



JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN
DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD 2ª ANUALIDAD 3ª ANUALIDAD X FINAL X

Número Expediente:

Investigador Principal: Rosario Moratalla Villalba

Otros Investigadores:

Noelia Granado Martínez, DNI 78898404D, Dra. en Biología

Sara Ares, DNI 71140895D, Lda. en Farmacia

Irene Ruiz de Diego, DNI 02536042Q, Lda. en Farmacia

Isabel Espadas, 05693329R, Lda. en Psicología

Patricia Garcia Sanz, Dra en Biología

Luz Mª Suarez González, Dra en Biología

Marco de Mesa Cáceres, DNI 53561663E, Ldo. en Biología

Mª Emilia Rubio Rubio, DNI 01394199, Técnico de laboratorio, Funcionario CSIC

Título Proyecto o subproyecto “Función de la vía Akt/GSK3 en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina y éxtasis”

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto)

Organismo: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Centro: Instituto Cajal

Departamento: Neurobiología Funcional y de Sistemas

Comunidad Autónoma: Madrid

Duración: 3 años

Fecha de inicio:

Fecha de finalización:

Año Convocatoria: 2009

Área Temática: Investigación Básica,



Palabras Clave: Psicoestimulantes, MDMA, Metanfetamina, Neurotoxicidad, adicción

Artículos publicados como consecuencia del primer año de la acción

1. Granado N, Ares-Santos S, O'Shea E, Vicario-Abejón C, Colado MI, **Moratalla R**. Selective vulnerability in striosomes and in the nigrostriatal dopaminergic pathway after methamphetamine administration : Early Loss of TH in Striosomes After Methamphetamine. *Neurotox Res.* 2010, 18: 48-58. **IF=3,02**
2. Ramiro-Fuentes S, Ortiz O, **Moratalla R**, and E Fernandez-Espejo. Intra-accumbal rimonabant is rewarding but induces aversion to cocaine in cocaine-treated rats, as does in vivo CB1R silencing: critical role for glutamate receptors. *Neuroscience*, 2010. 167:205-215. **IF=3,22**
3. Gramage E, Rossi L, Granado N, **Moratalla R**, Herradón G. Genetic inactivation of pleiotrophin triggers amphetamine-induced cell loss in the substantia nigra and enhances amphetamine neurotoxicity in the striatum. *Neuroscience*, 2010, 170: 308-316. **IF=3,22**
4. Ortiz O, Delgado-García JM, Espadas I, Dreyer JL, Bahí A, Trullas R, Guart A and R **Moratalla**. Associative learning and CA3-CA1 synaptic plasticity are impaired in D₁R null mice and hippocampal siRNA silenced D₁R mice. *Journal of Neuroscience*, 2010. 30:12288-12300, **IF= 7,28**

Artículos publicados durante el segundo año de la acción

5. Suárez J, Ortíz O, Puente N, Bermúdez-Silva FJ, Blanco E, Fernández-Llebrez P, Grandes P, de Fonseca FR, Moratalla R. Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain. *Neuroscience* 2011, 192:112-31. **IF=3,22**
6. Murer MG, Moratalla R. Striatal Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia: Common Mechanisms with Drug Abuse and Long Term Memory Involving D1 Dopamine Receptor Stimulation. *Front Neuroanat.* 2011; 5:51.
7. Granado N, Ares-Santos S, Oliva I, O'Shea E, Martin ED, Colado MI, Moratalla R. Dopamine D2-receptor knockout mice are protected against dopaminergic neurotoxicity induced by methamphetamine or MDMA. *Neurobiol Dis.* 2011, 42:391-403. **IF=5,12**
8. Moreno E, Hoffmann H, Gonzalez-Sepúlveda M, Navarro G, Casadó V, Cortés A, Mallol J, Vignes M, McCormick PJ, Canela EI, Lluís C, Moratalla R, Ferré S, Ortiz J, Franco R. Dopamine D1-histamine H3 receptor heteromers provide a selective link to



R Moratalla PNSD

MAPK signaling in GABAergic neurons of the direct striatal pathway. *J Biol Chem.* 2011; 286:5846-54. **IF=5,33**

9. Méndez-Gómez HR, Vergaño-Vera E, Abad JL, Bulfone A, Moratalla R, de Pablo F, Vicario-Abejón C. The T-box brain 1 (Tbr1) transcription factor inhibits astrocyte formation in the olfactory bulb and regulates neural stem cell fate. *Mol Cell Neurosci.* 2011. 46:108-21. **IF=3.86**

10. Johnson PL, Fitz S, Hollis J, Moratalla R, Lightman SL, Shekhar A, Lowry CA. Induction of c-Fos in “panic/defense”-related brain circuits following brief hypercarbic gas exposure. *J Psychopharmacol.* 2011; 25:26-36. **IF= 3,8**

11. Granado N, Lastres-Becker I, Ares-Santos S, Oliva I, Martín E, Cuadrado A, Moratalla R. Nrf2 deficiency potentiates methamphetamine-induced dopaminergic axonal damage and gliosis in the striatum. *Glia.* 2011 59:1850-63 **IF= 5,19**

Artículos publicados durante el tercer año de la acción

12. Antonelli MC, Guillemín GJ, Raisman-Vozari R, Del-Bel EA, Aschner M, Collins MA, Tizabi Y, Moratalla R, West AK. New Strategies in Neuroprotection and Neurorepair. *Neurotox Res. Neurotox Res.* 2012 21:49-56. **IF=3,02**

13. Madroñal N, Gruart A, Valverde O, Espadas I, Moratalla R, Delgado-García JM. Involvement of Cannabinoid CB1 Receptor in Associative Learning and in Hippocampal CA3-CA1 Synaptic Plasticity. *Cereb Cortex.* 2012. 22:550-66. **IF=6,85**

14. Ares-Santos S, Granado N, Oliva I, O'Shea E, Martín ED, Colado MI, Moratalla R. Dopamine D1 receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine. *Neurobiol Dis.* 2012. 45:810-20. **IF=5,12**

15. Espadas I, Darmopil D, Vergaño-Vera E, Ortiz O, Oliva I, Vicario-Abejón C, Martín ED, Moratalla R. L-DOPA-induced increase in TH-immunoreactive striatal neurons in parkinsonian mice: insights into regulation and function. *Neurobiol Dis.* Segunda revisión

16. Suárez LM, Solís O, Solís JM, Murer GM, Moratalla R. Structural and synaptic plasticity associated with L-DOPA-induced dyskinesias in two mouse models of Parkinson disease. Manuscrito preparado para su envío próximamente.

17. Castro-Hernández J, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Salas-Hernández-J, Barroso-Chinea P, García-Hernández S, Moratalla R and González-Hernández T. Mechanisms underlying subchronic regulation of the dopamine transporter by D3 receptor agonists. Enviado.

OBJETIVOS PLANTEADOS :(Transcribir los del proyecto original)

Objetivo 1. Establecer el patrón de neurotoxicidad de la metanfetamina en el cerebro anterior (caudado-putamen y núcleo accumbens) y medio (SN y ATV).



- 1.1 Patrón de neurotoxicidad de la metanfetamina en el cerebro anterior
- 1.2 Patrón de neurotoxicidad de la metanfetamina en el cerebro medio

Se estudiará si existe vulnerabilidad selectiva en los estriosomes y matriz del estriado y en las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal y mesolímbica y si este patrón es similar al patrón degenerativo del MDMA.

Objetivo 2. Evaluar la participación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la neurotoxicidad dopaminérgica que produce la metanfetamina y en la hipertermia asociada a la neurotoxicidad.

- 2.1 Establecer el papel de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la hipertermia inducida por metanfetamina.
- 2.2 Establecer el papel de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina

Objetivo 3. Evaluar la participación de la vía de señalización intracelular GSK3-Akt en los efectos neurotóxicos sobre el sistema dopaminérgico que induce la metanfetamina y la MDMA mediante estudios inmunocitoquímicos y moleculares utilizando real-time PCR. Utilizaremos animales dominantes negativos de la vía GSK3.

- 3.1 Efecto de la inactivación de la vía de GSK3 en la hipertermia inducida por metanfetamina y MDMA.
- 3.2 Efecto de la inactivación de la vía de GSK3 en la actividad motora condicionada inducida por metanfetamina y MDMA
- 3.3 Efecto de la inactivación de la vía de GSK3 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina y MDMA.
- 3.4 Así como la posible pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (SN) de los animales tratados con metanfetamina y su regulación vía GSK3
- 3.5 Efecto de la inactivación de la vía de GSK3 sobre el estrés oxidativo inducido por metanfetamina y MDMA.

Objetivo 4. Establecer la el papel del factor de transcripción Nrf2 sobre la neurotoxicidad inducida por metanfetamina y MDMA.

- 4.1 Efecto de la inactivación del factor de transcripción Nrf2 en la hipertermia inducida por metanfetamina y MDMA.
- 4.2 Efecto de la inactivación del factor de transcripción Nrf2 en la actividad motora condicionada inducida por metanfetamina y MDMA.
- 4.3 Efecto de la inactivación del factor de transcripción Nrf2 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina y MDMA. Se evaluará la TH, el transportador de la dopamina DAT y los niveles de aminas, dopamina, serotonina y sus metabolitos.
- 4.4 Efecto de la inactivación del factor de transcripción Nrf2 sobre la neuroinflamación inducida por metanfetamina y MDMA. Se evaluará la astrogliosis y microglía reactiva y la interleuquina 1 β (IL-1 β).



OBJETIVOS CONCRETOS ALCANZADOS: (Ordenar de igual forma que los planteados. En el caso de proyectos coordinados, el coordinador deberá describir además el desarrollo de la coordinación entre subproyectos en este año, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto)

A) **En la primera anualidad** se desarrollaron los objetivos: 1.1, 1.2 y la mitad de los objetivos 2.1 y 2.2. que son los correspondiente al receptor D2.

B) **En la segunda anualidad** se desarrollaron y completado los siguientes objetivos: la otra mitad de los objetivos 2.1 y 2.2, los correspondientes al receptor dopaminérgico D1 y los objetivos 4.1, 4.2, y 4.3.

C) **En la tercera anualidad** se han desarrollado los objetivos restantes, a saber: 4.4 relacionados con el factor de transcripción Nrf2 y los objetivos 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4 correspondientes con la vía de señalización de GSK3.

LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE DETALLAN A CONTINUACIÓN: Los objetivos alcanzados se han conseguido de acuerdo con el planteamiento inicial desde el punto de vista científico.

Objetivo 4. Establecer el papel del factor de transcripción Nrf2 sobre la neurotoxicidad inducida por metanfetamina y MDMA.

4.4 Efecto de la inactivación del factor de transcripción Nrf2 sobre la neuroinflamación inducida por metanfetamina y MDMA. Se evaluará la astrogliosis y microglía reactiva y la interleuquina 1 β (IL-1 β).

Durante esta tercera anualidad hemos terminado el objetivo 4 que habíamos empezado en la segunda anualidad, como se detalla a continuación.

Objetivo 4.4. La administración de metanfetamina provoca neurotoxicidad dopaminérgica en la vía nigroestriatal del cerebro como se ha demostrado previamente en nuestro laboratorio. Para estudiar el papel del factor de transcripción Nrf2 en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina, se realizaron experimentos con ratones Knock outs (Nrf2^{-/-}), a los que se les administró 3 inyecciones de 5 mg/kg de la droga y fueron sacrificados 24 horas después. En ellos se evaluó el aumento de temperatura corporal y la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina mediante marcadores dopaminérgicos como TH y DAT y los niveles de dopamina y sus metabolitos. Como se describió en la memoria de la segunda anualidad, estos ratones Nrf2^{-/-} presentan una mayor hipertermia y un aumento en la neurotoxicidad dopaminérgica respecto a los ratones WT tras la administración de metanfetamina. De



R Moratalla PNSD

acuerdo con estos resultados, los ratones Nrf2^{-/-} presentan una mayor vulnerabilidad al daño dopaminérgico inducido por METH, también hemos observado una mayor reacción glial en los ratones Nrf2^{-/-} que en los WT, tanto de la microglia reactiva como en la astroglia, viendo aumentados los niveles de GFAP, Mac-1 e Iba-1. Esto se ha podido demostrar mediante experimentos utilizando técnicas de inmunohistoquímica y RT-PCR. Este aumento en la astrogliosis y microgliosis se produce tanto en el estriado como en la sustancia negra.

En cuanto a las interleuquinas, hemos observado un aumento de la interleuquina proinflamatoria TNF-alfa, IL-15 e IL-1B tras la administración de METH, en los dos genotipos estudiados, aunque este aumento es mayor en los ratones Nrf2^{-/-}. La METH también produjo un aumento de las enzimas antioxidantes como Gclm, GPx, Cu/ZnSOD y MnSOD, aunque este incremento en la expresión de estas enzimas sólo se observó en los ratones WT (Fig.2). De manera que la inactivación del factor Nrf2 inhibe la inducción de estas enzimas estimuladas por METH. Además, la inactivación de Nrf2 potencio la degeneración de neuronas en el estriado provocado por la metanfetamina y detectado con la tinción de Fluoro-Jade (Fig 3). También se realizaron estudios de Calcio en los astrocitos del estriado, observando que la metanfetamina provocó un incremento en el calcio intracelular en ambos genotipos (Fig 4).

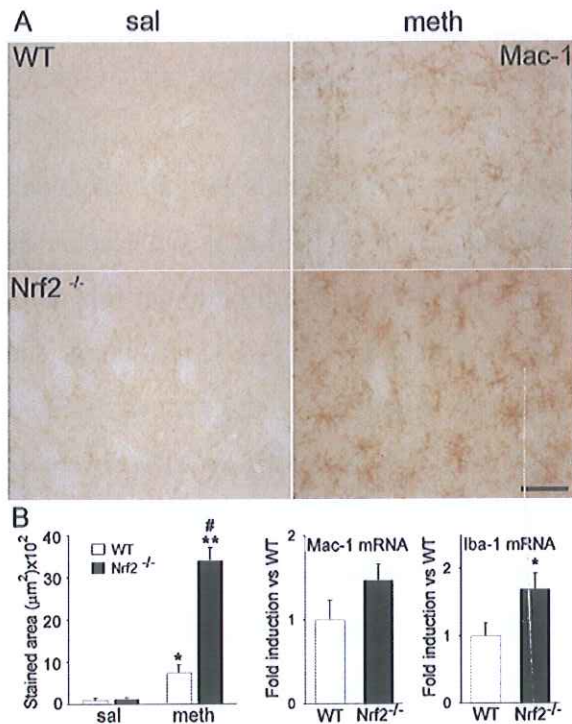


Figura 1. La inactivación genética del factor de transcripción Nrf2, potencia significativamente la astrogliosis y microgliosis inducida por metanfetamina en el estriado de los ratones.

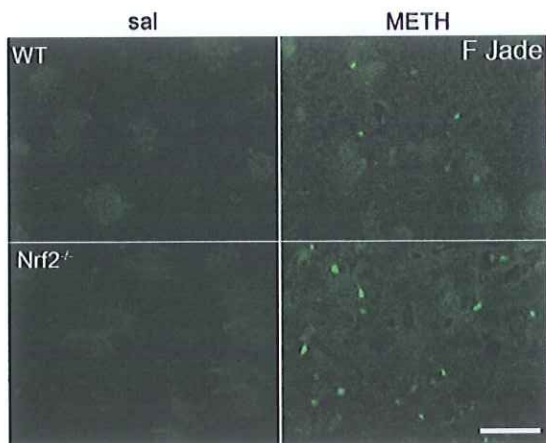


Figura 3. La deficiencia de Nrf2 potencia la degeneración de neuronas en el estriado provocado por la metanfetamina y detectado con la tinción de Fluoro-Jade.

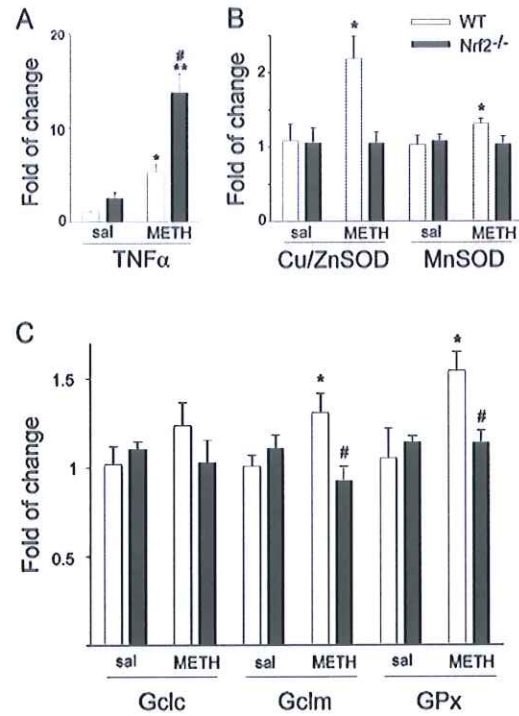


Figura 2. La inactivación genética del factor de transcripción Nrf2, potencia significativamente el aumento de TNF alfa pero disminuye el aumento de enzimas antioxidantes tras metanfetamina.

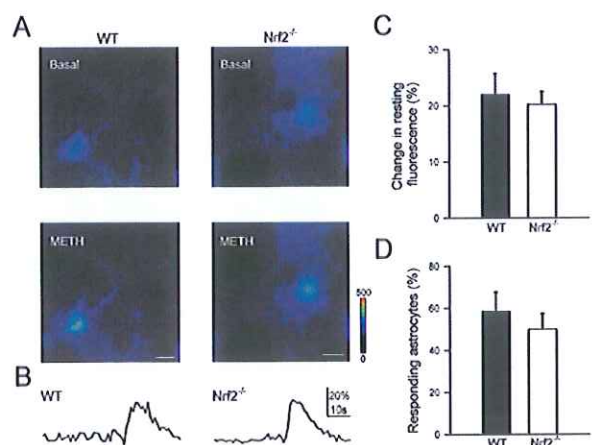


Figura 4. La inactivación genética de Nrf2, no modifico el incremento de Ca intracelular provocado por METH en los astrocitos del estriado.



Objetivo 3. Evaluar la participación de la vía de señalización intracelular GSK3-Akt en los efectos neurotóxicos sobre el sistema dopaminérgico que induce la metanfetamina y la MDMA mediante estudios inmunocitoquímicos y moleculares utilizando real-time PCR. Utilizaremos animales dominantes negativos de la vía GSK3.

Para llevar a cabo este objetivo se han realizado experimentos con ratones knock outs dobles transgenicos, Tet/DN-GSK-3, cedidos por el Dr JJ Lucas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM) como se indicó en la solicitud del proyecto. Estos ratones tienen una disminución de la actividad de GSK-3 y por tanto una disminución de la fosforilación de Tau. El incremento en la actividad de GSK-3 contribuye a la etiología de desordenes crónicos como la enfermedad de Alzheimer y la diabetes, lo que apoya el potencial terapéutico de los inhibidores de GSK-3. Con respecto a la neurodegeneración, el aumento de la actividad de GSK-3 resulta en un aumento de la apoptosis neuronal e inhibidores de GSK-3 han demostrado que tienen un efecto antiapoptótico y neuroprotector en muchos modelos de degeneración diferentes. La inhibición de GSK-3 podría inducir tumorigénesis a través de la desregulación de B-catenina-APC. Además, la inhibición *in vivo* por medios genéticos (ratones Knock outs constitutivos) provoca letalidad embrionaria. Por ello, el grupo del Dr JJ Lucas ha generado ratones transgénicos condicionales dominante-negativo-de GSK-3 (sistema de tetraciclina), para estudiar la inhibición crónica de GSK-3. De forma interesante, los ratones Tet/DN-GSK-3 crecieron normalmente y no se observaron formación de tumores en el cerebro. Sin embargo, se detectó apoptosis en los ratones Tet/DN-GSK-3 en áreas cerebrales involucradas en el control motor. En consecuencia, estos ratones mostraron un déficit en la coordinación motora. Pero la administración de doxiciclina provocó una vuelta a la normalidad, actividad regular de GSK-3 y en la apoptosis y actividad motora de estos animales.

La metanfetamina (METH) es un derivado de la anfetamina que provoca un daño en la vía nigroestriatal del cerebro como hemos demostrado en nuestro laboratorio en trabajos ya publicados. Esta droga produce un daño en el sistema dopaminérgico, de manera que se disminuyen marcadores dopaminérgicos como la TH y DAT, y provoca



R Moratalla PNSD

una reducción de dopamina y sus metabolitos, acompañados por inflamación y estrés oxidativo.

3.1 Efecto de la inactivación de la vía de GSK3 en la hipertermia inducida por metanfetamina y MDMA.

Para estudiar el papel de GSK-3, se emplearon ratones Tet/DN-GSK-3. Estos ratones junto con sus respectivos WT fueron tratados con 3 inyecciones de 5 mg/kg de METH o salino. Se evaluó la temperatura corporal, midiendo la temperatura rectal, de estos ratones 30 min y una hora después de cada una de las inyecciones de la droga. La METH provocó en los ratones WT un aumento de la temperatura rectal, llegando a 40.1 °C, 39.9 y 39.5 tras la primera, segunda y tercera inyección, respectivamente. Sin embargo, en los ratones transgénicos la metanfetamina solo produjo un aumento de 39.4, 39.1 y 38.5 tras cada inyección, observándose una disminución de 0.7-1.0°C en la hipertermia-inducida por metanfetamina. Estos resultados sobre la hipertermia confirman nuestra hipótesis de partida.

3.2 Efecto de la inactivación de la vía de GSK3 en la actividad motora condicionada inducida por metanfetamina y MDMA

Para estudiar el efecto de la inactivación de la vía de GSK3 en la actividad motora inducida por metanfetamina se trató a ratones Tet/DN-GSK-3 y WT con 3 inyecciones de 5 mg/kg de METH o salino y se midió la actividad locomotora en un open field en cajas individualizadas entre 1 y 2 horas después de la segunda inyección de la droga. No se observaron cambios significativos entre animales WT y los animales transgénicos en cuanto a la actividad motora. Es posible no observándose un aumento de la actividad como se esperaba, esto podría deberse a que debía haberse realizado entre 30 min y una hora tras la inyección de metanfetamina que es cuando se observa este aumento en la bibliografía.

3.3 Efecto de la inactivación de la vía de GSK3 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por metanfetamina.



R Moratalla PNSD

Para estudiar el papel de GSK-3, se emplearon ratones Tet/DN-GSK-3 y WT, que fueron tratados con 3 inyecciones de 5 mg/kg de METH o salino. Se evaluaron marcadores dopaminérgicos en el estriado como la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la producción de dopamina y el transportador de dopamina (DAT) mediante inmunohistoquímica. Debido al bajo número de ratones empleados por grupo se obtuvo una gran variabilidad en los datos obtenidos (Fig 5). También se evaluaron los niveles de dopamina y sus metabolitos mediante HPLC. La metanfetamina provocó 24 horas después de la inyección de la droga una disminución del contenido de dopamina en los ratones WT (alrededor del 50%), que prácticamente no se apreció en los ratones transgénicos (12%).

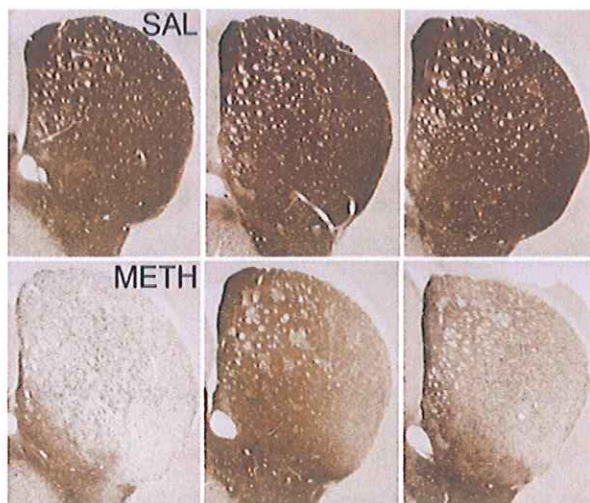


Figura 5. Los experimentos realizados con ratones Tet/DN-GSK-3 presentaron una gran variabilidad entre ratones tratados con metanfetamina como se muestra en la tinción de tirosina hidroxilasa (TH) que se emplea como marcador del sistema dopaminérgico para evaluar la neurotoxicidad inducida por metanfetamina en el estriado.

3.4 Efecto de la inactivación de la vía de GSK3 sobre el estrés oxidativo inducido por metanfetamina y MDMA.

Siguiendo el protocolo de administración de metanfetamina empleado en los apartados anteriores también se evaluaron marcadores de astrogliosis como GFAP y microgliosis como Mac-1 y marcadores de estrés como nNOS e iNOS. La administración de metanfetamina provocó un aumento de la gliosis reactiva tanto de la astrogliosis detectada por el aumento en la expresión de GFAP como de microglía reactiva observándose mayor señal de Mac-1 en el estriado de los ratones tratados con la



R Moratalla PNSD

droga de los ratones WT como de los ratones transgénicos, con el único inconveniente de que son datos muy dispersos debido a que se utilizaron ratones de varias camadas, con un número bajo de animales por camada, lo que da lugar a la gran dispersión de los resultados que obtenemos. Resultados similares se obtuvieron con iNOS y nNOS.

El problema al realizar los experimentos con estos ratones dobles transgénicos condicionales dominantes negativo es que se obtienen pocos animales por camada. Para utilizar un número adecuado de animales nos vemos en la obligación de aumentar las camadas y esto necesariamente aumenta la dispersión de los datos y complica la realización de experimentos para estudiar la neurotoxicidad provocada por metanfetamina. Por lo que nos hemos planteado estudiar el papel de GSK-3 empleando un inhibidor como es el litio. Ya que se ha observado que el tratamiento crónico con litio muestra similitudes con el modelo de Tet/DN-GSK-3 en los resultados de comportamiento y apoptosis (Gomez-Sintres and Lucas, 2010). Por ello, en estos momentos se están llevando a cabo los procesos necesarios para comenzar los tratamientos crónicos con litio previos a la administración de metanfetamina.

