

2007I011



MINISTERIO  
DE SANIDAD  
Y POLÍTICA SOCIAL

SECRETARIA GENERAL DE  
POLITICA SOCIAL Y CONSUMO

DELEGACION DEL GOBIERNO  
PARA EL PLAN NACIONAL  
SOBRE DROGAS

## ANEXO IV

### JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

#### MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

3ª ANUALIDAD

FINAL

**Número Expediente:**

**Investigador Principal:** Joaquín Jordan Bueso

**Otros Investigadores:**

Francisco J Fernandez Gómez, Post-Doctoral, Raquel María Melero Fernandez De Mera, Becaria Pre-doctoral FPU y Sergio Perez Álvarez, Becario a cargo de este proyecto.

**Título Proyecto o subproyecto** PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN LAS RUTAS APOPTÓTICAS ACTIVADAS DURANTE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR LA METODONA

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

**Organismo:** Universidad de Castilla La Mancha

**Centro:** Facultad de Medicina.

**Departamento:** Ciencias Médicas.

**Comunidad Autónoma:** Castilla-La Mancha

**Duración:** 3 años

**Fecha de inicio:** 08/10/2007

**Fecha de finalización:** 08/10/2010

**Año Convocatoria:** 2007

**Área Temática:**

**Palabras Clave:** Mitocondria, apoptosis, poro de permeabilidad transitoria mitocondrial.



**RESUMEN:** (Objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2.000 palabras.)

El proyecto ha alcanzado con éxito todos los objetivos propuestos en la memoria inicial.

Así, hemos profundizado en los mecanismos relacionados con los procesos citotóxicos presentados por metadona en células en cultivo. Dichos procesos parecen estar relacionados con procesos necróticos más que apoptóticos. En ellos desempeña un papel fundamental la mitocondria, al presentar cambios en la permeabilidad de la membrana externa, presentando como resultado la liberación de proteínas pro-apoptóticas como Citocromo C y el factor inductor de apoptosis (AIF). En dichos cambios de permeabilidad de las membranas participan los dos modelos propuestos, la migración de la proteína bax desde el citosol hasta la mitocondria y la formación y apertura del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM).

Nuestros resultados muestran que metadona no induce la formación del PPTM de una forma directa, ya que como no produce alteraciones en organelas aisladas, si bien si lo hemos observado gracias al análisis cinético con la ayuda de microscopía confocal en células intactas. A este fin, se estudió el efecto de la metadona sobre la morfología mitocondrial en células SH-SY5Y transfectadas con mito-pDsRed2. En cultivos no tratados, la mitocondria presentaba una morfología larga y tubular (Figura 1A), las cuales se volvían cortas y redondas tras tres horas de tratamiento con metadona (Figura 1B-D). El recuento de las diferentes morfologías mitocondriales (filamentosas, fragmentadas y mezcla) indicó que la metadona, de una manera dosis-dependiente, inducía una fragmentación mitocondrial (Figura 1D).

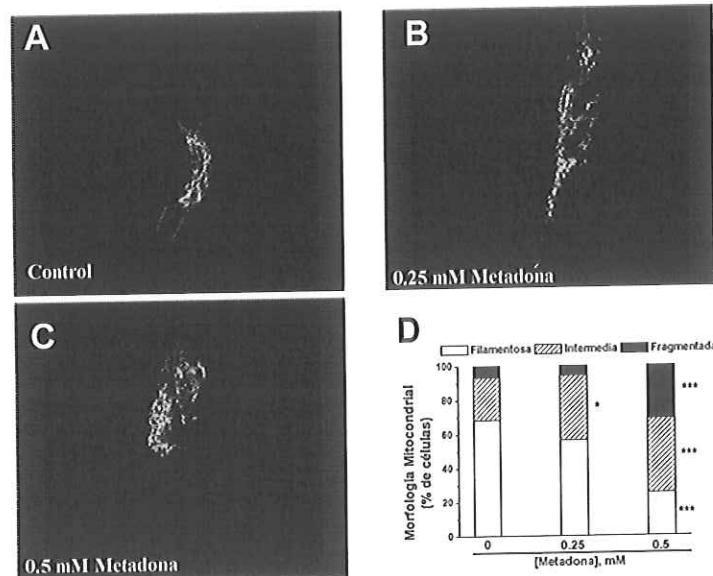


Figura 1. La metadona altera la morfología mitocondrial. La morfología de las células tratadas con metadona se estudió mediante imágenes confocal de células SH-SY5Y transfectadas con el vector mito-pDsRed2. 24h después de la transfección, los cultivos celulares se incubaron durante 3h en ausencia o presencia de metadona 0,25 o 0,5mM). Las imágenes muestran la morfología mitocondrial en células no tratadas (control, A) o células tratadas con metadona (B, 0,25mM; C, 0,5mM). D, Las fracciones de células con patrones mitocondriales filamentosos, intermedios o punteados se determinó en al menos 6 cultivos independientes (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,01$ ; t-Student vs condiciones basales).



La formación del PPTM fue también puesta de manifiesto gracias a la monitorización de la sonda fluorescente calceína bajo microscopia confocal que permite analizar la apertura del PPTM en células SH-SY5Y intactas. Como se muestra en la figura 2, la metadona provoca una drástica reducción en la fluorescencia de calceína resultado de la apertura del PPTM.

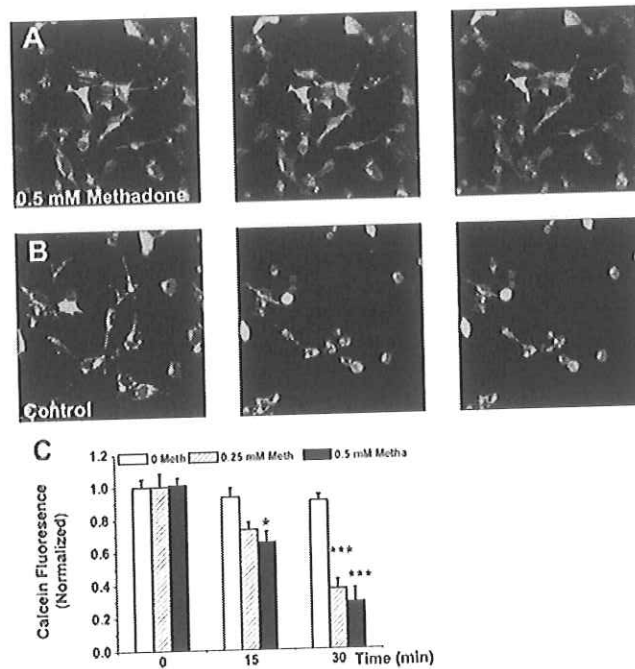


Figura 2. Metadona induce la formación del PPTM. La formación del PPTM in situ se monitorizó mediante imágenes confocal cargadas con calceína-AM en células SH-SY5Y control (A) y células SH-SY5Y expuestas a metadona 0,5mM (B). Las imágenes se obtuvieron tras 15 y 30min de tratamiento con metadona. C. Cuantificación de la fluorescencia de calceína. Los valores iniciales de fluorescencia se utilizaron para normalizar. Los valores mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. \*P < 0.01 indica diferencias significativas respecto a los controles.

Este efecto parece contradictorio a observaciones anteriores obtenidas en el desarrollo de este proyecto en los que la metadona no fue capaz en inducir el edema mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado de rata. Posiblemente, la fragmentación causada por metadona sobre la mitocondria esta mediada por calcio. De hecho, nuestros datos apoyen esta hipótesis, e indican un papel de la DTC en la toxicidad inducida por metadona. De acuerdo con esto, se ha observado la apertura del PPTM bajo condiciones pseudopatológicas con concentraciones relativamente altas  $Ca^{2+}$  y bajas concentraciones de ATP como es en el caso de previos experimentos con las células SH-SY5Y. La ruptura de la membrana mitocondrial causada por la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  reduce el número de mitocondrias sanas y esto afectara a funciones neuronales cruciales como son la transmisión sináptica y el transporte axonal. La metadona induce un incremento en la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  en la mayoría de las células SH-SY5Y. El registro microfluorescente de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  permite agrupar las células SH-SY5Y en cuatro tipos, dependiendo de las respuestas diferentes de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  (Figura 3). Para el primer grupo de células no se observo un incremento en la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  durante todo la medida (tipo 1).



Un segundo grupo de células fue incapaz de regular la homeostasis de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  poco después de la adición de metadona (tipo 2). Un tercer grupo mostró una desregulación de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  con un retraso de unos pocos minutos (tipo 3). Finalmente, el cuarto grupo fue capaz de controlar la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  después de un incremento inicial (tipo 4). De acuerdo con la literatura, tipo 2 y 3 representan una desregulación tardía de calcio (DTC).

Hemos profundizado en los mecanismos que subyacen a los cambios observados en los tipos de respuesta de  $Ca^{2+}$  mediados por metadona al ser estos desconocidos. Para ello, realizamos un abordaje farmacológico y de esta manera disecar la importancia de las diferentes vías activadas por metadona (0,5mM). Como se muestra en la Figura 3 y discutimos más adelante, 5 minutos de pretratamiento con diferentes fármacos en las células SH-SY5Y afecta a la respuesta de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  inducida por metadona.

- Calcio extracelular. Usando un medio sin  $Ca^{2+}$  (0 $Ca^{2+}$ ) encontramos una falta de influencia de  $Ca^{2+}$  extracelular en la respuesta de las células SH-SY5Y a la metadona. Concretamente, encontramos que los tipos de respuesta no fueron modificadas por 0 $Ca^{2+}$  (n= 291 células).
- Canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje de tipo-L. Probamos el efecto de la metadona en presencia de nifedipina, un inhibidor específico. Nifedipina (2 $\mu$ M) no modificó los efectos de la metadona a la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  en las células SH-SY5Y (n= 226 células). Por lo tanto, descartamos la implicación de los canales dependiente de voltaje en las variaciones de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  inducida por metadona.
- Receptores  $\mu$ -opioides. Naloxona (50  $\mu$ M), un fármaco antagonista competitivo de los receptores  $\mu$ -opioides, no modificó la cantidad relativa de ninguno de los cuatro tipos de poblaciones celulares (n= 80 células, 4 experimentos). Esto sugiere que los cambios en la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  y la DTC inducida por metadona en las células SH-SY5Y es independiente de los receptores opioides. En relación con la falta de participación de estos receptores encontramos que las vías tóxicas de la metadona no están modificadas por los receptores  $\mu$ .
- El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). La captura de  $Ca^{2+}$  por la mitocondria es dependiente del  $\Delta\psi_m$ . Por tanto, un desacoplamiento del transporte de electrones desde la síntesis de ATP despolariza la membrana mitocondrial interna y previene la captura de  $Ca^{2+}$  mitocondrial. Consistentemente, encontramos que en células no tratadas, la adición de únicamente del protonóforo FCCP (1 $\mu$ M) resulta en un incremento transitorio en la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  atribuible a la fuga de  $Ca^{2+}$  desde la mitocondria. Además, el FCCP induce una disminución del 44% en la aparición de las células tipo 2. Además, la cantidad relativa de células que muestran la respuesta tipo 3 se incrementa 2,7 veces con FCCP en presencia de metadona mientras se incrementa (figura 3 B-C). FCCP inhibe la presencia de células tipo 1.
- Síntesis de ATP mitocondrial. Únicamente la utilización de protonóforos no permite un claro estudio de la participación del transporte de  $Ca^{2+}$  mitocondrial debido a que también puede causar una bajada en el cociente ATP/ADP, y como consecuencia afectar a las bombas de  $Ca^{2+}$  dependientes de ATP. Una aproximación que previamente se ha estudiado para investigar la participación de la mitocondria en la homeostasis de  $Ca^{2+}$  sinaptosomal implica la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial por oligomicina y la aplicación de la glicólisis como una fuente de ATP e independiente de la manipulación de  $\Delta\psi_m$  con inhibidores específicos de la cadena respiratoria. La inhibición de la síntesis de ATP por oligomicina previene la fosforilación oxidativa mitocondrial pero a diferencia de la adición de protonóforos, no provoca una hidrólisis del ATP citoplasmático generado. Se ha descrito que la DTC puede resultar de un fallo en la extrusión del  $Ca^{2+}$  provocado por una bajada en el ATP citoplasmático. Por tanto, estudiamos el efecto de una corta, 5min, incubación con



10ug/ml de oligomicina. Bajo estas condiciones, la oligomicina sola no modifica la respuesta a la  $[Ca^{2+}]$  durante los 30min de registro. Sin embargo, la oligomicina altera la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  en respuesta a metadona. Específicamente, las células SH-SY5Y muestran como las respuestas de tipo 2 se incrementan mientras que hay una ausencia de las respuestas de tipo 3 relacionadas con la DTC. Además, la oligomicina inducía un incremento de 3,3 veces en las células que mostraban una respuesta de tipo 4.

- Intercambiadores mitocondriales  $Ca^{2+}/2Na^{+}$ . La liberación de  $Ca^{2+}$  mitocondrial está normalmente regulado por el intercambiador  $Ca^{2+}/2Na^{+}$ . Para bloquear la liberación del  $Ca^{2+}$  mitocondrial, se añadió CGP37157 (50 $\mu$ M), un inhibidor del intercambiador  $Ca^{2+}/2Na^{+}$ . 5 minutos de exposición a las células a CGP37157 incremento de una manera significativa la proporción de células que no mostraban un incremento de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  durante el periodo de medida de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  (tipo 1), ya que CGP37157 provocó una drástica disminución en la población de células tanto de las de tipo 2 (74%) como de las de tipo 3 (85%). Además, la cantidad relativa de células que mostraban una respuesta de tipo 1 regreso a las células sin tratar. Estos resultados apoyan los datos que sugieren una importancia de la mitocondria en la DTC inducida por metadona (Figura 3B-C).
- Especies reactivas del oxígeno (ERO). Usamos el TEMPOL, una pequeña molécula permeable que mimetiza la actividad de la superóxido dismutasa. En presencia de TEMPOL (0,2  $\mu$ M; n= 80 células), las células respondieron a la metadona de una manera diferente. Específicamente, TEMPOL disminuyó el número de células que mostraban una respuesta de tipo 2 en aproximadamente un 70%, la cantidad de células con una respuesta de tipo 3 se incrementó 3,5 veces, mientras que las de tipo 1 y 4 prácticamente no aparecieron. Consistentemente con nuestros resultados, se ha sugerido que el incremento de ERO es más una consecuencia que una causa de la DTC. En sus estudios, aplican una técnica que monitoriza el estatus bioenergético de mitocondrias in situ en cultivos neuronales sobre un modelo de excitotoxicidad de glutamato. De acuerdo con este, se observó una falta de eficacia de antioxidantes para disminuir la DTC en presencia de glutamato.
- Permeabilidad transitoria mitocondrial. La salida del  $Ca^{2+}$  mitocondrial puede ocurrir por la inducción de la formación del PPTM, el cual es dependiente de la concentración de  $Ca^{2+}$  de la matriz mitocondrial y puede ser inhibido por Ciclosporina A (CsA). Para evaluar la participación del PPTM se añadió CsA (1 $\mu$ M). CsA disminuyó la aparición de las respuestas de tipo 3 en un 36% (n= 89 células) en los cultivos celulares tratados con metadona 0,5mM. Además, consiste con la hipótesis del papel del poro en la DTC, la CsA induce un incremento de 2 veces en las células con respuesta de tipo 4.

Nuestros datos indican que únicamente los fármacos que afectan a las funciones mitocondriales, tales como oligomicina, FCCP, CDG37157 y CsA, son capaces de modular la DTC inducida por metadona en las células SH-SY5Y. Por tanto, concluimos que la dishomeostasis inducida por metadona es causada por un incorrecto funcionamiento de los mecanismos que directamente controlan la actividad mitocondrial más que por una participación de los receptores opioides o por la toma de  $Ca^{2+}$  extracelular.

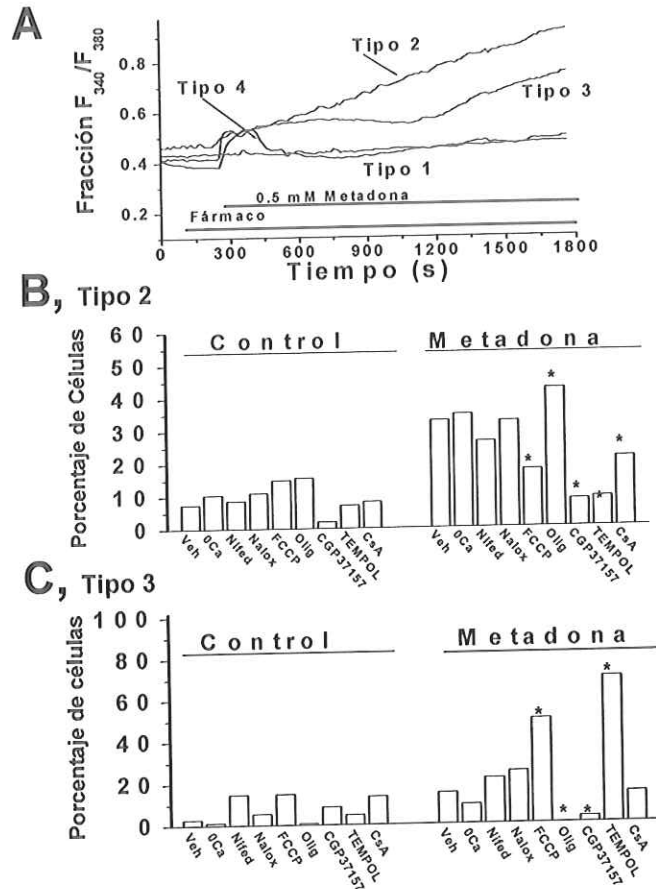


Figura 3. Metadone induce la dishomeostasis de  $Ca^{2+}$ . Efectos de la metadone 0,5mM sobre la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  in las células SH-SY5Y. Respuestas representativas para los cuatro tipos celulares diferentes. B-C. Fracciones de las células que producen respuestas a la  $[Ca^{2+}]_{cit}$  de tipo 2 (B) o tipo 3 (C). 0Ca, Nifedipina (2 $\mu$ M, Nifed); Naloxona (50 $\mu$ M, Nalox), FCCP (1 $\mu$ M); Oligomicina (10 $\mu$ g/ml, Olig), CGP37157 (25 $\mu$ M); TEMPOL (0,2 $\mu$ M) o Ciclosporina A (1 $\mu$ M, CsA) se añadió 5min antes de añadir metadone 0,5mM. Los datos representan los resultados obtenidos en al menos 3 experimentos diferentes. \* $<0,05$ ; t-Student vs. condiciones basales, (Veh).

Por ello, hemos analizado el efecto de la metadone sobre los efectos del  $Ca^{2+}$  sobre el consumo de oxígeno. Usamos el electrodo de Clark y aplicamos diferentes sustratos respiratorios, como son el succinato y el glutamato/malato. El transporte de la cadena respiratoria es menos dependiente en la presencia de  $\Delta\psi_m$  por succinato que por glutamato/malato. La metadone causa un desacoplamiento. Por tanto, como control, usamos 0,4 $\mu$ M FCCP porque esta concentración de FCCP resulta en un incremento del cociente de la toma de oxígeno comparable con el cociente calculada para metadone 0,5mM (Figura 4A). Los valores de cociente calculados del estado U (estado desacoplado) al estado 4 (estado de descanso) fueron los siguientes: para succinato  $2,8 \pm 0,5$  (+FCCP) y  $2,3 \pm 0,4$  (+ metadone) y para glutamato/malato  $2,1 \pm 0,5$  (+FCCP) y  $2,5 \pm 0,4$  (+ metadone). Entonces, comprobamos el efecto de la presencia de FCCP o metadone sobre la captura de  $Ca^{2+}$  por la mitocondria (Figura 4B,C). Los valores de los índices fueron los siguientes: para succinato  $3,0 \pm 0,7$  (control),  $1,7 \pm 0,3$  (FCCP) y  $1,7 \pm 0,4$  (+ metadone) y para glutamato/malato  $4,8 \pm 0,3$



(control),  $1,8 \pm 0,4$  (+ FCCP) y  $1,9 \pm 0,5$  (+ metadona). Por tanto, el efecto del FCCP y la metadona sobre la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  son comparables, aunque en la presencia de glutamato/malato los efectos parecen ser mucho más pronunciados. Esto probablemente resulta de un mayor efecto desacoplante de la metadona sobre el acceso de glutamato/malato a la cadena respiratoria y un deterioro adicional consecutivo sobre la toma de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por tanto el efecto de la metadona sobre la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria puede ser dependiente de los sustratos respiratorios. Por otro lado, cuando se compararon los valores de los cocientes U/4 calculados en ausencia y presencia de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  se observó una marcada disminución en las líneas registradas en la presencia de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 4C). Los valores calculados de los cocientes de U/4 disminuyeron en: para succinato de  $2,8 \pm 0,5$  a  $2,0 \pm 0,2$  (+ FCCP) y de  $2,3 \pm 0,4$  a  $2,1 \pm 0,3$  (+ metadona) y para glutamato/malato de  $2,1 \pm 0,5$  a  $1,9 \pm 0,3$  (+ FCCP) y de  $2,5 \pm 0,4$  a  $2,1 \pm 0,2$  (+ metadona). Esto puede ser debido por la reducción del componente  $\Delta\psi$  de la fuerza protón motriz como un resultado de la toma de  $\text{Ca}^{2+}$ , llevando a una disminución de la capacidad desacoplante del FCCP y metadona.

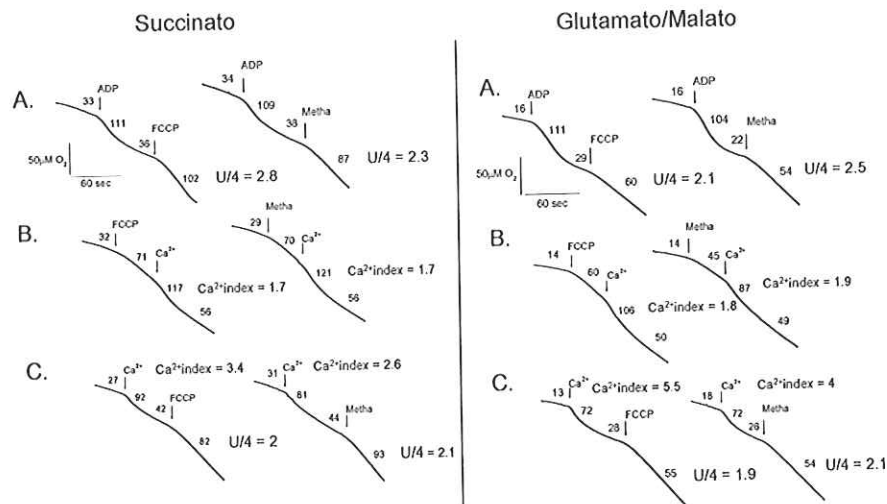


Figura 4. La metadona afecta a la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial de una manera dependiente del sustrato respiratorio. La toma de oxígeno en mitocondrias aisladas de hígado se determinó usando el electrodo de Clark en presencia de 5mM succinato o 2,5mM glutamato/malato usando el electrodo de Clark en presencia de 5mM succinato o 2,5mM glutamato/malato. B. Efecto de FCCP y metadona sobre la toma de  $\text{Ca}^{2+}$ . C. Efecto de la captura de  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la capacidad desacoplante del FCCP y metadona. Adiciones: 250 $\mu\text{M}$  ADP, 200 $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , 0,4 $\mu\text{M}$  FCCP, y 0,5mM metadona. Las líneas representan las medias obtenidas de 4 preparaciones mitocondriales independientes. Los números sobre las líneas indican las tasas de respiración a 37°C en nmol oxígeno.mg proteína-1.min-1.



Por otro lado, hemos encontrado como dentro de los mecanismos de señalización activados por metadona se encuentra el Factor Inductor de la Apoptosis (AIF). La translocación de AIF desde la mitocondria al núcleo se ha propuesto como un paso crucial en la muerte celular independiente de caspasas. Por este motivo, se estudió la localización de AIF en las células SH-SY5Y tratadas con metadona 0,5mM usando la inmunofluorescencia y la microscopía confocal. La inmunofluorescencia mostró una localización citosólica de AIF en células control (Figura 5A). Sin embargo, el tratamiento con metadona 0,5mM resultó en un cambio de la localización de AIF al núcleo (Figura 5B). De acuerdo con la falta de efectos tóxicos, a bajas concentraciones de metadona (0,1 y 0,25mM) la metadona no indujo la translocación de AIF al núcleo (datos no mostrados).

En los siguientes experimentos se estudió la importancia del PPTM y Bax en la translocación de AIF inducida por metadona. Para determinar la importancia de la formación del PPTM en la translocación de AIF, las células se pre-trataron con el inhibidor específico del PPTM, la ciclosporina A (CsA). 30 minutos de pretratamiento con CsA 1 $\mu$ M resultó en la inhibición de la translocación de AIF al núcleo inducida por metadona en células SH-SY5Y (Figura 5D). Control tratado únicamente con CsA 1 $\mu$ M falló en inducir cambios en la localización de AIF (Figura 5C). Estos efectos se cuantificaron mostrando que CsA 1 $\mu$ M bloquea la translocación de AIF en aproximadamente un 50% de las células ( $p < 0,01$ ) (Figura 5E).

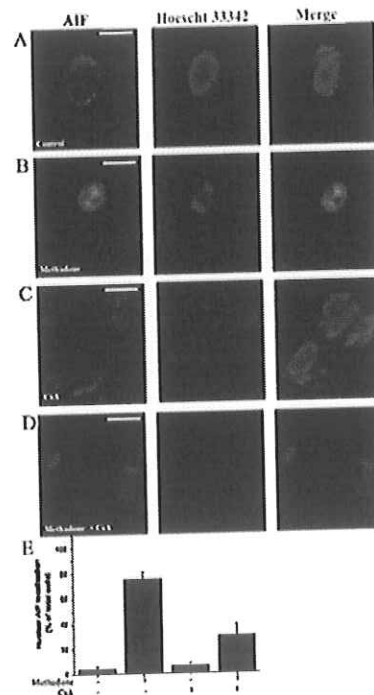
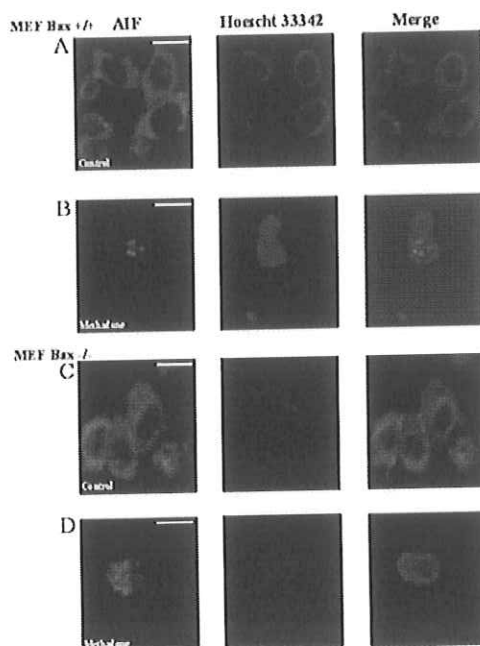


Figura 5. Metadona induce la translocación nuclear de AIF en células Sh-SY-5Y. A y B. Microscopía confocal muestra que la metadona induce una translocación de AIF desde la mitocondria hasta el núcleo. Imágenes de anti-AIF en células no tratadas (A) o tratadas con metadona 0,5mM (B) durante 24h. Se muestran células representativas en los cultivos celulares. Células control no presentan una recolocación de AIF al núcleo. C y D. Ciclosporina A inhibe la liberación de AIF en células SH-SY5Y expuestas con metadona. Imágenes de inmunofluorescencia de AIF con o sin tratamiento de metadona (0,5mM) en cultivos celulares y con o sin pretratamiento con CsA (1 $\mu$ M) durante 30min antes de empezar los experimentos. 24 h después de la adición de metadona, las células se fijaron y se tiñeron con los anticuerpos anti-AIF. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. Barra de escala, 5 $\mu$ M. E. Proporción de núcleos en células SH-SY5Y que muestran la localización de AIF. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342. Los resultados representan la media  $\pm$  DE de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. Diferencias significativas se indican mediante asteriscos.





Metadona induce la translocación mitocondrial de Bax en células SH-SY5Y (15). Sin embargo, la importancia de esta proteína en la translocación de AIF inducida por metadona no es muy clara. Para investigar esto, utilizamos embriones de fibroblastos de ratón carentes de la proteína Bax (MEF Bax  $-/-$ ), y los procedentes de animales wild type (MEF Bax  $+/+$ ). La falta de Bax no impide la translocación de AIF al núcleo inducida por metadona (Figura 6). En conclusión, nuestros resultados revelan que la translocación de AIF inducida por metadona esta mediada por la formación del PPTM más que por la participación de Bax.



Sorprendentemente, la tinción de la cromatina mediante Hoechst 33342 mostró que las células expuestas a metadona no presentaban alteraciones en la morfología de la cromatina. La metadona no parece inducir la fragmentación o condensación de la cromatina. Estos resultados nos llevaron a estudiar el estado del ADN mediante diferentes análisis. Primero, determinamos una posible degradación del ADN en oligonucleosomas inducida por metadona. Sin embargo, las células expuestas a metadona 0,5mM no presentaron fragmentos de ADN en oligonucleosomas (Figura 7A). Segundo, los cultivos expuestos tampoco presentaron fragmentos de ADN del alto peso molecular (Figura 7B). Estaurosporina se utilizó como un control positivo para la inducción de la fragmentación del ADN. Por último, se comprobó la participación de la endonucleasa CAD y su chaperona-inhibidora ICAD. La ausencia de fragmentación de ADN en células tratadas con metadona se correlaciona con una considerable disminución en los niveles de ambas proteínas (Figura 7C). La fragmentación del ADN es una característica de las células apoptóticas y CAD es el candidato más probable para mediar dicha fragmentación en muchas células. Los detalles concernientes al mecanismo de regulación de CAD/ICAD han sido anteriormente investigados desde que CAD y ICAD se descubrieron y identificaron sus secuencias. CAD forma un complejo con ICAD que permanece en un estado inactivo en células en proliferación y es activado durante la apoptosis por caspasas3 y -7. Además, ICAD actúa como una chaperona para CAD permitiendo que se convierta en una forma activa. Probablemente cuando CAD no interactúa con ICAD es mal plegada e inmediatamente eliminada. De esta manera, CAD es regulada de una manera estricta y solamente activada durante la apoptosis, y por lo tanto se impide una degradación accidental en células sanas. En este estudio, investigamos como el mal plegamiento de CAD es reconocido por las células como una diana para la degradación. Para examinar la dinámica de CAD, se usaron las células NIH3T3 ya que dichas células presentan una baja expresión de CAD, pero las vías de señalización se activan tras la exposición a varios estímulos apoptóticos. Además, la transfección con CAD-EGFP no tiene actividad nucleasa, lo que sugiere que el ICAD



endógeno no actúa como una chaperona para CAD-EGFP en las células NIH3T3. De hecho, la fragmentación de ADN no ocurre en las células NIH3T3 en respuesta a varias señales apoptóticas cuando caspasa-3 esta activada. La cromatina es degradada en fragmentos de alto peso molecular (~50kbp) en las etapas iniciales de la fragmentación del ADN apoptótica. Una pequeña cantidad de fragmentos de alto peso molecular (10 ~kbp) se detectaron en las células NIH3T3. Estos fragmentos de ADN de alto peso molecular no se producen por la activación de CAD, pero pueden ser el resultado de otras nucleasas, ya que el CAD exógeno induce una fragmentación que da lugar a la formación de fragmentos de ADN de bajo peso molecular en células NIH3T3 cotransfectadas con CAD-EGFP/DsRed-ICAD. La actividad total más alta de CAD de las células HeLa transfectadas con CAD-EGFP comparada con controles mock se puede explicar debido al hecho de que el CAD sobreexpresado forma un complejo con la forma libre endógena de ICAD en las células HeLa.

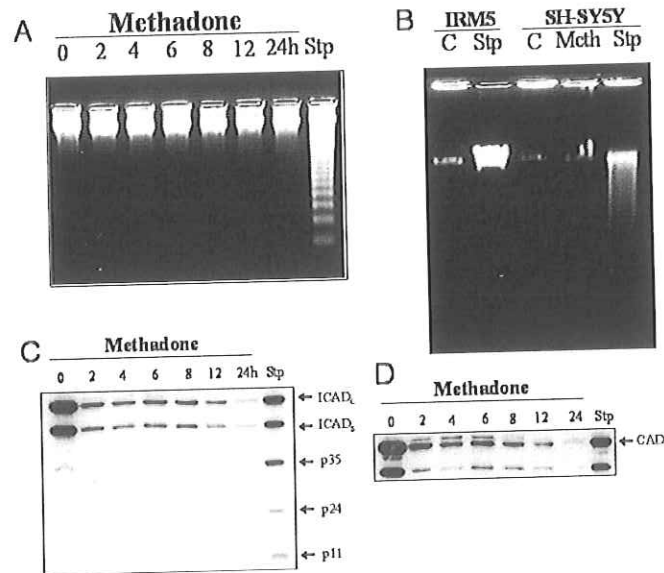


Figura 7. La muerte celular inducida por metadona se produce en ausencia de la fragmentación del ADN. A. La fragmentación del ADN en oligonucleosomas (fragmentos de bajo peso molecular LMW) se analizaron en células SH-SY5Y tratadas con metadona 0,5mM durante los intervalos indicados o sin tratar. Las células SH-SY5Y tratadas durante 6h con estaurosporina (Stp) 1µM se utilizaron como control positivo de la apoptosis clásica. B. Análisis de la fragmentación del ADN de alto peso molecular mediante FIGE se realizó en las células SH-SY5Y tratadas con metadona (Meth) 0,5mM durante 6h o sin tratar (C). Las células IMR-5 tratadas con estaurosporina 1µM durante 6h se utilizaron como control negativo de la apoptosis clásica, las células SH-SY5Y tratadas con estaurosporina 1µM se utilizaron como control positivo. C y D. La metadona induce una drástica disminución en los niveles de ICAD (C) y CAD (D). Se obtuvieron las proteínas de células SH-SY5Y y células tratadas con metadona 0,5mM durante los tiempos indicados. Los niveles de ICAD y CAD se analizaron mediante inmunoblot. Las células SH-SY5Y tratadas con staurosporina durante 6h se utilizaron como control positivo de la fragmentación típica de ICAD durante la apoptosis.

Metadona induce la translocación de AIF la cual esta implicada en cambios en la cromatina. La histona H2AX se fosforila tras un daño en el ADN. Por tanto, se investigó el efecto de la metadona sobre la fosforilación de H2AX en células SH-SY5Y expuestas a metadona 0,5mM durante 24h. Las células se



fijaron y se realizaron estudios de inmunofluorescencia usando un anticuerpo específico anti-fosfo-H2AX. La microscopía confocal muestra que la metadona induce la presencia de núcleos positivos para p-H2AX los que no se encuentran prácticamente en cultivos control (Figura 8B). Para estudiar el papel del PPTM en la activación de H2AX, los cultivos celulares se pretrataron con CsA 1 $\mu$ M durante 30 min antes de la adición de metadona 0,5mM. Figura 8B muestra la ausencia de cualquier efecto de este inhibidor del PPTM sobre la fosforilación de H2AX inducida por metadona.

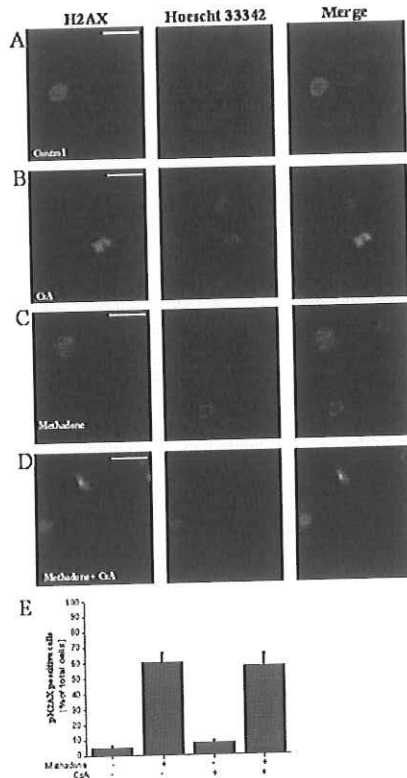


Figura 8. La metadona induce la fosforilación de la histona H2AX. Microscopía de inmunofluorescencia de anti-p-H2AX en células no tratadas (A) o en células SHSY-5Y tratadas con metadona 0,5mM durante 24h (C). B y D. Efecto de la ciclosporina A sobre la fosforilación de H2AX inducida por metadona muestra que no hay inhibición de la activación de la p-H2AX nuclear por CsA 1 $\mu$ M tras el tratamiento de metadona 0,5mM durante 24h. Las células tratadas durante 30min con CsA (1 $\mu$ M) y/o metadona (0,5mM) seguido de la detección por inmunofluorescencia de p-H2AX. El impacto de la fosforilación de H2AX nuclear se determinó mediante la cuantificación de la proporción de los núcleos mostrando p-H2AX inmunofluorescence. Los núcleos se visualizaron mediante la tinción con Hoechst 33342. Barra de escala 5 $\mu$ m. Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado.



**ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN:** (Se adjuntarán tres separatas de cada uno de ellos)

- A.1. PEREZ-ALVAREZ S, CUENCA-LOPEZ MD, MELERO-FERNÁNDEZ DE MERA RM, PUERTA E, KARACHITOS A, BEDNARCZYK P, KMITA H, AGUIRRE N, GALINDO MF and **JORDÁN J** 2010. Methadone induces necrotic-like cell death in SH-SY5Y cells by an impairment of mitochondrial ATP synthesis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 1802: 1036-1047. PMID: 20691259.
- A.2. PEREZ-ALVAREZ S, IGLESIAS-GUIMARAI S V, SOLESIO ME, MELERO-FERNANDEZ DE MERA RM, YUSTE VJ, GALINDO MF and **JORDÁN J**. Methadone induces CAD degradation and AIF-mediated necrotic-like cell death in neuroblastoma cells. Enviado.
- A.3. PEREZ-ALVAREZ S, SOLESIO ME, CUENCA-LOPZ MD, MELERO-FERNANDEZ DE MERA RM, VILLALOBOS C, KMITA H, GALINDO MF and **JORDÁN J**. Mechanisms involved in delayed calcium deregulation in SH-SY5Y cells challenged with methadone. Enviado.

**TESIS:**

Título: "Papel de la mitocondria en las rutas apoptóticas activadas durante la neurotoxicidad inducida por la metadona".

Doctorando: D. Sergio Pérez Álvarez

Facultad de Medicina. Universidad de Castilla-La Mancha. "En curso". DEA, Sobresaliente. Mayo de 2010.

**CONGRESOS:**

PÉREZ-ÁLVAREZ S, FERNÁNDEZ-GÓMEZ FJ, MELERO-FERNÁNDEZ DE MERA RM, GARCÍA-MARTÍNEZ EM, GALINDO MF y **JORDÁN J**. Estudios sobre los mecanismos celulares neurotóxicos activados por metadona. XXIX Reunión del Grupo Español de Neurosecreción. Villaverde de Guadalimar, Albacete. 10-12 de diciembre de 2008. *Libro de resúmenes. Pag 19.*

CUENCA-LÓPEZ MD, PÉREZ-ÁLVAREZ S, ANTON-MARTÍNEZ D, MELERO-FERNÁNDEZ DE MERA RM, PUERTA E, AGUIRRE N, y **JORDÁN J**. Metadona modula la respiración mitocondrial. XXX Reunión del Grupo Español de Neurotransmisión. Santo Domingo de Silos. 9-11 de diciembre de 2009. *Libro de resúmenes. Pag63.*

MELERO FERNANDEZ DE MERA RM, PÉREZ-ÁLVAREZ S y **JORDÁN J**. La metadona instaura la DTC en células SH-SY5Y. VII Jornadas de Jóvenes Investigadores del Campus Biosanitario de Albacete. Albacete. 9-10 de junio de 2010. *Libro de resúmenes. Pag. 85. ISBN: 978-1-4457-7678-1.*

PEREZ-ALVAREZ S, CUENCA-LOPEZ L, MELERO-FERNANDEZ DE MERA RM, KMITA H y **JORDAN J**. La metadona, especuladora de ATP, conduce a las células SH-SY5Y a la crisis bioenergética. VII Jornadas de Jóvenes Investigadores del Campus Biosanitario de Albacete. Albacete. 9-10 de junio de 2010. *Libro de resúmenes. Pag. 84. ISBN: 978-1-4457-7678-1.*



**MODIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO SOBRE LOS PROYECTADOS Y SU JUSTIFICACIÓN:**

No se han realizado modificaciones.

**OBJETIVOS PLANTEADOS :(Transcribir los del proyecto original)**

Nuestra hipótesis se basa en la evidencia de que un fármaco de amplio uso en la terapéutica de la drogadicción como es la metadona provoca efectos neurotóxicos en modelos experimentales. La disminución de las capacidades cognitivas, que se asocia con la exposición crónica a este opiáceo, estaría relacionado con la activación de programas de muerte celular en determinadas áreas del cerebro y la consiguiente pérdida neuronal. En el presente proyecto pretendemos determinar si el tratamiento con metadona induce la activación del proceso de apoptosis en diferentes modelos celulares representativos de diferentes áreas cerebrales. Por ello, el objetivo general del proyecto es el estudio los mecanismos de acción y rutas de señalización activadas por la **metadona**. Se hará hincapié en el estudio de parámetros bioquímicos y cambios en la expresión génica y proteica implicados en la posible neurotoxicidad de dicho opiáceo a nivel mitocondrial.

El presente subproyecto tiene como objetivos específicos el estudio del efecto de metadona sobre:

- a. Alteraciones de la permeabilidad de las membranas mitocondriales: liberación de citocromo c al citoplasma.
- b. Cambios morfológicos mitocondriales. Mediante tinciones específicas de la organela.
  - a) Formación del poro de permeabilidad transitorio mitocondrial mediante técnicas de microfluorimetría. Efecto de su bloqueo mediante fármacos como la ciclosporina A sobre la caída en la viabilidad celular inducida por metadona.
  - b) Estudio de la translocación de proteínas de localización citoplasmática (bax, p53, PUMA) hasta la mitocondria.
  - c) Acción del bloqueo de la expresión de genes de interés a partir de los resultados obtenidos por el Dr Folch en los apartados anteriores sobre la viabilidad neuronal.
  - d) Se estudiará la acción del tratamiento con la coenzima Q10 y el zVad-fmk , se utilizarán concentraciones similares a las del Prf Camins, sobre los objetivos arriba propuestos.
  - e) Una vez conocidos los resultados de alteración de la expresión génica gracias a los ensayos de hibridación molecular realizados por el grupo del Dr Jaime Folch se llevará a cabo el estudio del efecto de la manipulación de la expresión de dichas proteínas sobre la viabilidad celular y alguno de los parámetros arriba expuestos.



**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)

-Se han alcanzado todos y cada uno de los objetivos. Ver memoria.

Además se ha depositado una Tesis doctoral cuya defensa tendrá lugar en la primera quincena del mes de octubre del presente año.

Título: "Papel de la mitocondria en las rutas apoptóticas activadas durante la neurotoxicidad inducida por la metadona".

Doctorando: D. Sergio Pérez Álvarez

Facultad de Medicina. Universidad de Castilla-La Mancha. "En curso". DEA, Sobresaliente. Mayo de 2010.

**APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE LAS DROGODEPENDENCIAS.** (En caso de memoria final)

Estos datos surgieren que en caso de pacientes con sobredosis por metadona donde se pueden observar efectos secundarios, algunas veces con consecuencias letales, la metadona podría causar una crisis bioenergética, llevando a las células a niveles no deseados de energía que las predisponen a la muerte celular. Los resultados indican que la metadona induce una DTC en las células SH-SY5Y mediante una alteración de la capacidad de la mitocondria de manejar el calcio, y relacionada con los cambios en la morfología mitocondrial. Estos cambios morfológicos, a su vez, pueden ser asociados con daño mitocondrial y muerte celular. Se ha observado edema mitocondrial en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas. Un desequilibrio en la homeostasis del  $Ca^{2+}$  mitocondrial puede ser importante para estados tempranos y tardíos de los efectos adversos observados y quizás, puedan explicar algunos de los síntomas clínicos observados, como por ejemplo fallo de memoria.

**PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL PROYECTO.** (En caso de memoria final)

**OTRAS SUBVENCIONES O RECURSOS (INCLUIDOS FONDOS PROPIOS) QUE FINANCIAN ESTE PROYECTO O PENDIENTES DE RESOLUCIÓN:** importe, procedencia y aplicación



MINISTERIO  
DE SANIDAD  
Y POLÍTICA SOCIAL

SECRETARIA GENERAL DE  
POLITICA SOCIAL Y CONSUMO

DELEGACION DEL GOBIERNO  
PARA EL PLAN NACIONAL  
SOBRE DROGAS

**SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO  
CONCEDIDAS:** organismo, convocatoria y cantidad.

**OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR**

En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección [pndinvestigacion@msps.es](mailto:pndinvestigacion@msps.es) la presente memoria.

En Albacete a 11 de septiembre de 2010

FIRMA