

## Implicación de la molécula de adhesión ALCAM en el daño cerebral. Modelo de daño neuronal mediante la administración de MDMA/éxtasis en rata

### Implication of the adhesion molecule ALCAM in the experimental rat model of brain damage caused by MDMA/ecstasy

Moreno Cubero E, O'Shea E, Rubio-Araiz A, Torres E, Urrutia A, Mayado A, Colado MI, Gutiérrez-López MD

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Red de Trastornos Adictivos-RTA, ISCIII.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

#### Resumen

**Objetivo:** Caracterizar la expresión de ALCAM en vasos de corteza cerebral de ratas tratadas con MDMA. 2) Estudiar el efecto que sobre su expresión y sobre la neurotoxicidad producida por MDMA tiene ibuprofeno.

**Materiales y métodos:** Se administró una dosis neurotóxica de MDMA a ratas Dark Agouti e ibuprofeno a diferentes tiempos. Se midió la temperatura de los animales durante los tratamientos y se estudió la expresión de ALCAM en los vasos de corteza. El daño cerebral se estudió midiendo los niveles de ácido 5-indolacético, serotonina y la densidad de su transportador.

**Resultados:** MDMA produce un aumento de ALCAM a las 24 horas ( $p < 0.01$ ). El co-tratamiento con ibuprofeno lo disminuye ( $p < 0.01$ ) y atenúa el daño cerebral disminuyendo los efectos neurotóxicos de MDMA sobre los niveles de serotonina cortical ( $p < 0.0001$ ) y la densidad del transportador ( $p < 0.0001$ ). Ibuprofeno disminuye ligeramente la hipertermia producida por MDMA.

**Conclusiones:** MDMA aumenta la expresión de ALCAM. Los datos sugieren la posibilidad de utilizar compuestos anti-inflamatorios como ibuprofeno que reducen este efecto sobre ALCAM y que disminuyen parcialmente el daño cerebral, si bien es necesario analizar la participación de la disminución de la temperatura en dicha protección.

**Palabras clave:**

MDMA, ALCAM, neurotoxicidad.

#### Abstract

**Objective:** 1) Characterization of ALCAM adhesion molecule expression in cortical vessels of MDMA-treated rats. 2) Study of the effect of the anti-inflammatory compound ibuprofen on ALCAM expression and on the neurotoxicity produced by MDMA.

**Material and methods:** Male Dark Agouti rats were given a neurotoxic dose of MDMA. Ibuprofen was given before and at various times after MDMA. Rectal temperature was monitored during the treatment and ALCAM expression in vessels from cerebral cortex was determined at 24 h. In neurotoxicity studies, cortical 5-HT tissue levels and 5-HT transporter density were measured.

**Results:** ALCAM expression was increased 24 h after MDMA treatment ( $p < 0.01$ ). Co-treatment with ibuprofen attenuated the increase in ALCAM levels ( $p < 0.01$ ) and partially prevented cerebral injury, reducing MDMA-induced 5-HT ( $p < 0.0001$ ) and 5-HT transporter ( $p < 0.0001$ ) loss. Ibuprofen produced a minor modification in the MDMA-induced hyperthermia.

**Conclusions:** Our study demonstrates an effect of MDMA on ALCAM expression. Thus, anti-inflammatory compounds such as ibuprofen may result useful in brain protection by inhibiting the effects of ALCAM and reducing brain damage although the potential contribution of the attenuation of MDMA-induced hyperthermia must also be considered.

**Key-words:**

MDMA, ALCAM, neurotoxicity.

#### Correspondencia

MD Gutiérrez-López

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Univ. Complutense.

Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, España.

e-mail: mdgutier@med.ucm.es

## I Introducción

Diversas situaciones con una etiología muy variable producen un daño cerebral o medular que puede llegar a ser origen de discapacidad física o dejar secuelas neuro-psicológicas. El inicio del daño tiene como consecuencia, en muchos casos, la activación de mecanismos secundarios que van a estar igualmente implicados en la generación de la lesión. Uno de los procesos que se induce al inicio, y que es común para diferentes desencadenantes, es una respuesta inflamatoria local cuyo objeto es la reparación del daño que se está produciendo. La magnitud de esta reacción inflamatoria es a veces desproporcionada y puede llegar a ser causa directa de un daño tisular considerable, en algunas ocasiones irreparable [1]. Puesto que está demostrado un componente inflamatorio en diferentes modelos de daño neuronal, cada uno de los factores y mecanismos celulares que intervienen en su desarrollo se ha convertido en posible diana para el diseño de nuevas terapias farmacológicas frente al daño cerebral o medular.

La 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA o «éxtasis») es una potente toxina que produce en el cerebro de rata y de humano un daño neuronal selectivo sobre las vías serotoninérgicas [2]. Su administración produce una liberación inmediata y aguda de serotonina (5-HT) que supone una disminución de su contenido tisular en corteza de un 60% tras una hora y de un 80% tras 3-6 horas [3][4], produciéndose una recuperación transitoria del contenido indólico a las 24 horas [4]. Este mismo patrón de disminución se produce generalmente para su metabolito, el ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), y ambos indoles varían no solo en corteza, sino también en estriado e hipocampo [5]. Además de estimular la liberación de 5-HT, la MDMA inhibe su recaptación [6], lo que contribuye al aumento extracelular de los niveles de 5-HT. A largo plazo se produce el daño cerebral caracterizado por la disminución progresiva del contenido indólico, que llega a ser del 74% a los siete días, unido a la disminución en la densidad del transportador presináptico de serotonina, principalmente en regiones ricas en terminaciones nerviosas serotoninérgicas provenientes de los núcleos dorsales del rafe: corteza, estriado e hipocampo [7]. Este daño es persistente y, aunque se pueden llegar a recuperar la síntesis de 5-HT y la densidad de terminaciones nerviosas serotoninérgicas en corteza al cabo de periodos superiores a un año [7-9], la reinervación parece tener un patrón anómalo [10]. Los estudios en consumidores de MDMA han demostrado igualmente un daño en la señalización serotoninérgica mantenido en el tiempo [11-12]. Como ocurre en otros modelos animales y en patologías en humanos que causan daño cerebral, la administración de MDMA induce

en la rata una respuesta neuroinflamatoria caracterizada por tinción positiva del marcador de activación microglial OX42 a las 24 horas [13] y regulación, en las primeras 3-6 horas, de varios componentes de la familia de interleucina-1 (IL-1), incluyendo un aumento de los niveles de IL-1 $\beta$  y de su antagonista (IL1ra) y una disminución en los niveles del receptor-1 (IL1-RI) [14-16]. Además, MDMA produce un aumento en la capacidad de unión al DNA del factor de transcripción NF $\kappa$ B implicado en la transcripción de genes proinflamatorios [17]. El pretratamiento con minociclina, un derivado de tetraciclina con propiedades anti-inflamatorias, entre otras, previene el aumento en NF $\kappa$ B, activación glial y la liberación de IL-1 $\beta$  en corteza, así como la disminución de los niveles de 5-HT a los siete días de la administración de MDMA [17]. Este compuesto también ha mostrado tener actividad preventiva en otros modelos de daño, como isquemia cerebral [18][19], excitotoxicidad [20] o daño medular [21], entre otros.

La migración leucocitaria a través del endotelio vascular es uno de los principales procesos que se producen en la respuesta inflamatoria [22][23]. ALCAM (*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule-1* o CD166) es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que se expresa en gran variedad de tejidos. Su expresión en células neoplásicas es ampliamente conocida e incluso, en algunos casos, los niveles de su expresión están asociados con la progresión tumoral [24-28]. Se expresa en endotelio vascular [29] y en cerebro se ha localizado en diferentes tipos celulares, incluidas neuronas, participando en neurogénesis [30] y en endotelio vascular, donde se relaciona con extravasación leucocitaria a través de la barrera hematoencefálica en patologías como esclerosis múltiple o en encefalitis autoinmune experimental [31].

El objetivo de este estudio es estudiar si la molécula de adhesión ALCAM puede ver modificada su expresión en el modelo animal de daño cerebral producido por el tratamiento con MDMA y, en tal caso, si la administración de un compuesto anti-inflamatorio como ibuprofeno tiene efecto sobre el daño serotoninérgico y sobre los niveles de ALCAM en particular, lo que podría abrir un nuevo campo de estudio sobre su posible función en patologías desarrolladas en cerebro y, en particular, en modelos de daño cerebral de origen no autoinmune.

## I Material y métodos

El trabajo se realizó en ratas Dark Agouti macho adultas, con un peso comprendido entre 150-200 gramos. Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura ambiente (21 $\pm$ 2°C) y humedad (50-55%), con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y acceso libre a agua y comida.

La ( $\pm$ ) 3,4-metilenodioximetanfetamina clorhidrato, MDMA o «éxtasis» (Servicio de Estupefacientes y Psicotropos de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, AEMPS), se administró por vía intraperitoneal (en un volumen de inyección 1 ml/kg) en una dosis única de 10,0 mg/kg; este protocolo ha sido utilizado en estudios previos por producir un efecto neurotóxico sobre los terminales nerviosos [7] [27] [32]. La MDMA se disolvió en solución salina que fue el vehículo utilizado en los animales controles (salino). El ibuprofeno (Santa Cruz Biotechnology, EE UU) se disolvió en una solución 12% DMSO, 9% Tween-80 y 8,75% etanol en salino, vehículo que ya ha sido validado en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio por no tener efectos sobre la neurotoxicidad en este modelo de daño [14], y se administró en un régimen de dosis de 40 mg/kg 30 minutos antes de la inyección de MDMA y de 50 mg/kg 4,5 horas después en el caso de que el sacrificio de los animales se realizase a las 24 horas de administrar MDMA. En el estudio de daño cerebral en el que los animales se sacrifican siete días después, se administraron dos dosis adicionales de 50 mg/kg de ibuprofeno 24 y 48 horas después de la administración de MDMA.

Se monitorizó la temperatura rectal de los animales durante todos los experimentos, comenzando con una medida basal (una hora antes de la inyección de MDMA) y hasta 6 horas tras su administración, utilizando para ello una sonda de temperatura acoplada a un lector digital (BAT12 thermometer, Physitemp, NJ, EE UU) con una resolución de 0,1°C y precisión de  $\pm$  0,1°C unido a un sensor (RET-2 Rodent Portec, Reino Unido) para roedores.

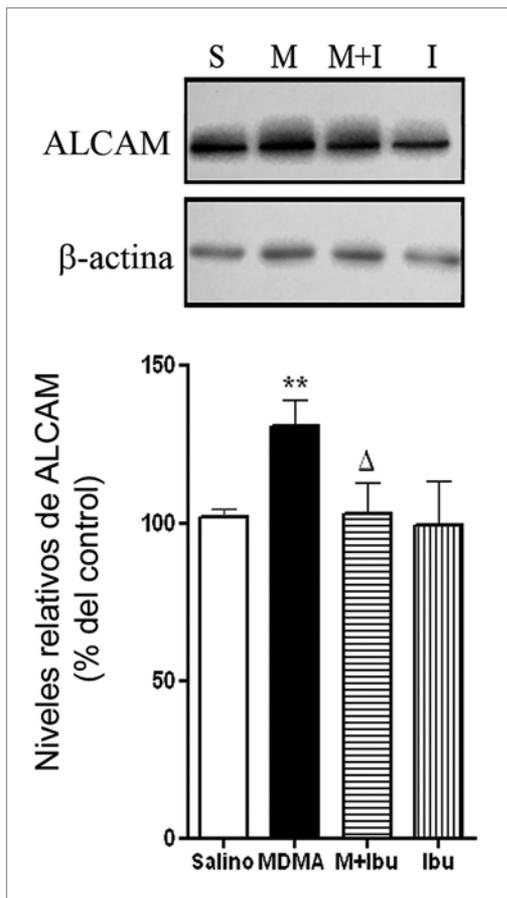
A los tiempos indicados en cada ensayo, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación. Rápidamente se extrajeron los cerebros, se diseccionaron las diferentes estructuras en hielo y se mantuvieron a -80° C hasta su procesamiento. Los vasos del tejido cerebral de rata se obtuvieron modificando ligeramente las condiciones previamente descritas [33]. Tras homogeneizar la corteza cerebral (en tampón 15 mM Hepes, 147 mM NaCl, 4 mM KCl, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>), se obtuvo la fracción enriquecida en vasos por interacción con dextrano al 20% y filtrado a través de membrana de nylon 20- $\mu$ m (Millipore, España). Las proteínas obtenidas tras la lisis en tampón con 0,1% NP-40 se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE en geles del 8% y detectaron mediante *western blot* utilizando un anticuerpo específico frente a ALCAM (Santa Cruz Biotechnology, EE UU, 1:700), seguido de uno *goat anti-rabbit* acoplado a peroxidasa (Sigma-Aldrich, España, 1:5000). La visualización de la quimioluminiscencia utilizando como sustrato ECL (GE Healthcare, España) se realizó en un equipo de obtención y aná-

lisis de imagen (Odyssey-Fc, Licor, Alemania). Se cuantificó la expresión de esta proteína utilizando el programa informático ImageJ (N.I.H., Bethesda, Maryland, EE UU) y se analizó la intensidad de las bandas correspondientes a cada tratamiento. La expresión de  $\beta$ -actina en las mismas muestras se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma-Aldrich, España, 1:2000). En cada muestra, el valor de ALCAM se obtuvo a partir de la relación de intensidad entre las bandas correspondientes a ALCAM y a la  $\beta$ -actina utilizada como control de carga. La expresión de ALCAM en los diferentes grupos experimentales se expresó como porcentaje del grupo control. Los datos obtenidos corresponden al tratamiento de animales (n=14-20) en diferentes días. Cada muestra se ha sometido a *western blot* al menos dos veces.

La cuantificación de la concentración de 5-HT y 5-HIAA en las diferentes áreas cerebrales se realizó en el sobrenadante obtenido tras su homogeneización en una solución 0,2 M de ácido perclórico, 0,1% cisteína, 0,1% metabisulfito sódico y 0,01% EDTA, y se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (h.p.l.c.) con detector coulombimétrico de acuerdo a estudios previos [14].

La cuantificación de la densidad de los lugares de recaptación de 5-HT se realizó según método descrito previamente, por el que la fijación de [<sup>3</sup>H]-paroxetina se utiliza como marcador del daño producido por MDMA [7]. Las estructuras cerebrales aisladas se homogeneizaron en una solución tampón con Tris-HCl (50 mM, pH 7,4), 120 mM NaCl y 5 mM KCl para obtener las membranas que contienen dichos transportadores tras centrifugación (30.000xg) y lavados. En los ensayos de unión se utilizó una concentración saturante (1 nM; actividad específica de 21,5 Ci/mmol) de [<sup>3</sup>H]-paroxetina en ausencia y en presencia de 5-HT 100  $\mu$ M para la determinación de la unión total e inespecífica respectivamente. La reacción de unión se realizó durante 90 minutos a temperatura ambiente; la posterior separación del radioligando libre mediante filtración (filtros Whatman GF/B, Skatron) permite determinar la [<sup>3</sup>H]-paroxetina unida a las membranas mediante espectrometría de centelleo (Tricarb® Liquid Scintillation Analyzer, Model 2500, Packard Instrument Company, EE UU).

Los datos obtenidos de la determinación de indoles en cerebro, la fijación de [<sup>3</sup>H]-paroxetina y los ensayos de *western blot* se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguidos del test de Newman-Keuls para comparaciones en las que se haya obtenido una F significativa, utilizando para ello el paquete estadístico informático GraphPad Prism 5® (GraphPad Software, San Diego, EE UU). Para el análisis estadístico de las medidas de temperatura rectal en los animales se utilizó el test de ANOVA de dos



**Fig. 1.** Efecto de MDMA y de ibuprofeno sobre la expresión de ALCAM en vasos obtenidos de corteza cerebral. Se muestra un *western blot* representativo (panel superior). Los datos indican la media  $\pm$  ESM. Diferencias con el grupo salino: \*\* $p < 0,01$  diferencias con el grupo MDMA:  $\Delta p < 0,05$ .

vías con medidas repetidas, considerando el tratamiento como factor y el tiempo como medida repetida (BMDP, Statistical Solutions, Cork, Irlanda). Se consideran diferencias estadísticamente significativas aquellas en las que  $p < 0,05$ .

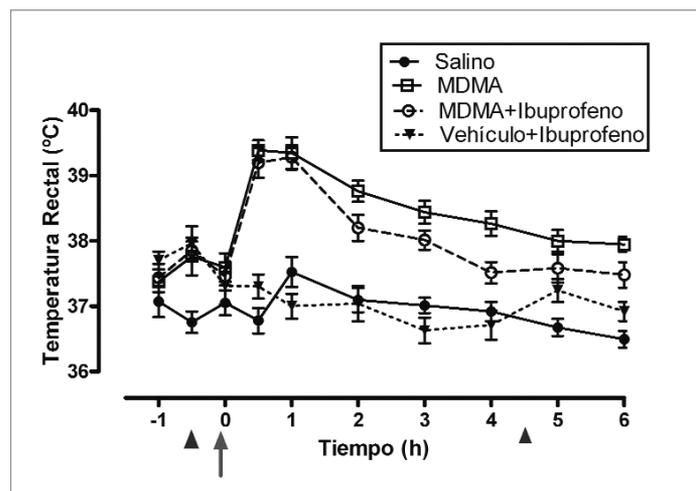
## Resultados

Estudiamos la expresión de ALCAM en vasos purificados a partir de corteza cerebral observando un aumento, frente a los valores de los animales tratados con salino, de un 27,9% 24 horas después de tratar a los animales con MDMA (Figura 1) ( $101,9 \pm 2,7$  u.a grupo Salino y  $130,3 \pm 8,6$  grupo MDMA) ( $p < 0,01$ ), tiempo al que el proceso inflamatorio está establecido en la corteza cerebral de acuerdo con un aumento en la inmunoreactividad del tejido por OX42, marcador de activación glial [13-14].

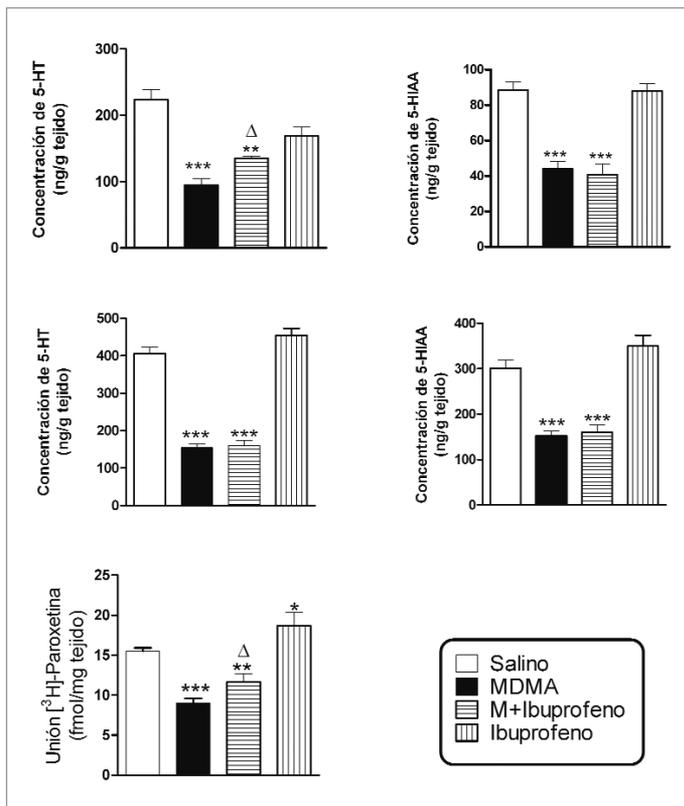
Tratamos los animales con ibuprofeno –un compuesto con actividad anti-inflamatoria de amplio uso en clínica–

para estudiar su efecto sobre la expresión de ALCAM en endotelio vascular cerebral durante el establecimiento de la inflamación producida por MDMA. La administración de este compuesto se realizó siguiendo la pauta siguiente: ibuprofeno por vía subcutánea, 30 minutos antes ( $40$  mg/kg) y 4,5 horas después ( $50$  mg/kg) de administrar la MDMA como estímulo inflamatorio ( $10$  mg/kg); se sacrificaron los animales a las 24 horas y se estudió la expresión de ALCAM en los vasos aislados a partir de las cortezas cerebrales. El análisis por ANOVA de una vía indica un efecto del tratamiento significativo (Figura 1) ( $p = 0,0029$ ). El análisis post-hoc indicó que el tratamiento con ibuprofeno previene significativamente el aumento en los niveles de ALCAM producido por tratamiento con MDMA ( $130,3 \pm 8,6$  u.a. en el grupo MDMA;  $102,9 \pm 8,6$  u.a. en el grupo MDMA+Ibuprofeno) ( $p < 0,05$ ). Ibuprofeno no altera *per se* la expresión de ALCAM de animales tratados con salino (Figura 1).

La administración de MDMA provoca en los animales un aumento característico de la temperatura corporal, cuyo valor máximo se produce alrededor de los 30 minutos tras la inyección del compuesto, siendo de  $36,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$  en el grupo salino y de  $39,4 \pm 0,2^\circ\text{C}$  en el grupo MDMA ( $p < 0,0001$ ) (Figura 2). Si bien este valor máximo de temperatura producida por MDMA no varía al co-administrar ibuprofeno, sí observamos que el descenso de la temperatura hacia valores similares a los del grupo salino es más rápido que en el grupo de animales que sólo recibieron MDMA ( $p = 0,027$ ), sin afectar *per se* a la de animales tratados con salino ( $p = 0,7642$ ) (Figura 2).



**Fig. 2.** Efecto de ibuprofeno sobre la temperatura rectal de los animales tras la administración de MDMA. La gráfica muestra el efecto de ibuprofeno sobre la hipertermia inducida por MDMA. La flecha indica el tiempo de inyección de MDMA y la punta de flecha los de ibuprofeno. Los datos indican la media  $\pm$  ESM ( $n = 5-15$ ).



**Fig. 3.** Efecto de ibuprofeno sobre el daño cerebral producido por MDMA. Los resultados indican la media  $\pm$  ESM (n=5-11). Diferencias con el grupo salino+vehículo: \* p<0,05, \*\* p<0,01; \*\*\*p<0,001; diferencias con el grupo MDMA: Δp<0,05.

Estudiamos si la administración de ibuprofeno podría tener un efecto neuroprotector frente al daño producido por MDMA, midiendo los niveles de los indoles 5-HT y 5-HIAA en corteza y en hipocampo, y mediante ensayos de unión del radioligando específico [<sup>3</sup>H]-paroxetina al transportador de serotonina. De acuerdo con lo descrito en estudios previos, la administración de MDMA produjo una disminución en los niveles corticales de 5-HT (Figura 3A, panel superior) (p<0,001) y de 5-HIAA (Figura 3) (p<0,001), así como en los de hipocampo (Figura 3A, panel inferior) (p<0,001; 5-HIAA (Figura 3B) (p<0,001). El análisis estadístico indica un efecto del tratamiento con ibuprofeno (p<0,0001) sobre la marcada disminución que la administración de una dosis única de MDMA produce siete días más tarde en las concentraciones de 5-HT cortical, de modo que esta reducción de 5-HT es menor (p<0,05). Es interesante destacar que esta protección que se produce en corteza no se observa en hipocampo (Figura 3), lo que sugiere por parte del ibuprofeno un efecto región específico en cuanto a las regiones cerebrales. Los niveles del metabolito 5-HIAA en animales tratados con MDMA e ibuprofeno no

son diferentes de los observados en animales tratados únicamente con MDMA (Figura 3). Ibuprofeno *per se* no afecta a los niveles de indoles en corteza de animales tratados con salino.

En cuanto a la densidad del transportador de serotonina localizado en la corteza cerebral, el análisis estadístico indica un efecto del tratamiento (Figura 3) (p<0,0001), ya que ésta se ve disminuida en un 41,9% debido a la administración de MDMA (p<0,001), y el tratamiento con ibuprofeno, en la pauta comentada, previene parcialmente este efecto, de forma que la lesión se recupera en un 40,46% (grupo MDMA+ibuprofeno: 11,6 $\pm$ 1,0 fmol/mg tejido, p<0,05 vs grupo MDMA). El tratamiento de animales con salino e ibuprofeno induce un ligero pero significativo aumento en la densidad del transportador (p<0,05).

## I Discusión

La administración de MDMA en ratas supone un modelo experimental de daño cerebral en el que al inicio se produce un proceso de inflamación.

El proceso neuroinflamatorio se genera también en otros modelos y patologías cerebrales como ictus o daño cerebral por traumatismo, entre otros [23][34][35]. Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que 24 horas después de tratar a los animales con MDMA, tiempo en el que se ha descrito una clara activación microglial [13][14] marcador del proceso neuroinflamatorio, se produce un aumento en la expresión, en los vasos cerebrales, de la molécula de adhesión ALCAM. Esta ha sido durante mucho tiempo una molécula asociada a patología tumoral [36]. Muy recientemente se ha asociado además a migración leucocitaria a través del endotelio vascular cerebral, demostrando los autores que el bloqueo de su función está directamente relacionado con un efecto neuroprotector en algunas patologías como encefalitis autoinmune experimental (EAE), lo que implica a ALCAM en daño neuronal [31].

La administración de MDMA a ratas Dark Agouti produce efectos similares a los observados en humanos. La MDMA provoca, como en aquellos, un aumento inmediato en la temperatura corporal de los animales que desempeña un importante papel modulador en el desarrollo del daño cerebral [2] y una lesión neuronal serotonina-específica caracterizada por la disminución a los siete días de los niveles de 5-HT y de 5-HIAA en corteza e hipocampo, ambas regiones sensibles a MDMA, sin afectar a otras monoaminas como dopamina. Entre los procesos tempranos producidos por la administración de MDMA, nuestros estudios han demostrado que se produce una respuesta inflamatoria definida por la regulación de parte de los componentes implicados en la señalización mediada por IL-1: aumento sig-

nificativo en los niveles de esta citocina, aumento de IL-1ra en corteza e hipotálamo, disminución selectiva del receptor tipo 1 de IL-1 (IL1-RI) en hipotálamo que se mantiene hasta las seis horas y aumento en la activación glial que se hace máxima a las 24 horas [7][14][15]. Induce, además, un aumento en la capacidad de unión al DNA del factor de transcripción NFκB implicado en la transcripción de genes proinflamatorios, incluida la propia IL-1 [17]. Los resultados presentados en este trabajo amplían el espectro de efectos provocados por MDMA en relación a la respuesta inflamatoria temprana en tanto que hemos observado un aumento en la expresión de la molécula de adhesión ALCAM en el tejido cerebral. El proceso inflamatorio desarrollado por MDMA es susceptible de ser parcialmente prevenido por el co-tratamiento con compuestos con actividad antiinflamatoria, tales como agonistas del receptor cannabinoide CB2 [14] o minociclina [17], afectando el primero al aumento de los niveles de ILra y la disminución del receptor IL-1RI producidas por MDMA, y el segundo a la unión de NFκB a DNA, la liberación de IL-1β y la activación glial en corteza cerebral. Ambos tratamientos han demostrado tener un efecto parcialmente protector. Ibuprofeno es un compuesto con actividad antiinflamatoria que, al igual que en los casos descritos anteriormente, ha demostrado ser neuroprotector en diferentes modelos de daño neuronal, cuyo mecanismo de acción se traduce en la inhibición de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 [37]. En nuestro modelo, la administración de dos dosis de ibuprofeno por vía subcutánea 30 minutos antes y 4,5 horas después de administrar la MDMA tiene un efecto sobre ALCAM cuya expresión en vasos disminuye en comparación con los niveles tras la administración única de MDMA. Esta disminución se correlaciona con una atenuación del daño cerebral en tanto que los animales tratados con ibuprofeno además de MDMA presentan niveles más elevados de serotonina y de su transportador específico (SERT). Ibuprofeno comparte con otros agentes antiinflamatorios no-esteroides (AINE) su actividad antipirética, disminuyendo la temperatura corporal en estados febriles. Si bien el régimen de dosis de ibuprofeno para el estudio se seleccionó con objeto de no alterar la hipertermia característica producida por la MDMA, sí observamos diferencias en la cinética de recuperación de la temperatura corporal en los animales que fueron tratados con ibuprofeno. En este sentido, y puesto que la hipertemia es un importante modulador en la severidad de la lesión cerebral producida por MDMA, no podemos descartar que ibuprofeno, al actuar sobre la hipertermia, reduzca el daño cerebral producido por MDMA. Sin embargo, el hecho de que la protección del daño sea región espe-

cífica, produciéndose en corteza pero no en hipocampo, sugiere que esto no es un efecto general sino específico de la acción de ibuprofeno, que, en tal caso, produciría una prevención parcial del daño que podría estar asociada a la disminución ALCAM en los vasos. Una posibilidad es que la pauta de administración de ibuprofeno utilizada en este estudio sea insuficiente para obtener una respuesta neuroprotectora mayor, siendo quizá necesaria una administración continua durante el periodo de siete días en que se establece el daño cerebral. En este sentido, las dosis de ibuprofeno utilizadas en otros modelos de daño cerebral son mayores y más largas en el tiempo [38-40]. Deberán utilizarse, igualmente, dosis y/o tiempos de administración de ibuprofeno que no afecten a la temperatura del animal y que excluyan a la temperatura como factor protector. En todo caso, el aumento producido por MDMA de ALCAM le hace ser candidata a nuevos estudios dirigidos a su bloqueo funcional incluyendo biofármacos, como anticuerpos monoclonales de alta especificidad, con objeto de interferir el proceso autoinmune y el daño cerebral [41][42], como ocurre para otras moléculas de adhesión en enfermedades o situaciones que cursan con inflamación: trasplantes [43][44], colitis ulcerosa [45], daño axonal [46] o infarto cerebral [47]. ■

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1):232-40.
2. Green AR, Mehan AO, Elliott JM, O'Shea E, Colado MI. The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, «ecstasy»). *Pharmacol Rev* 2003; 55:463-508.
3. Stone DM, Johnson M, Hanson GR, Gibb JW. A comparison of the neurotoxic potential of methylenedioxyamphetamine (MDA) and its N-methylated and N-ethylated derivatives. *Eur J Pharmacol* 1987; 134:245-8.
4. Escobedo I, Peraile I, Orío L, Colado MI, O'Shea E. Evidence for a role of Hsp70 in the neuroprotection induced by heat shock pre-treatment against 3,4-methylenedioxyamphetamine toxicity in rat brain. *J Neurochem* 2007; 101:1272-83.
5. Gudelsky GA, Nash JF. Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxyamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J Neurochem* 1996; 66:243-9.
6. Steele TD, Nichols DE, Yim GK. Stereochemical effects of 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA) and rela-

- ted amphetamine derivatives on inhibition of uptake of [3H]monoamines into synaptosomes from different regions of rat brain. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:2297-303.
7. O'Shea E, Orio L, Escobedo I, *et al.* MDMA-induced neurotoxicity: long-term effects on 5-HT biosynthesis and the influence of ambient temperature. *Br J Pharmacol* 2006; 148:778-85.
  8. Battaglia G, Sharkey J, Kuhar MJ, De Souza EB. Neuroanatomic specificity and time course of alterations in rat brain serotonergic pathways induced by MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine): assessment using quantitative autoradiography. *Synapse* 1991; 8:249-60.
  9. Scanzello CR, Hatzidimitriou G, Martello AL, Katz JL, Ricaurte GA. Serotonergic recovery after (+/-)3,4-(methylenedioxy) methamphetamine injury: observations in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264:1484-91.
  10. Fischer C, Hatzidimitriou G, Wlos J, Katz J, Ricaurte G. Reorganization of ascending 5-HT axon projections in animals previously exposed to the recreational drug (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, «ecstasy»). *J Neurosci* 1995; 15:5476-85.
  11. Urban NB, Girgis RR, Talbot PS, Kegeles LS, Xu X, Frankle WG, *et al.* Sustained recreational use of ecstasy is associated with altered pre and postsynaptic markers of serotonin transmission in neocortical areas: a PET study with [<sup>11</sup>C]DASB and [<sup>11</sup>C]MDL 100907. *Neuropsychopharmacol* 2012 37:1465-73.
  12. Kish SJ, Lerch J, Furukawa Y, Tong J, McCluskey T, Wilkins D, *et al.* Decreased cerebral cortical serotonin transporter binding in ecstasy users: a positron emission tomography/[<sup>11</sup>C]DASB and structural brain imaging study. *Brain* 2010; 133:1779-97.
  13. Orio L, O'Shea E, Sánchez V, Pradillo JM, Escobedo I, Camarero J, *et al.* 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases interleukin-1beta levels and activates microglia in rat brain: studies on the relationship with acute hyperthermia and 5-HT depletion. *J Neurochem* 2004; 89:1445-53.
  14. Torres E, Gutiérrez-López MD, Borcel E, Peralte I, Mavado A, O'Shea E, *et al.* Evidence that MDMA («ecstasy») increases cannabinoid CB2 receptor expression in microglial cells: role in the neuroinflammatory response in rat brain. *J Neurochem* 2010; 113:67-78.
  15. Torres E, Gutiérrez-López MD, Mayado A, Rubio A, O'Shea E, Colado MI. Changes in interleukin-1 signal modulators induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA): regulation by CB2 receptors and implications for neurotoxicity. *J Neuroinflammation* 2011; 8:53.
  16. Mayado A, Torres E, Gutiérrez-López MD, Colado MI, O'Shea E. Increased interleukin-1beta levels following low dose MDMA induces tolerance against the 5-HT neurotoxicity produced by challenge MDMA. *J Neuroinflammation* 2011; 8:165.
  17. Orio L, Llopis N, Torres E, Izco M, O'Shea E, Colado MI. A study on the mechanisms by which minocycline protects against MDMA («ecstasy»)-induced neurotoxicity of 5-HT cortical neurons. *Neurotox Res* 2010; 18:187-99.
  18. Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15769-74.
  19. Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:13496-500.
  20. Tikka TM, Koistinaho JE. Minocycline provides neuroprotection against N-methyl-D-aspartate neurotoxicity by inhibiting microglia. *J Immunol* 2001; 166:7527-33.
  21. Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD, *et al.* Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci* 2004; 24:2182-90.
  22. Engelhardt B. T cell migration into the central nervous system during health and disease: Different molecular keys allow access to different central nervous system compartments. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 2010; 1:79-93.
  23. Stanimirovic D, Satoh K. Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. *Brain Pathol* 2000; 10:113-26.
  24. Tachezy M, Zander H, Marx AH, Stahl PR, Gebauer F, Izbicki JR, *et al.* ALCAM (CD166) expression as novel prognostic biomarker for pancreatic neuroendocrine tumor patients. *J Surg Res* 2011; 170:226-32.
  25. Tachezy M, Effenberger K, Zander H, Minner S, Gebauer F, Vashist YK, *et al.* ALCAM (CD166) expression and serum levels are markers for poor survival of esophageal cancer patients. *Int J Cancer* 2012; *Int J Cancer* 2012; 131:396-405.
  26. Minner S, Kraetzig F, Tachezy M, Killic E, Graefen M, Wilczak W, *et al.* Low activated leukocyte cell adhesion molecule expression is associated with advanced tumor stage and early prostate-specific antigen relapse in prostate cancer. *Hum Pathol* 2011; 42:1946-52.
  27. Piao D, Jiang T, Liu G, Wang B, Xu J, Zhu A. Clinical implications of activated leukocyte cell adhesion molecule expression in breast cancer. *Mol Biol Rep* 2012; 39:661-8.
  28. Van Kempen LC, Van den Oord JJ, Van Muijen GN, Weidle UH, Bloemers HP, Swart GW. Activated leukocyte cell ad-

- hesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin. *Am J Pathol* 2000; 156:769-74.
29. Masedunskas A, King JA, Tan F, Cochran R, Stevens T, Sviridov D, *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration. *FEBS Lett* 2006; 580:2637-45.
  30. Sato C, Matsuda T, Kitajima K. Neuronal differentiation-dependent expression of the disialic acid epitope on CD166 and its involvement in neurite formation in Neuro2A cells. *J Biol Chem* 2002; 277:45299-305.
  31. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 2008; 9:137-45.
  32. Escobedo I, O'Shea E, Orio L, Sánchez V, Segura M, De la Torre R, *et al.* A comparative study on the acute and long-term effects of MDMA and 3,4-dihydroxymethamphetamine (HHMA) on brain monoamine levels after i.p. or striatal administration in mice. *Br J Pharmacol* 2005; 144:231-41.
  33. Yousif S M-CC, Roux F, Scherrmann JM, Declèves X. Expression of drug transporters at the blood-brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy. *Brain Res* 2007; 1134:1-11.
  34. Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62:127-36.
  35. Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke* 2002; 33:2115-22.
  36. Gires O. Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers. *Cell Mol Life Sci.* 2011; 68:4009-22.
  37. Hofbauer R, Hofbauer L, Moser D, Salfinger H, Speiser W, Frass M, *et al.* Leukocyte migration: a new triple migration chamber assay allows investigation of various cell interactions simultaneously. *Life Sci* 1998; 63:1725-37.
  38. Carty ML, Wixey JA, Reinebrant HE, Gobe G, Colditz PB, Buller KM. Ibuprofen inhibits neuroinflammation and attenuates white matter damage following hypoxia-ischemia in the immature rodent brain. *Brain Res* 2011; 1402:9-19.
  39. Antezana DF, Clatterbuck RE, Alkayed NJ, Murphy SJ, Anderson LG, Frazier J, *et al.* High-dose ibuprofen for reduction of striatal infarcts during middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* 2003; 98:860-66.
  40. Park EM, Cho BP, Volpe BT, Cruz MO, Joh TH, Cho S. Ibuprofen protects ischemia-induced neuronal injury via up-regulating interleukin-1 receptor antagonist expression. *Neuroscience* 2005; 132:625-31.
  41. Steinman L. Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:510-8.
  42. Luster AD, Alon R, Von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 2005; 6:1182-90.
  43. Vincenti F, Mendez R, Pescovitz M, Rajagopalan PR, Wilkinson AH, Butt K, *et al.* A phase I/II randomized open-label multicenter trial of efalizumab, a humanized anti-CD11a, anti-LFA-1 in renal transplantation. *Am J Transplant* 2007; 7:1770-7.
  44. Mareckova H, Havrdova E, Krasulova E, Vankova Z, Koberova M, Sterzl I. Natalizumab in the treatment of patients with multiple sclerosis: first experience. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1110:465-73.
  45. Jakobovits SL, Jewell DP, Travis SP. Infliximab for the treatment of ulcerative colitis: outcomes in Oxford from 2000 to 2006. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25:1055-60.
  46. Gunnarsson M, Malmstrom C, Axelsson M, Sundstrom P, Dahle C, Vrethem M, *et al.* Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol* 2011; 69:83-9.
  47. Vemuganti R, Dempsey RJ, Bowen KK. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke* 2004; 35:179-184.

#### Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.