

32/07



## ANEXO IV

### PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

#### MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

FINAL X

**Número Expediente:** 2007I032

**Investigador Principal:** Jesús A. García Sevilla

**Otros Investigadores:** María Álvaro-Bartolomé, Alfredo Ramos-Miguel, Antonio Miralles, Susana Esteban

**Título Proyecto o subproyecto:** Regulación de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca en la corteza prefrontal de adictos crónicos fallecidos por sobredosis de cocaína o heroína

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

**Organismo:** Universidad de las Islas Baleares

**Centro:** Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS)

**Departamento:** Laboratorio de Neurofarmacología

**Comunidad Autónoma:** Islas Baleares

**Duración:** 3 años

**Fecha de inicio:** 8/10/2007

**Fecha de finalización:** 7/10/2010

**Año Convocatoria:** 2007

**Área Temática:** cascadas apoptóticas en adictos mixtos a cocaína/opiáceos

**Palabras Clave:** Cerebro humano post mórtem, adicción a heroína, adicción a cocaína, adicción mixta heroína/cocaína, vulnerabilidad, muerte neuronal, neuroplasticidad

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

Hipótesis del proyecto (véase memoria inicial):

Como objetivo principal se postuló que la adicción a cocaína y a opiáceos en el hombre modula ciertas vías de señalización en el cerebro que podrían estar involucradas bien con fenómenos apoptóticos (activación de Fas/FADD/caspasas y/o de la vía mitocondrial intrínseca), o bien con la inducción de efectos no apoptóticos (inhibición de FADD y modulación de MAP quinasas), y que estos últimos (fenómenos de plasticidad) podrían ser relevantes en el contexto de las bases neurobiológicas de la adicción a estas drogas.

En este proyecto (cerebro humano post mórtem) se cuantificaron los efectos agudos y crónicos de cocaína y de opiáceos (heroína/metadona) sobre los elementos clave de las vías apoptóticas extrínseca (receptor Fas, adaptador FADD, FLIP-L y otras proteínas) e intrínseca (varias proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas mitocondriales) en la corteza prefrontal (área de Brodmann 9, PFC/BA9), utilizando homogenados totales y fracciones subcelulares (membrana, citosol, núcleo y citoesqueleto) de PFC/BA9 de adictos humanos que fueron seleccionados con criterios diagnósticos de historia clínica y toxicológicos en muestras de sangre y pelo. También se realizaron experimentos en cerebro de ratas y ratones tras tratamientos con cocaína, opiáceos y fármacos cannabinoides para fines comparativos de regulación farmacológica y molecular de las mencionadas proteínas diana.

Así mismo se analizaron los componentes de las vías de señalización de las quinasas mitogénicas MAPK-ERK1/2, MAPK-JNK1/2 y p38-MAPK, y el tándem Akt1 con PEA-15, las cuales han sido relacionadas con la inducción de señales apoptóticas (JNK, p38) y no apoptóticas (ERK, Akt, PEA-15) mediadas por receptores de muerte incluyendo el receptor Fas, así como con fenómenos de neuroplasticidad. El objetivo global fue investigar con el mayor detalle posible de qué forma la adicción a opiáceos y/o cocaína en el hombre modula las vías apoptóticas clásicas (activación o inhibición), prestando una atención especial a la regulación de la molécula FADD (Fas-associated protein with death domain) que en su forma fosforilada en la serina 194 (p-Ser194 FADD) induce nuevas acciones anti-apoptóticas relacionadas con mecanismos de neuroplasticidad en el cerebro.



Sujetos de estudio:

De acuerdo con los objetivos iniciales del proyecto, las proteínas diana se cuantificaron en muestras cerebrales (PFC/BA9) de tres grupos de adictos humanos:

1. Adictos a cocaína "puros" (muerte por sobredosis de cocaína; detección de cocaína y metabolitos en sangre y pelo; no detección de opiáceos en sangre y pelo; historia clínica documentada de adicción a cocaína).
2. Adictos "mixtos" a cocaína/opiáceos (muerte por sobredosis de cocaína preferentemente; detección de cocaína y de opiáceos en sangre y pelo; historia clínica documentada de adicción mixta).
3. Adictos a opiáceos "puros" (muerte por sobredosis de heroína o metadona; detección de opiáceos y metabolitos en sangre y pelo; no detección de cocaína en sangre y pelo; historia clínica documentada de adicción a opiáceos).

Se utilizaron muestras desnaturalizadas de cerebro humano (PFC/BA9) procedentes de adictos a drogas y de sujetos sanos (controles) que fueron autopsiados en el Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Ginebra durante los años 1997-2009. Estas muestras cerebrales de adictos requirieron de un estudio preliminar exhaustivo, tanto de revisión diagnóstica como de análisis toxicológico, para una selección definitiva de los sujetos, incluyendo sujetos control, que realizó el IP de este proyecto colaborando con el Dr. Romano La Harpe, jefe clínico del Instituto de Medicina Forense de la Universidad de Ginebra.

Antes de realizar los ensayos definitivos se procedió con la caracterización de anticuerpos comerciales para la identificación de las proteínas diana en tejido cerebral humano (sujetos control) y en comparación con muestras de cerebro de rata y ratón. Así mismo se realizó el control de variables tales como la edad y sexo de los sujetos (emparejamiento), el intervalo autopsico (PMD) y la duración de la adicción (estimada a partir de la toxicología en pelo). Posteriormente se realizó la inmunodetección y cuantificación de las proteínas diana en cerebro post mórtem de adictos a opiáceos y/o cocaína (selección mediante análisis toxicológicos) en homogenados totales de PFC/BA9, así como en fracciones subcelulares (principalmente en citosol y núcleo) con objeto de investigar cambios en la localización y trasiego de proteínas (énfasis en la traslocación de proteínas diana desde el citosol al núcleo en sujetos seleccionados).

En el contexto de la hipótesis inicial (véase más arriba), los resultados/conclusiones más relevantes de este proyecto, expresados de forma directa, son los siguientes (para detalles más particulares véase más abajo los objetivos concretos alcanzados y consúltense los artículos publicados):

1) Las proteínas componentes de las vías canónicas que median los procesos de muerte celular (vías extrínseca de receptores de muerte e intrínseca/mitocondrial) no se encuentran incrementadas y/o activadas de forma patológica en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos, adictos a cocaína, y/o adictos mixtos a opiáceos/cocaína.

2) Las adaptaciones a largo plazo (meses/años) de algunas de estas proteínas, como por ejemplo la molécula adaptadora FADD y su forma fosforilada en la serina 194 (p-Ser194-FADD), sugieren que estas drogas de abuso ponen en marcha mecanismos de contrarregulación para frenar la activación de la vía apoptótica extrínseca (reducción del contenido de FADD) y al mismo tiempo inducir fenómenos de neuroplasticidad que se asociarían con un incremento en la tasa de p-Ser194-FADD.

3) Se puede concluir que la proteína FADD se ha revelado como una nueva e importante diana en la compleja neurobiología de las adicciones a drogas de abuso.

Dada la relevancia de las proteínas RGS (reguladoras de la señalización mediadas por proteínas G) en los procesos moleculares de adicción a drogas, se están analizando, como una extensión del este proyecto, la regulación de RGS4 y RGS10 en la corteza prefrontal de varios grupos de adictos a drogas, principalmente adictos a opiáceos. En este contexto, se ha publicado un artículo preliminar con la caracterización de estas proteínas en cerebro humano post mórtem (Rivero G. et al. Characterization of regulators of G-protein signaling RGS4 and RGS10 proteins in the postmortem human brain, *Neurochemistry International* 57: 722-729, 2010), y se espera poder continuar por este camino aunque este objetivo no pertenezca propiamente al proyecto que ahora finaliza.



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

1. García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Miralles A, García-Sevilla JA. Opioid receptor agonists enhance the phosphorylation state of Fas-associated death domain (FADD) protein in the rat brain: Functional interactions with casein kinase I $\alpha$ , G $\alpha$ i proteins, and ERK1/2 signaling. *Neuropharmacology* 55: 886-899 (2008)

**Se adjuntaron tres separatas con el primer informe.**

2. García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Rivero G, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA. Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers. *Neuroscience* 157: 105-119 (2008)

**Se adjuntaron tres separatas con el segundo informe.**

3. Ramos-Miguel A, García-Fuster MJ, Callado LF, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla. Phosphorylation of FADD at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: Relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocyte of 15 kDa, and Akt signaling pathways involved in neuroplasticity. *Neuroscience* 161: 23-38 (2009).

**Se adjuntaron tres separatas con el segundo informe.**

4. Moranta D, Esteban S, García-Sevilla JA. Chronic treatment and withdrawal of the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 modulate the sensitivity of presynaptic receptors involved in the regulation of monoamine syntheses in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379: 61-72 (2009).

**Se adjuntaron tres separatas con el segundo informe.**

5. Alvaro-Bartolomé M, La Harpe R, Meana JJ, García-Sevilla JA. Opposite regulation of FADD and nuclear poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in brains of cocaine addicts. Abstract. *European Neuropsychopharmacology* 19 (Suppl. 3) S658-S659 (2009)

**Se adjuntaron tres separatas (resumen) con el segundo informe.**

6. Alvaro-Bartolomé M, Esteban S, García-Gutiérrez MS, Manzanares J, Valverde O, García-Sevilla JA. Regulation of Fas receptor/Fas-associated protein with death domain apoptotic complex and associated signalling systems by cannabinoid receptors in the mouse brain. *British Journal of Pharmacology* 160: 643-656 (2010)

**Se adjuntan tres separatas con este informe final.**

7. Alvaro-Bartolomé M, La Harpe R, Callado LF, Meana JJ, García-Sevilla JA. Regulation of apoptotic pathways and associated signaling in the cerebral cortex of human cocaine addicts and cocaine-treated rats. *Neuroscience* (2010)

**En fase de evaluación.**

En el apartado de agradecimientos (acknowledgements) para cada uno los artículos reseñados figura el apoyo económico del proyecto 2007I032 (Plan Nacional sobre Drogas, MSC, Madrid).

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

No se han realizado modificaciones substanciales sobre lo proyectado inicialmente, excepto la inclusión de dos nuevas dianas moleculares (PEA-15, Akt1) y de dos subproyectos sobre la regulación fisiológica y farmacológica de los receptores cannabinoide CB1 y CB2 en cerebro de rata y ratón (Artículos 4 y 6), que se realizaron dada la presencia de cannabis en algunas muestras sanguíneas de adictos humanos (cribado toxicológico).

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

Objetivos concretos:

1. Regulación de la vía apoptótica extrínseca. Receptor Fas (formas nativa, glicosilada y agregados homo-oligoméricos), adaptador/transductor FADD (Fas-associated protein with death domain) y su fosforilación (Ser194), caspasas efectoras (caspasas 8/3) y actividad funcional de la caspasa-3 (fragmentación de la proteína nuclear PARP como señal inequívoca de apoptosis), así como de la proteína FLIP-L (forma inhibidora de caspasa-8).
2. Regulación de la vía apoptótica intrínseca (mitocondrial). Proteínas Bax, citocromo c, AIF (elemento principal inductor de apoptosis no mediada por caspasas).
3. Regulación de vías de señalización. Cuantificación de los componentes (formas totales y fosforiladas) de las vías mediadas por las quinasas MAPK-MEK/ERK (MEK1/2 y ERK1/2), MAPK-JNK1/2 y p38-MAPK.

**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)

Objetivos alcanzados al finalizar el proyecto (2008-2010)

### 1 y 2. Regulación de las vías apoptóticas extrínseca e intrínseca

Se ha caracterizado la fosforilación de la molécula FADD (p-Ser194 FADD) y su regulación por opiáceos y cocaína en cerebro de rata (Artículos 1 y 7) y cerebro humano post mórtem (Artículos 3 y 7). La fosforilación de FADD tiene gran relevancia en las acciones no apoptóticas (neuroplásticas) de esta proteína multifuncional. Las vías apoptóticas extrínseca (Fas, FADD, caspasa-8, FLIP) e intrínseca (Bcl-2, Bax, citocromo c, caspase-3, AIF, PARP) no se encontraron activadas de forma patológica en la corteza prefrontal de adictos a opiáceos y de adictos mixtos cocaína/opiáceos (Artículo 2), así como de adictos a cocaína (Artículo 7), lo que sugiere normalidad en el proceso fisiológico de muerte celular en estos cerebros. En adictos a cocaína, sin embargo, la fragmentación del enzima nuclear PARP-1 se encontró modestamente incrementada lo que indica un cierto grado de neurotoxicidad con el abuso prolongado



de este psicoestimulante (Artículos 5 y 7). En contraposición a FADD, el contenido cerebral de p-Ser194 FADD (forma de FADD no inductora de apoptosis) se encontró incrementado en adictos a opiáceos y/o en adictos mixtos cocaína/opiáceos (Artículo 3), lo que ha sido discutido en el contexto de la posible inducción de fenómenos de neuroplasticidad por estas drogas de abuso.

### 3. Regulación de vías de señalización:

En cerebro humano y en cerebro de rata y ratón, se caracterizaron los componentes clave de las vías de señalización propuestas (ERK1/2, JNK1/2, p38 MAPK, PEA-15 y Akt1; proteínas totales y fosforiladas), cuyas modulaciones/regulaciones son relevantes en los procesos de adicción a drogas de abuso (opiáceos, cocaína, cannabis), así como en el desarrollo de fenómenos de neuroplasticidad (Artículos 1, 2, 3, 6 y 7). En corteza prefrontal (PFC/BA9) de adictos crónicos a opiáceos y/o adictos mixtos a cocaína/opiáceos, las activaciones (estados de fosforilación) de ERK1/2, JNK1/2, y Akt1/PEA-15 se encontraron disminuidas, no así la de p38 MAPK, lo que ha sido discutido en sus relaciones con pSer194-FADD y en el contexto de cambios neuroplásticos.

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

Los resultados de este proyecto son de carácter básico y altamente innovadores en el contexto de los mecanismos neurobiológicos de las adicciones a opiáceos y cocaína, por cuanto descubren la involucración de una nueva diana molecular denominada con el acrónimo FADD (Fas-associated death domain). El proyecto, además, ha estudiado FADD directamente en cerebro post mórtem de adictos crónicos a opiáceos y cocaína, lo que añade valor al entendimiento de las drogodependencias en el ser humano. Como toda investigación básica no se vislumbra una aplicabilidad inmediata de los resultados, pero sin duda repercutirán, tarde o temprano, en una mejor visión y aproximación terapéutica de las drogodependencias.

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

Ninguna.

### **OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR.**

Ninguna.

Palma de Mallorca, 4 de noviembre de 2010

FIRMA

Fdo. Jesús A. García Sevilla  
Investigador Principal