* **75**, 406-433.

Trousard J, Mirsky R, Jessen KR, Burnstock G, Brown DA (1993) Intracellular calcium changes associated with cholinergic nicotinic receptor activation in cultured myenteric plexus neurones. *Brain Res.* **624**, 103-108.

Turner JR, Kellar KJ (2005) Nicotinic cholinergic receptors in the rat cerebellum: multiple heteromeric subtypes. *J.Neurosci.* **25**, 9258-9265.

Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J.Mol.Biol.* **346**, 967-989.

Vallejo YF, Buisson B, Bertrand D, Green WN (2005) Chronic nicotine exposure upregulates nicotinic receptors by a novel mechanism. *J.Neurosci.* **25**, 5563-5572.

Virginio C, Giacometti A, Aldegheri L, Rimland JM, Terstappen GC (2002) Pharmacological properties of rat alpha 7 nicotinic receptors expressed in native and recombinant cell systems. *Eur.J.Pharmacol.* **445**, 153-161.

Walsh H, Govind A, Mastro R, Hoda JC, Bertrand D, Vallejo Y (2008). Up-regulation of nicotinic receptors by nicotine varies with receptor subtype. *J Biol Chem.* **283**, 6022-32.

Wang KK (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**, 20-26.

Warren MW, Kobeissy FH, Liu MC, Hayes RL, Gold MS, Wang KK (2005) Concurrent calpain and caspase-3 mediated proteolysis of alpha II-spectrin and tau in rat brain after methamphetamine exposure: a similar profile to traumatic brain injury. *Life Sci.* **78**, 301-309.

Wecker L, Guo X, Rycerz AM, Edwards SC (2001) Cyclic AMP-dependent protein kinase (PKA) and protein kinase C phosphorylate sites in the amino acid sequence corresponding to the M3/M4 cytoplasmic domain of alpha4 neuronal nicotinic receptor subunits. *J.Neurochem.* **76**, 711-720.

Wecker L, Pollock VV, Pacheco MA, Pastoor T (2010) Nicotine-induced up regulation of alpha4beta2 neuronal nicotinic receptors is mediated by the protein kinase C-dependent phosphorylation of alpha4 subunits. *Neuroscience* **171**, 12-22.

Wei Q, Jurma OP, Andersen JK (1997) Increased expression of monoamine oxidase-B results in enhanced neurite degeneration in methamphetamine-treated PC12 cells. *J.Neurosci.Res.* **50**, 618-626.

Whiteaker P, Davies AR, Marks MJ, Blagbrough IS, Potter BV, Wolstenholme AJ, Collins AC, Wonnacott S (1999) An autoradiographic study of the distribution of binding sites for the novel alpha7-selective nicotinic radioligand [3H]-methyllycaconitine in the mouse brain. *Eur.J.Neurosci.* **11**, 2689-2696.

Wrona MZ, Yang Z, Zhang F, Dryhurst G (1997) Potential new insights into the molecular mechanisms of methamphetamine-induced neurodegeneration. *NIDA Res.Monogr* **173**, 146-174.

Yamamoto BK, Zhu W (1998) The effects of methamphetamine on the production of free radicals and oxidative stress. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **287**, 107-114.

Yamamoto BK, Raudensky J (2008) The role of oxidative stress, metabolic compromise, and inflammation in neuronal injury produced by amphetamine-related drugs of abuse. *J.Neuroimmune.Pharmacol.* **3**, 203-217.

Yamodo IH, Chiara DC, Cohen JB, Miller KW (2010) Conformational changes in the nicotinic acetylcholine receptor during gating and desensitization. *Biochemistry* **49**, 156-165.

Young R, Glennon RA (2008) MDMA (N-methyl-3,4-methylenedioxyamphetamine) and its stereoisomers: Similarities and differences in behavioral effects in an automated activity apparatus in mice. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **88**, 318-331.

Yung-Chi C, Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **22**, 3099-3108.

Zhang Z, Larner SF, Liu MC, Zheng W, Hayes RL, Wang KK (2009) Multiple alphaII-spectrin breakdown products distinguish calpain and caspase dominated necrotic and apoptotic cell death pathways. *Apoptosis*. **14**, 1289-1298.