



## RESUMEN FINAL PROYECTO INVESTIGACIÓN

**EXPEDIENTE: 2016I033**

**TÍTULO DEL PROYECTO:** Estudio del consumo de metanfetamina en la adolescencia como factor de riesgo para la adicción y la vulnerabilidad dopaminérgica en el adulto: papel de la glía y del glutamato

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Rosario Moratalla

**EQUIPO DE INVESTIGACIÓN (nombre y apellidos del resto del equipo de investigación):**

Lorena Orgaz, Guillermo Bueno Gil, Noelia Granado, Luz María Suarez, Patricia J García, Irene Ruiz de Diego, Oscar Solís Castrejón

**ENTIDAD BENEFICIARIA Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN:** CSIC, Instituto Cajal

---

### RESUMEN (1) (2):

El consumo de estimulantes de tipo anfetamínico (ATS) y, en particular, la metanfetamina (METH), se ha convertido en un problema de salud global. A pesar del elevado consumo de METH entre la población más joven, se conoce muy poco acerca de los efectos que tiene su consumo en adolescentes. Por ello, el objetivo de este proyecto es determinar si el consumo de METH en la adolescencia potencia la adicción y/o aumenta el riesgo a padecer parkinsonismo en la edad adulta. Nuestros resultados demuestran que la METH administrada en ratones a edades tempranas, produce la activación de procesos de tolerancia para algunos marcadores de neurotoxicidad y mecanismos de sensibilización a la adicción en la edad adulta. Además, hemos demostrado que, tras el daño neurotóxico producido por la METH en el estriado, se producen mecanismos de compensación acompañados de astrogliosis y microgliosis. En este sentido, nuestros resultados sugieren que la administración repetida de METH produce adaptaciones compensatorias al daño neurotóxico estriatal, lo que podría deberse a una disminución de los niveles citosólicos de dopamina. También, hemos demostrado que la presencia de aSyn humana mutada en un modelo genético de la enfermedad de Parkinson, produce cierta protección frente a los efectos degenerativos inducidos por METH en el estriado y la sustancia negra a edades tempranas, pero mayor susceptibilidad al daño dopaminérgico y la gliosis producida por la METH a edades avanzadas. Por último, hemos establecido el papel facilitador del receptor dopaminérgico D2 en las acciones de los psicoestimulantes mediadas por el receptor D1 y hemos determinado el papel de los astrocitos en la modulación de la plasticidad sináptica de las neuronas glutamatérgicas del núcleo accumbens tras la administración de METH.

### ABSTRACT (English):

The amphetamine-type stimulants (ATS) and, in particular, methamphetamine (METH) consumption, has become a global health problem. Despite increased awareness of METH consumption among young people, relatively little research has examined the effects of adolescent

---



METH consumption. Therefore, the objective of this project is to determine whether the consumption of METH in adolescence enhances addiction and/or increases the risk of suffering from parkinsonism in adulthood. Our results demonstrate that METH administered in mice at early ages produces the activation of tolerance processes for some markers of neurotoxicity and mechanisms of sensitization to addiction in adulthood. In addition, we have shown that, after the neurotoxic damage produced by METH in the striatum, compensatory mechanisms are produced accompanied by astrogliosis and microgliosis. In this sense, our results suggest that the repeated administration of METH produces compensatory adaptations to striatal neurotoxic damage, which could be due to a decrease in cytosolic dopamine levels. Furthermore, we have shown that the presence of mutated human  $\alpha$ Syn in a genetic model of Parkinson's disease produces some protection against the degenerative effects induced by METH in the striatum and substantia nigra at early ages, but increased susceptibility to dopaminergic damage and gliosis produced by METH in advanced ages. Finally, we have established the facilitating role of the dopaminergic D2 receptor in the actions of psychostimulants mediated by the D1 receptor and we have determined the role of astrocytes in modulating the synaptic plasticity of glutamatergic neurons of the nucleus Accumbens after METH administration.

**PALABRAS CLAVE (3):** metanfetamina, adicción, neurodegeneración dopaminérgica, glía, receptores dopaminérgicos, neuronas glutamatérgicas.

**KEY WORDS (English):** methamphetamine, addiction, dopaminergic neurodegeneration, glia, dopaminergic receptors, glutamatergic neurons.

#### **JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO Y OBJETIVOS:**

Los objetivos principales planteados en este proyecto son:

1. Estudiar si el consumo de metanfetamina en la adolescencia potencia la adicción en la edad adulta, y supone un factor de riesgo para el desarrollo de la Enfermedad de Parkinson.
2. Establecer el papel de la glía y la degeneración del sistema dopaminérgico en la adicción a metanfetamina.
3. Determinar el papel de las neuronas glutamatérgicas del ATV en la recaída a metanfetamina después de su consumo en la adolescencia.

#### **METODOLOGÍA Y DESARROLLO DEL PROYECTO. ANALISIS ESTADÍSTICO :**

En este proyecto se ha empleado una amplia variedad de técnicas altamente sofisticadas.

En el objetivo 1 se han llevado a cabo test conductuales para estudiar el comportamiento motor, empleando las cajas de actividad para medir locomoción y el rotarod para medir coordinación. También se han empleado las cajas de acondicionamiento espacial (CPP) para medir la preferencia por el lugar donde se ha administrada la METH. Para los estudios de neurotoxicidad se han realizado inmunohistoquímicas para marcadores dopaminérgicos como TH y DAT, marcadores de glía y astrocitos como Iba-1 y GFAP, así como la tinción de plata amino-cúprica, para ver la degeneración de las terminales dopaminérgicas en el estriado y la muerte de los cuerpos neuronales en la sustancia negra. También se han realizado estudios de análisis de imagen y contajes estereológicos.

En el objetivo 2 se han utilizado, además del condicionamiento espacial, el laberinto en cruz para medir ansiedad, y se han realizado inmunohistoquímicas para diferentes marcadores moleculares



como TH, factores de transcripción Fos (FosB y cFos), y la proteína pERK, así como marcadores gliales (GFAP e Iba-1). También se ha utilizado la tinción de plata para evaluar la degeneración.

Además, se han realizado otros experimentos que no estaban incluidos en la propuesta inicial del proyecto y que han surgido a través de una colaboración establecida con un grupo de investigación del Instituto Nacional sobre el Abuso de drogas (NIDA, EEUU), para desentrañar el papel del receptor dopaminérgico D3 en la adicción a METH. También se han llevado a cabo otros experimentos en colaboración con grupos de investigación expertos en adicción, como el grupo del Dr. Maldonado (Barcelona) y expertos en biología molecular, como el grupo del Dr. Trullas (Barcelona), para desentrañar el papel del receptor D2 en la sensibilización inducidos por psicoestimulantes como la cocaína y la anfetamina.

En el objetivo 3, hemos combinado técnicas de biología celular, optogenética y registros electrofisiológicos en secciones coronales de cerebro de ratón para probar la hipótesis de que la dopamina regula la expresión de GLT-1 astrocitario y el curso temporal de la transmisión sináptica glutamatérgica en el núcleo accumbens (NAc).

#### PRINCIPALES RESULTADOS:

En primer lugar, hemos demostrado que la **administración de metanfetamina (METH)** en ratones C57BL6 **a edades tempranas potencia** produce la activación de procesos de tolerancia para algunos marcadores de neurotoxicidad y mecanismos de sensibilización a la adicción en la edad adulta. Por otro lado, hemos observado que la administración de METH en un modelo transgénico de la EP que expresa la aSyn humana mutada produce menos daño que en los ratones WT a la edad de 3 y 6 meses, pero a medida que aumenta la edad de estos ratones, encontramos una mayor susceptibilidad al daño inducido por METH.

En segundo lugar, hemos demostrado que con el tiempo se produce una **reinervación dopaminérgica** después de la degeneración inducida por la administración de METH. Así, observamos recrecimiento de algunos de los tipos de fibras dopaminérgicas que contiene el estriado y, además, detectamos la presencia de estructuras similares a conos de crecimiento. También, hemos demostrado que **el tratamiento con METH produce una fuerte reacción glial (astrogliosis y microgliosis) en el estriado**. Observamos que el aumento de la expresión de GFAP (marcador de astrocitos) se produce 3 días después del tratamiento con METH, coincidiendo con el momento en el que se observa una reinervación parcial del estriado. Por el contrario, encontramos que la activación microglial coincide en el tiempo con el pico de máximo daño neuronal dopaminérgico, observado 1-2 días después del tratamiento con METH (Granado et al 2018).

También hemos demostrado que **el receptor de dopamina D2 tiene un papel facilitador en las acciones de los psicoestimulantes (derivados anfetamínicos) mediadas por el receptor D1** y, en particular, aquellas relacionadas con los efectos motores y adictivos. El **receptor D2** es importante para la respuesta motora aguda a cocaína y anfetamina y especialmente, **está implicado en la sensibilización motora inducida por estos psicoestimulantes**. Esto es importante porque la sensibilización se entiende como un índice de la adicción y del proceso adictivo. Además, hemos demostrado que la **inactivación genética del receptor D2 reduce el aumento de la expresión de dinorfina inducido por METH**, mediado por el receptor D1. Además, comprobamos que esta disminución es transcripcional, ya que se produce a nivel del ARN mensajero (Solís et al 2021).

Por último, hemos demostrado que **la activación de los astrocitos del NAc** tras el tratamiento con METH **reduce los niveles del transportador de glutamato astrocitario (GLT-1) y aumenta los**



**niveles de glutamato en las sinapsis glutamatérgicas** lo que conlleva a cambios en la plasticidad sináptica de estas neuronas, que son importantes en la adicción a los derivados anfetamínicos.

#### **APLICABILIDAD E IMPACTO SOCIO-SANITARIO DEL PROYECTO:**

Los resultados obtenidos en este proyecto nos han permitido demostrar que el consumo de METH en ratones a edades tempranas produce la activación de procesos de tolerancia para algunos marcadores de neurotoxicidad y mecanismos de sensibilización a la adicción en la edad adulta. Además, hemos demostrado que el consumo de METH produce mecanismos de compensación entre los que se incluye la reinervación dopaminérgica del estriado, que se acompañan de una fuerte respuesta glial. En conjunto, estos resultados sugieren que la sensibilización al consumo de METH podría estar determinada por adaptaciones compensatorias ante el daño neurotóxico inducido por la administración de METH. La identificación de los mecanismos de compensación que se producen en respuesta a la neurotoxicidad inducida por la METH es fundamental para comprender las bases neurobiológicas de la adicción e identificar nuevas dianas terapéuticas que permitan el diseño de estrategias dirigidas a prevenir la neurotoxicidad y favorecer la regeneración de una manera más efectiva que la actual.

Además, hemos demostrado que el receptor D2 tiene un papel facilitador en las acciones de los psicoestimulantes cocaína y anfetamina mediadas por el receptor D1, lo que pone de manifiesto el importante valor de los receptores dopaminérgicos y su posible potencial terapéutico en la adicción.

Por último, estamos estudiando el papel de los astrocitos en la plasticidad sináptica de las neuronas glutamatérgicas del NAc tras el tratamiento con METH. La identificación de los mecanismos de plasticidad sináptica implicados en la adicción a derivados anfetamínicos que están mediados por los astrocitos es fundamental para comprender el proceso adictivo y abre nuevos horizontes para el tratamiento de las adicciones.

#### **SÍNTESIS DE LOS ASPECTOS MÁS RELEVANTES QUE APORTA EL ESTUDIO:**

1. El consumo de METH en edades tempranas potencia el efecto adictivo de esta droga en la edad adulta.
2. Los ratones transgénicos que sobreexpresan la aSyn humana mutada, están protegidos frente al daño neurotóxico inducido por la METH a edades tempranas, pero muestran mayor susceptibilidad en edades avanzadas.
3. Con el paso del tiempo, la administración de METH produce adaptaciones compensatorias al daño neurotóxico estriatal que se acompañan de una fuerte respuesta glial.
4. El receptor dopaminérgico D2 tiene un papel facilitador en las acciones de la cocaína y anfetamina mediadas por el receptor D1.
5. La activación de los astrocitos inducida por el tratamiento con METH produce cambios en la plasticidad sináptica de las neuronas glutamatérgicas del NAc, que son importantes en la adicción a derivados anfetamínicos.

#### **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS GENERADAS (4):**



1. Granado N, Ares-Santos S, Tizabi Y, Moratalla R. Striatal Reinnervation Process after Acute Methamphetamine-Induced Dopaminergic Degeneration in Mice. *Neurotox Res.* 2018 Oct;34(3):627-639. doi: 10.1007/s12640-018-9925-z. Epub 2018 Jun 22. 10 citas.
2. Suarez LM, Alberquilla S, García-Montes JR, Moratalla R. Differential synaptic remodeling by dopamine in direct and indirect striatal projection neurons in *Pitx3*<sup>-/-</sup> mice, a genetic model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2018 Apr 11;38(15):3619-3630. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3184-17.2018. Epub 2018 Feb 26. 33 citas.
3. Ruiz-DeDiego I, Fasano S, Solís O, Garcia-Montes JR, Brea J, Loza MI, Brambilla R, Moratalla R. Genetic enhancement of Ras-ERK pathway does not aggravate L-DOPA-induced dyskinesia in mice but prevents the decrease induced by lovastatin. *Sci Rep.* 2018 Oct 18;8(1):15381. doi: 10.1038/s41598-018-33713-3. 9 citas.
4. García-Montes JR, Solís O, Enríquez-Traba J, Ruiz-DeDiego I, Drucker-Colín R, Moratalla R. Genetic Knockdown of mGluR5 in Striatal D1R-Containing Neurons Attenuates L-DOPA-Induced Dyskinesia in Aphakia Mice. *Mol Neurobiol.* 2019 Jun;56(6):4037-4050. doi: 10.1007/s12035-018-1356-6. Epub 2018 Sep 27. 9 citas.
5. Keifman E, uiz de Diego I, Pafundo DE, Paz RM, Solis O, Murer MG, Moratalla R. Optostimulation of strionigral terminals in substantia nigra induces dyskinesia that increases after L-DOPA in a mouse model of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.* 2019, Jul 176(13): 2146-2161. 15 citas.
6. Alberquilla S, Gonzalez-Granillo A, Martín ED, Moratalla R. Dopamine regulates spine density in striatal projection neurons in a concentration-dependent manner. *Neurobiol Dis.* 2020 Feb; 134:104666. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104666. Epub 2019 Nov 1. 10 citas.
7. Espadas I, Keifman E, Palomo-Garo C, Burgaz S, García C, Fernández-Ruiz J, Moratalla R. Beneficial effects of the phytocannabinoid  $\Delta^9$ -THCV in L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2020 Jul; 141:104892. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104892. Epub 2020 May 6. 3 citas.
8. Gómez-Benito M, Granado N, García-Sanz P, Michel A, Dumoulin M, Moratalla R. Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. *Front Pharmacol.* 2020 Apr 23; 11:356. doi: 10.3389/fphar.2020.00356. eCollection 2020. 10 citas.
9. Suarez LM, Solis O, Sanz-Magro A, Alberquilla S, Moratalla R. Dopamine D1 Receptors Regulate Spines in Striatal Direct-Pathway and Indirect-Pathway Neurons. *Mov Disord.* 2020 Oct;35(10):1810-1821. doi: 10.1002/mds.28174. Epub 2020 Jul 9. 4 citas.
10. Pérez-Taboada I, Alberquilla S, Martín ED, Anand R, Vietti-Michelina S, Tebeka NN, Cantley J, Cragg SJ, Moratalla R, Vallejo M. Diabetes Causes Dysfunctional Dopamine Neurotransmission Favoring Nigrostriatal Degeneration in Mice. *Mov Disord.* 2020 Sep;35(9):1636-1648. doi: 10.1002/mds.28124. Epub 2020 Jul 15.

#### AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría agradecer a todos los miembros de mi laboratorio su trabajo, esfuerzo y dedicación en este proyecto, así como a todo el personal del Instituto Cajal por su constante ayuda (administración, animalario, microscopia, servicio de Biología molecular) y a los colaboradores nacionales e internacionales que han participado de forma activa en este proyecto. Finalmente, me gustaría agradecer al Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad y al Plan Nacional Sobre



MINISTERIO  
DE SANIDAD

DELEGACIÓN DEL GOBIERNO PARA  
EL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE  
COORDINACIÓN DE PROGRAMAS

---

Drogas la financiación recibida durante este proyecto, que nos ha permitido lograr importantes avances en el ámbito de la drogadicción y la Enfermedad de Parkinson.

**CONTACTO (dirección de correo electrónico para consultas al equipo de investigación):**

moratalla@cajal.csic.es

---

NOTAS:

(1): Este resumen está dirigido a dar a conocer los aspectos sustanciales de los proyectos financiados por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas tanto a la población general como a profesionales, a través de su publicación en la página web del Ministerio de Sanidad. Procure ser conciso en las exposiciones. Incluya las gráficas y tablas que considere oportunas. En el caso de precisar otro tipo de información (audiovisuales, archivos de datos, etc.), consulte con el órgano instructor para valorar procedimiento de difusión.

(2): Máximo 500 palabras.

(3): Utilice como fuente el Medical Subjects Headings, MeSH, del Index Medicus.

(4) Se recomienda seguir los Requisitos de Uniformidad del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas conforme a las normas de la US National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/?amp=&depth=2>).