

## **AVALUACIÓ DELS EFECTES CRÒNICS DE LA MDMA (ÈXTASI) EN LA FERTILITAT I LA REPRODUCCIÓ EN RATA MASCLE**

Marta Barenys,<sup>1</sup> Núria Macià,<sup>1</sup> Lydia Camps,<sup>2</sup> Joaquín de Lapuente,<sup>2</sup> Jesús Gómez-Catalán,<sup>1</sup> Javier González-Linares,<sup>2</sup> Miquel Borràs,<sup>2</sup> Miguel Rodamilans<sup>1</sup> i Joan M. Llobet<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GRET-CERETOX, Unitat de Toxicologia, Departament de Salut Pública, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona.

Av. Joan XXIII, s/n. 08028 Barcelona. [mbarenys@ub.edu](mailto:mbarenys@ub.edu).

<sup>2</sup>GRET-CERETOX, Unitat de Toxicologia Experimental i Ecotoxicologia, Parc Científic de Barcelona.

---

### *Resum*

La MDMA, droga d'abús coneguda, és consumida principalment per població jove. A aquesta edat és d'especial rellevància prendre en consideració els efectes sobre el sistema reproductor. L'impacte de la MDMA en la salut ha estat repetidament documentat, però els seus efectes sobre la reproducció encara no s'han estudiat amb profunditat. El consum de MDMA afecta diferents sistemes de neurotransmissors com el serotoninèrgic, el dopaminèrgic i el noradrenèrgic, que estan implicats en el control neuroendocrí de les funcions reproductores. En aquest estudi s'ha avaluat la influència de l'èxtasi sobre la fertilitat i reproducció en rates mascles. La MDMA es va administrar per via SC a rates mascle SD un cop al dia, tres dies consecutius per setmana, simulant el consum associat al cap de setmana. Es van administrar 0,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg o solució salina (control) durant 12 setmanes, cobrint l'inici de la pubertat i l'arribada a la maduresa sexual. En la meitat dels animals es van avaluar paràmetres hormonals (LH, FSH i testosterona), hematològics, bioquímics, histològics, genotoxicològics (test d'esperma Comet), testiculars i de l'esperma (pes d'epidídim i testicle, mobilitat, morfologia i quantificació d'espermatozoides i quantificació d'espermàtides). La resta dels animals es van aparellar amb femelles no tractades, sexualment receptives, per avaluar els índexs d'aparellament i d'embaràs. Les úniques diferències trobades van ser un augment significatiu de la incidència de dany en el DNA en el test Comet en espermatozoides i degeneració tubular i edema intersticial en els testicles. La degeneració tubular decreixia amb la dosi, mentre que l'edema intersticial augmentava. Els epidídimis eren normals en tots els grups experimentals i plens d'espermatozoides madurs. L'exposició a MDMA no va afectar la mobilitat i la morfologia dels espermatozoides en cap dosi. Els resultats de l'estudi d'aparellament no van mostrar diferències significatives en els índexs d'aparellament i d'embaràs ni en el nombre de llocs d'implantació. Aquest estudi omple el buit de coneixement existent sobre els efectes crònics de la MDMA en la funció reproductora amb un disseny experimental realista. Els resultats mostren dades patològiques descrites per primera vegada. Tenint en consideració la major sensibilitat en humans, es manté la preocupació sobre els efectes en la salut reproductora. Així, s'haurien de realitzar més estudis en rata per entendre els mecanismes i per clarificar la rellevància patològica en humans.

**Paraules clau:** èxtasi, MDMA, 3,4-metilendioximetamfetamina, rata, fertilitat masculina, administració crònica.

### *Abstract*

MDMA, a well known drug of abuse, is consumed mainly by young population. At this age, it is especially relevant to take into consideration all the effects on the reproductive system. The impact of MDMA on the health has been repeatedly documented in the past, but its effects on reproduction have not yet been deeply studied. MDMA consumption affects several neurotransmitter systems such as serotonergic, dopaminergic and norepinephrine which are implied in the neuroendocrine control of reproductive functions. In this study the influence of ecstasy on the fertility and reproduction of the male rat was assessed. MDMA was administered (SC) to SD male rats once a day, three consecutive days a week, simulating human week-end associated consumption. 0.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg or saline (control) were given during 12 weeks, covering the puberty onset and the sexual maturity achievement. Hormonal (LH, FSH and testosterone), haematological, biochemical, histological, genotoxicological (Comet test in sperm) and, testicular and sperm parameters (mobility, morphology and quantification of spermatozoa and spermatids, epididymides and testes weight), were evaluated in half of the animals. The remaining animals were mated with untreated sexually receptive females to evaluate the mating and pregnancy rates. The only differences found were a significantly higher incidence of DNA damage in Comet Test in sperm, and tubular degeneration and interstitial oedema in testes. The tubular degeneration was decreasing with dose while the interstitial oedema was increasing. Epididymides were normal in all experimental groups and filled with mature spermatozoa. Exposure to MDMA at all dose levels did not affect sperm motility and morphology. The results of mating study showed no significant differences in mating and pregnancy rates and num-

ber of implantation sites. This study fills the existing gap of knowledge about the chronic effects of MDMA in reproductive function using a realistic experimental design. The results show some pathological data described by the very first time. Taking into account the higher sensitivity of human male, some concerns about the effects on the reproductive health remain. Thus, further studies should be carried out in rats to understand the mechanism, and to clarify the pathological relevance in humans.

**Key words:** extasis, MDMA, 3,4-metylendioxymetamphetamine, rat, male fecundity, chronic administration.

## INTRODUCCIÓ

La 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA, «èxtasi») és una droga d'abús que durant els últims vint anys ha augmentat la seva popularitat a Europa i Amèrica del Nord. La consumeixen principalment joves en entorns de festa i música (*raves*). En general, l'abús no mostra un fort patró addictiu; la majoria de consumidors de MDMA en prenen de manera intermitent, durant festes que duren tota la nit, una sola nit o al llarg del cap de setmana.

La MDMA és un derivat sintètic amfetamínic amb accions psicotròpiques que inclouen efectes estimulants similars als amfetamínics i efectes entactògens. Segons l'últim informe de l'European Monitoring Centre for Drugs, 9,5 milions d'europaus han provat la MDMA (3 % de la població) i gairebé 3 milions n'han consumit en l'últim any (EMCDDA, 2007).

Els efectes potencials de la MDMA en la funció reproductora, segons el nostre coneixement, no han estat extensament estudiats. Des d'un punt de vista de salut pública, és una qüestió important: una considerable proporció de joves que està en edat fèrtil i està consumint una substància que podria comprometre la seva capacitat reproductora. Des d'un punt de vista toxicològic, es tracta d'una qüestió pertinent, ja que algunes de les diferents vies neurològiques alterades per la MDMA contribueixen, en part, al control neuroendocrí de les funcions reproductores.

## MATERIAL I MÈTODES

Rates mascles Sprague-Dawley de 100-125 g, estabulades en condicions estàndard. La MDMA va ser cedida per la Delegació del Govern a Catalunya (Àrea de Sanitat) i purificada al Laboratori de Química Orgànica de la Facultat de Farmàcia de la UB, (99,5 % de puresa).

Es va administrar MDMA (0,5 mg/kg, 5 mg/kg i 10 mg/kg) o solució salina a 20 rates per grup per via SC un cop al dia, tres dies consecutius a la set-

mana durant 12 setmanes. En 10 animals de cada grup es van avaluar paràmetres hormonals, hematològics, bioquímics, histològics, genotoxicològics, testiculars i de l'esperma. La resta dels animals es van aparellar amb femelles receptives no tractades sexualment. El pes dels animals, el consum d'aigua i menjar i aspectes generals de salut van ser supervissats durant tot l'experiment.

### *Paràmetres hormonals, hematològics i bioquímics.*

La LH i FSH de rata es van determinar per RIA [<sup>125</sup>I] heterogeni de doble anticòs amb separació magnètica (Amersham Biosciences). La testosterona es va determinar per immunoassaig de micropartícules quimioluminiscent (Abbot Diagnostics). Es van utilitzar els procediments estàndard de laboratori clínic per a la determinació de paràmetres hematològics i de bioquímica sèrica.

### *Tests de genotoxicitat*

El Test de micronuclis es va realitzar en eritròcits circulants seguint la guia OECD 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. El test Comet es va realitzar en espermatozoides de l'epidídim seguint el protocol de Haines *et al.*, 2002 modificat.

### *Histopatologia de testicles i epidídims.*

Els testicles i epidídims drets es van fixar en Bouin, es van incloure en parafina, es van tallar a 5 µm de gruix i es van tenyir amb hematoxilina-eosina.

### *Paràmetres testiculars i de l'esperma*

Es va avaluar la mobilitat de l'esperma seguint el mètode i el sistema de puntuació de Blazak *et al.* (1985), i la morfologia segons Wyrobek i Bruce, 1975. Per a la quantificació d'espermatozoides i espermàtides es van seguir els protocols descrits a Robb *et al.* (1978) i Llobet *et al.* (1993).

**Taula 1.** Efectes de l'exposició crònica a MDMA en el consum d'aigua i menjar i en el pes final

	MDMA mg/kg			
	Control	0,5	5	10
Consum d'aigua (ml/dia)	25,6 ± 2,9	26,5 ± 1,9	29,3 ± 1,9**	33,9 ± 1,5**
Consum de menjar (g/dia)	20,5 ± 0,7	19,9 ± 0,4	20,5 ± 0,6	22,3 ± 0,5**
Increment de pes corporal (g)	253,5 ± 22,5	242,8 ± 25,0	247,4 ± 26,4	270,2 ± 32,1
Pes corporal final (g)	394,9 ± 25,6	383,2 ± 24,6	386,9 ± 26,1	417,3 ± 32,7

\*\* $p < 0,01$ **Taula 2.** Absència de tendència relacionada amb la dosi en els efectes en la LH, FSH i testosterona

	MDMA mg/kg			
	Control	0,5	5	10
LH (ng/ml)	0,63 ± 0,29	1,04 ± 0,22**	0,51 ± 0,33	0,84 ± 0,32
FSH (ng/ml)	7,65 ± 1,64	8,04 ± 0,93	7,95 ± 1,71	9,05 ± 1,51
Testosterona (ng/ml)	5,47 ± 4,10	3,29 ± 1,27	5,82 ± 3,96	4,52 ± 2,97

\*\* $p < 0,01$ **Taula 3.** Efectes de l'exposició crònica a MDMA en el pes de testicles i epidídim i en paràmetres funcionals

	MDMA mg/kg			
	Control	0,5	5	10
Pes testicle (g)	1,89 ± 0,14	1,84 ± 0,16	1,91 ± 0,10	1,91 ± 0,17
Pes epidídim (g)	0,69 ± 0,06	0,66 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,65 ± 0,05
% d'espermatozoides mòbils	61,7 ± 13,6	67,3 ± 9,3	66,7 ± 11,1	66,6 ± 6,3
% d'espermatozoides anormals	1,7 ± 1,4	0,8 ± 0,9	1,2 ± 0,6	1,8 ± 1,0
Nre. d'espermatozoides ( $\times 10^7 \text{ g}^{-1}$ )				
per epidídim	47,36 ± 8,05	50,91 ± 17,85	64,93 ± 26,16 *	71,75 ± 21,68 *
per g d'epidídim	21,96 ± 4,47	29,50 ± 9,20 *	31,68 ± 12,10 *	32,98 ± 11,02 *
Nre. d'espermàtides ( $\times 10^7 \text{ g}^{-1}$ )				
per testicle	31,43 ± 5,46	29,50 ± 3,41	24,84 ± 2,76 **	35,02 ± 4,91
per g de testicle	16,65 ± 2,59	16,05 ± 1,90	13,01 ± 1,30 **	18,31 ± 1,84

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ 

### Índexs d'aparellament i embaràs

Deu animals per grup es van ajuntar amb femelles no tractades, sexualment receptives, durant una nit (1:1). L'aparellament es va confirmar per frotis vaginal. Per obtenir l'índex d'embaràs les femelles van ser sacrificades el dia 14 de gestació.

### Anàlisi estadística

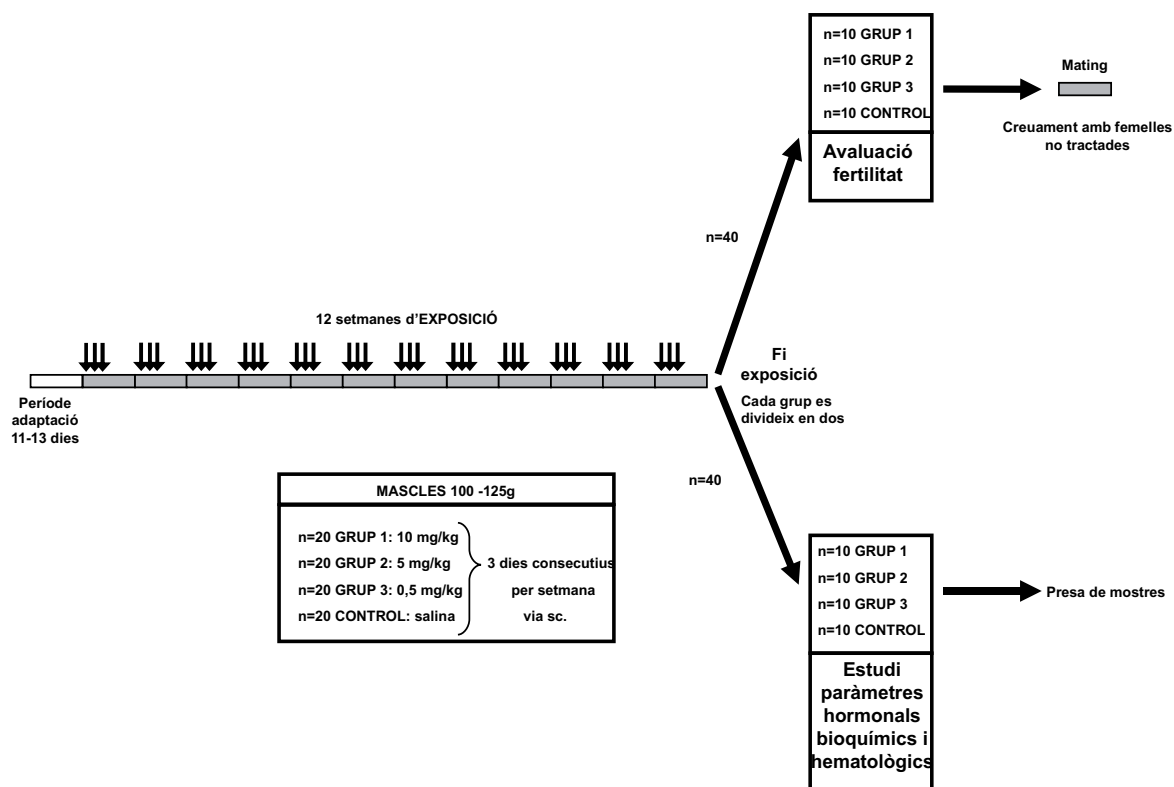
L'homogeneïtat de les variàncies de les variables contínues es va avaluar amb el test de Bartlett. La comparació estadística dels paràmetres homogenis es va fer utilitzant l'anàlisi de la variància (ANOVA) i el test de Duncan. La comparació estadística dels paràmetres no homogenis es va fer utilitzant el test de Kruskal Wallis. Les variables categòri-

ques es van analitzar mitjançant el test exacte de Fisher.

### RESULTATS I DISCUSSIÓ

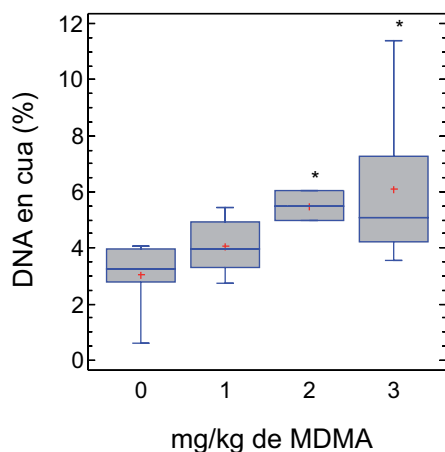
La present administració a llarg termini de MDMA va produir pocs efectes en els principals marcadors de salut generals. Els paràmetres hematològics i bioquímics i el pes corporal i dels òrgans eren normals i no es van observar diferències significatives entre grups. L'augment en el consum d'aigua observat en les dosis mitjana i alta és un efecte ben conegut (Campbell i Rosner, 2008) (vegeu la taula 1).

Les concentracions hormonals no van mostrar cap tendència relacionada amb la dosi (vegeu la taula 2). Això suggereix que l'administració crònica de MDMA no produeix efectes a llarg termini en l'eix



**Figura 1.** Estructura experimental: es va administrar MDMA SC (0,5 mg/kg, 5 mg/kg o 10 mg/kg) o solució salina a animals mascles durant 12 setmanes, tres dies consecutius per setmana.

hipotàlem-hipòfisi-gònada. Aquest resultat és oposat a les conclusions d'una publicació recent (Dickerson *et al.*, 2008). Tot i així, els autors d'aquesta publicació trobaven diferències significatives en els valors de GnRH mRNA hipotalàmic i testosterona només

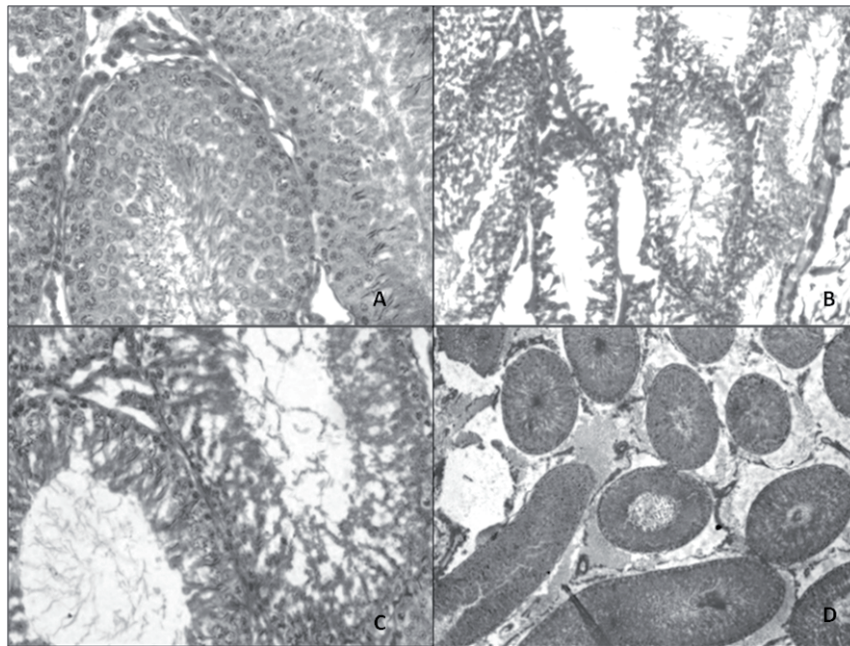


**Figura 2.** Test Comet: efecte genotòxic de l'exposició a MDMA en espermatozoides. Resultats expressats com a % de DNA a la cua. \* $p < 0,05$ .

quan barrejaven els resultats d'experiments amb exposició aguda i crònica.

El test de micronuclis no va indicar efecte clastogènic en eritròcits perifèrics, però el test Comet en espermatozoides de l'epidídim mostrava un increment del dany en el DNA relacionat amb la dosi (vegeu la figura 2). Aquestes diferències podrien ser originades per diverses raons: més sensibilitat del test Comet, diferent susceptibilitat dels dos tipus cel·lulars, diferent metabolisme de la MDMA o susceptibilitat del DNA dels espermatozoides a l'estrès per calor associat a la hipertèrmia induïda per la MDMA.

L'estudi histològic dels testicles del grup control va mostrar una espermatogènesi normal sense degeneració tubular. Al cap de 12 setmanes d'exposició, es va observar degeneració tubular en tots els grups tractats i edema intersticial en els grups de 5 mg/kg i 10 mg/kg (vegeu la figura 3). La degeneració tubular decreixia amb la dosi, mentre que l'edema intersticial augmentava (vegeu la figura 4). Els epidídimus eren normals en tots els grups i plens d'espermatozoides madurs.

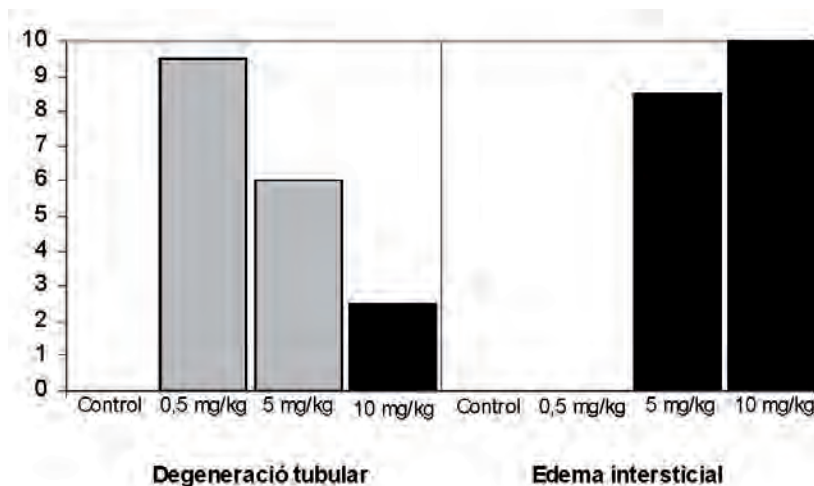


**Figura 3.** Imatges de la histologia dels testicles. A) Control; túbuls seminífers i interstici normals. B) Dosi baixa; degeneració tubular amb marcada depleció de l'epiteli germinal. C) Dosi baixa: degeneració tubular, detall. D) Dosi alta; edema intersticial.

L'exposició a MDMA no va afectar la mobilitat i morfologia dels espermatozoides. Hi va haver un augment significatiu en la quantificació d'espermatozoides en tots els grups i una disminució significativa en la quantificació d'espermàtides en el grup de 5 mg/kg (vegeu la taula 3).

La rellevància dels resultats presentats podria ser

limitada pel fet que els índexs d'aparellament i d'embaràs mostren que la fertilitat dels animals no estava compromesa. Atès que els humans presenten una fertilitat relativament més baixa i, en general, una major sensibilitat, es podria presentar un risc més elevat, a partir de tòxics, per a la funció reproductora, que en animals comuns de laboratori



**Figura 4.** Examen histològic. Semiquantificació dels signes patològics observats en els testicles del control i els altres grups tractats. El dany per cada caràcter individual està representat per una variable discontinua (assignada subjectivament a una classe). L'eix de les y representa la suma del producte de les freqüències de cada classe per un coeficient relacionat amb la intensitat del dany.

(Working, 1988; Amann, 1986). A més, hi ha evidències que el dany genètic pot ser transmès via esperma a la descendència (Olsen *et al.*, 2005). Fins i tot amb nivells significatius de dany al DNA, els espermatozoides mantenen la capacitat de fertilitzar els oòcits; ara bé, el desenvolupament posterior pot ser alterat o donar lloc a la mort del zigot. Les implicacions subsegüents són avortaments primerencs, malformacions congènites i malalties, que inclouen càncer, en la descendència (Ahmadi i Ng, 1999; Zenzes *et al.*, 1999; Brinkworth, 2000). Són necessaris més estudis per avaluar si els efectes en els testicles són reversibles i quins són els mecanismes implicats. Els resultats del present treball adverteixen de l'interès de més investigacions en l'impacte de l'abús de la MDMA en la fertilitat de consumidors humans.

## AGRAÏMENTS

Aquest estudi ha estat finançat per una beca FIS del Ministeri de Salut i Consum (PI061284). Agraïm l'assistència tècnica de Joan Serret i l'experta ajuda del Servei d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona.

## BIBLIOGRAFIA

- AHMADI, A.; NG, S. C. (1999). «Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa». *J. Exp. Zool.*, 284: 696-704.
- AMANN, R. P. (1986). «Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals». *Environ. Health Perspect.*, 70: 149-158.
- BLAZAK, W. F.; ERNST, T. L.; STEWART, B. E. (1985). «Potential indicators of reproductive toxicity: testicular sperm production and epididymal sperm number, transit time, and motility in Fischer 344 rats». *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5: 1097-1103.
- BRINKWORTH, M. H. (2000). «Paternal transmission of genetic damage: findings in animals and humans». *Int. J. Androl.*, 23: 123-135.
- CAMPBELL, G. A.; ROSNER, M. H. (2008). «The agony of ecstasy: MDMA (3,4-methylenedioxyamphetamine) and the kidney». *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 3: 1852-1860.
- DICKERSON, S. M.; WALKER, D. M.; REVERON, M. E.; DUVAUCHELLE, C. L.; GORE, A. C. (2008). «The recreational drug ecstasy disrupts the hypothalamic-pituitary-gonadal reproductive axis in adult male rats». *Neuroendocrinology*, 88: 95-102.
- EMCDDA (2007). *Annual report 2007: the state of the drugs problem in Europe*. Luxemburg: Office for Official Publications of the European Communities.
- HAINES, G. A.; HENDRY, J. H.; DANIEL, C. P.; MORRIS, I. D. (2002). «Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation». *Biol. Reprod.*, 67: 854-861.
- LLOBET, J. M.; COLOMINA, M. T.; SIRVENT, J. J.; DOMINGO, J. L.; CORBELLA, J. (1993). «Reproductive toxicity evaluation of vanadium in male mice». *Toxicolog.*, 80: 199-206.
- OLSEN, A. K.; LINDEMAN, B.; WIGER, R.; DUALE, N.; BRUNBORG, G. (2005). «How do male germ cells handle DNA damage?» *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 207: 521-531.
- ROBB, G. W.; AMANN, R. P.; KILLIAN, G. J. (1978). «Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats». *J. Reprod. Fertil.*, 54: 103-107.
- WORKING, P. K. (1988). «Male reproductive toxicology: comparison of the human to animal models». *Environ. Health Perspect.*, 77: 37-44.
- WYROBEK, A. J.; BRUCE, W. R. (1975). «Chemical induction of sperm abnormalities in mice». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72: 4425-4429.
- ZENZES, M. T.; PUY, L. A.; BIELECKI, R.; REED, T. E. (1999). «Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in embryos from smoking couples: evidence for transmission by spermatozoa». *Mol. Hum. Reprod.*, 5: 125-131.