

ANEXO IV

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

FINAL

Número Expediente:

2009I039

Investigador Principal:

Emilio Fernández Espejo

Otros Investigadores:

Susana Ramiro Fuentes

Licenciada en Biología

Colaboradora (becaria FPU) DNI: 30954241J

Angel del Marco Delgado

Licenciado en Biología

Personal de apoyo (becario) DNI: 14618929 Z

Rocío Moreno Paublete

Licenciada en Biología

Personal de apoyo

DNI: 75776767R

Ramiro González Aparicio

Licenciado en Biología

Personal de apoyo (investigador contratado) DNI: 28788251W

Nieves Rodríguez Espinosa

Licenciada en Farmacia

Personal de apoyo. DNI: 28.494.783-Z

Título Proyecto o subproyecto

Estudio de la D-serina como nuevo mediador de psicosis cocaínica, y de los cambios plásticos neuronales inducidos por la cocaína crónica

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

Organismo:

Universidad de Sevilla

Centro:

Facultad de Medicina

Departamento:

Fisiología Médica y Biofísica

Comunidad Autónoma:

Andalucía

Duración:

3 años

Fecha de inicio: dic 2009

Fecha de finalización: dic 2012

Año Convocatoria:

2009

Área Temática:

1. Investigaciones sobre comorbilidad y complicaciones derivadas del consumo de cocaína

6. Investigaciones sobre estrategias terapéuticas, buscando nuevos métodos de tratamiento, incluyendo identificación de dianas terapéuticas.

Palabras Clave: D-serina, cocaína, psicosis, neuroplasticidad

* Márquese lo que proceda

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

Los objetivos generales son dos: 1) discernir el papel de la D-serina del área tegmental ventral en el desarrollo de “psicosis cocaínica” en ratas y ratones normales y mutantes, en relación a cambios neuroquímicos conocidos, y 2) estudiar los cambios plásticos sinaptogénicos y neuritogénicos en los circuitos mesocorticolímbico y mesoestriatal tras cocaína repetida en ratas.

Los objetivos se abordan desde un punto de vista conductual, neurofarmacológico, morfológico y bioquímico. En el primer objetivo, desde la vertiente conductual se emplea un test psicótico clásico en modelos animales: inhibición por prepulso (PPI). A nivel neurofarmacológico se emplean infusiones en ATV de ligandos relacionados con D-serina, mediante microcanulación bilateral en ratas. A nivel bioquímico, se estudia la aparición de marcadores de cambio neuroplástico “psicótico” por medio de western-blotting y rtPCR, como la regulación a la baja del transportador de dopamina (DAT) en la corteza prefrontal, o la regulación al alza del receptor D2 en el estriado dorsal. Se emplean también ratones mutantes, “knock-out” del gen DAO, donde la actividad de D-serina está genéticamente elevada. Para el segundo objetivo, a nivel conductual se emplea el test de sensibilización motora, con inyecciones repetidas de cocaína y “challenge” posterior. A nivel bioquímico, se confirmará el desarrollo de sensibilización por medio de la expresión de D3R y PKA en núcleo accumbens, mediante western-blotting y rtPCR. A nivel bioquímico y morfológico, se estudia la expresión de sinaptofisina, p21-arc, alfa-actina, alfa-tubulina, alfa-sinucleína y DAT en diversas áreas de los circuitos mesoestriatal y mesocorticolímbico (área tegmental ventral,

núcleo accumbens, estriado dorsal, corteza prefrontal, amígdala), en diversos puntos temporales del tratamiento con cocaína.

Las hipótesis son: 1) el exceso de D-serina en ATV podría estar relacionada con vulnerabilidad a cambios “psicóticos” tras cocaína crónica, por lo que la inactivación de su degradación – enzima DAO – o el exceso de D-serina en ATV debe inducir cambios “psicóticos” en ratas o ratones tratados crónicamente con cocaína; 2) y la administración crónica de cocaína ha de inducir cambios morfológicos sinaptogénicos y neuritogénicos en áreas de los circuitos mesocorticolímbico y mesoestriatal en ratas, en paralelo a cambios adictivos.

ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN: (Se adjuntará una separata de cada uno de ellos)

Se han publicado los siguientes artículos:

AUTORES: Ramiro-Fuentes S, Ortiz O, Moratalla R, Fernandez-Espejo E

TITULO: Intra-accumbal rimonabant is rewarding but induces aversion to cocaine in cocaine-treated rats, as does in vivo accumbal CB1R silencing: critical role for glutamate receptors.

REVISTA: *Neuroscience*. 167: 205–215, 2010.

AUTORES: Plaza-Zabala A, Berrendero F, Suarez J, Bermudez-Silva FJ, Fernandez-Espejo E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, Rodriguez de Fonseca F, Maldonado R, Robledo P.

TITULO: Effects of the endogenous PPAR- α agonist, oleoylethanolamide on MDMA-induced cognitive deficits in mice.

REVISTA: *Synapse*. 64: 379-389, 2010.

AUTORES: Flores JA, Galan-Rodriguez B, Rojo AI, Ramiro-Fuentes S, Cuadrado A, Fernandez-Espejo E

TITULO: Fibroblast growth factor-1 within the ventral tegmental area participates in motor sensitizing effects of morphine

REVISTA: *Neuroscience*. 165(1):198-211, 2010.

AUTORES: Ramiro-Fuentes S, Fernandez-Espejo E

TITULO: Sensitization to cocaine is inhibited after intraaccumbal GR103691 or rimonabant, but it is enhanced after coinfusion indicating functional interaction between accumbens D₃ and CB1 receptors.

REVISTA: *Psychopharmacology*. 214:949–959, 2011.

AUTORES: Fernandez-Espejo E, Rodriguez-Espinosa N.

TITULO: Psychostimulant drugs and Neuroplasticity

REVISTA: *Pharmaceuticals* 4: 976-991, 2011.

AUTORES: Ruiz-Medina J, Flores JA, Tasset I, Tunez I, Valverde O, Fernandez-Espejo E.

TITULO: Alteration of neuropathic and visceral pain in female C57BL/6J mice lacking the PPAR- α gene.

REVISTA: *Psychopharmacology* 222(3):477-88, 2012

AUTORES: Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas MJ, Suárez J, Palomino A, Vida M, Araos P, Bermúdez-Silva FJ, Fernández-Espejo E, Spanagel R, Rodríguez de Fonseca F.

TITULO: Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPAR α receptor-independent mechanism.

REVISTA: *Addiction Biology* doi: 10.1111/adb.12006. [Epub ahead of print] 2012

Se encuentran en revisión o enviados diversos artículos:

AUTORES: Rodríguez-Espinosa N, Ramiro-Fuentes S, Fernandez-Espejo E

TITULO: Repeated cocaine upregulates stathmin in the nucleus accumbens and downregulates p21-Arc in the prefrontal cortex.

REVISTA: *Psychopharmacology*. En revisión.

AUTORES: Nagore P, Rodriguez-Espinosa N, Fernandez-Espejo E, Grandes P.

TITULO: Subcellular architecture of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in the mouse dentate gyrus.

REVISTA: *Journal of Neuroscience*. Enviado

AUTORES: Rodríguez-Espinosa N, Ramiro-Fuentes S, Fernandez-Espejo E

TITULO: Altered prepulse inhibition after repeated cocaine in mice lacking D-amino-oxidase.

REVISTA: *Psychopharmacology*. Enviado.

Proceedings

Autores: Puente N, Fernández Espejo E, Grandes P.

Título: Immunocytochemical localization of the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in the mouse dentate gyrus

Tipo de participación: Poster

Congreso: FENS Forum 2012.

Publicación: FENS Forum Abstracts, vol. 2, 2012

Lugar de celebración: Barcelona Fecha : 2012

Autores: Puente N, Fernández-Espejo E, Grandes P

Título: High resolution anatomical localization of the transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) in the mouse dentate gyrus

Tipo de participación: Poster

Congreso: 2012 Annual meeting of the Society for Neuroscience

Publicación: Program No 2012-S-5100-SfN. Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online. Lugar de celebración: Nueva Orleans, USA. Fecha: 13 al 17 de octubre de 2012.

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

Se han realizado los estudios con los ratones carentes de DAO, que se solicitaron a la empresa RIKEN de Japón durante 2010, fueron generados y criados en Japón, y el mes de septiembre de 2010 recibidos. Se ha determinado la respuesta en el PPI basal de los ratones, que no se ha visto afectada por la falta de DAO. El tratamiento crónico con cocaína sí induce en los KO de DAO una sensibilización que se traduce en una respuesta alterada en el PPI, lo que indica que el exceso de D-serina incrementa la respuesta a cocaína y su sensibilización en el filtrado sensorial. Por tanto, podría tener la D-serina un papel pro-psicótico. Este trabajo ha sido enviado para su publicación a la revista *Psychopharmacology*, con el título “Altered prepulse inhibition after repeated cocaine in mice lacking D-amino-oxidase”.

Además, se han realizado estudios sobre el segundo objetivo relacionado con neuroplasticidad, o sea la administración crónica de cocaína ha de inducir cambios morfológicos sinaptogénicos y neuritogénicos en áreas de los circuitos mesocorticolímbico y mesoestriatal, en paralelo a cambios adictivos. Estos estudios dieron lugar a un capítulo de tesis doctoral de Susana Ramiro Fuentes, leída el 3 de diciembre de 2010 con la máxima calificación, y a un trabajo de fin de máster de la alumna Paula Gavira Martín. La tesis doctoral ha tenido por título: “Estudios sobre el papel de los receptores CB1 y D3 mesolímbicos y cambios neuroplásticos en la adicción a cocaína en ratas”. Este trabajo ha dado lugar a dos artículos relacionados con el tema, uno publicado en *Neuroscience* (167: 205–215, 2010) y otro en *Psychopharmacology* (214:949–959, 2011). El trabajo fin de máster tuvo por título: “Efectos sobre morfología y supervivencia de neuronas de dopamina tras cocaína crónica” (Universidad de Sevilla). Los estudios sobre neuroplasticidad han dado lugar a diversos resultados de interés que se presentan en el apartado correspondiente.

Los estudios sobre neuroplasticidad inducida por drogas de abuso también se han ampliado mediante estudios colaborativos, con trabajos sobre cambios neuroplásticos inducidos por MDMA en ratones y por morfina en ratas, que han dado lugar a una publicación en el año 2010 (*Synapse* 64: 379-389; *Neuroscience*. 165(1):198-211), y a un artículo de revisión en *Pharmaceuticals* (4: 976-991) en el año 2011, y otro recientemente aceptado en colaboración con el grupo del Prof. Rodríguez de Fonseca, donde se estudia el papel neuroplástico de otro tipo de receptores, los PPARalfa. (*Addiction Biology* doi: 10.1111/adb.12006. [Epub ahead of print] 2012).

También se ha estudiado de modo colaborativo el rol de otro receptor relacionado, el receptor vanilloide TRPV1, en ratones carentes del mismo. Se ha estudiado su rol en el test del PPI y su distribución en hipocampo. Este trabajo se ha realizado en colaboración con el Prof. Pedro Grandes, de la Universidad del País Vasco. Ello ha dado lugar a diversas comunicaciones, algunas se adjuntan, y a una publicación enviada a *Journal of Neuroscience*. Dicha publicación se titula: "Subcellular architecture of the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) in the mouse dentate gyrus", y los autores son Nagore P, Rodríguez-Espinosa N, Fernández-Espejo E, Grandes P. Los ratones carentes de TRPV1 también muestran una respuesta alterada de filtrado sensorial en el test del PPI, sobre todo a pre-pulsos de baja intensidad (10 dB). Ello involucraría un normal receptor TRPV1 en el control cognitivo, de modo que su falta facilitaría la aparición de conductas similares a “psicosis” en roedores.

OBJETIVOS PLANTEADOS :(Transcribir los del proyecto original)

Los objetivos generales son dos: 1) discernir el papel de la D-serina del área tegmental ventral en el desarrollo de “psicosis cocaínica” en ratas y ratones normales y mutantes, en relación a cambios neuroquímicos conocidos, y 2) estudiar los cambios plásticos sinaptogénicos y neuritogénicos en los circuitos mesocorticolímbico y mesoestriatal tras cocaína repetida. Los objetivos se abordan desde un punto de vista conductual, neurofarmacológico, morfológico y bioquímico.

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)

Objetivo 1

Los ratones carentes de DAO no presentan un filtrado sensorial alterado medido por PPI, pero la cocaína induce sensibilización cognitiva aumentada con alteración del PPI. La implicación de la D-serina en la sensibilización a cocaína fue descrita en el laboratorio que dirijo por vez primera, y se ha discernido que los cambios neuroplásticos inducidos por este neuromodulador se asocian a “psicosis cocaínica” en roedores. Esto es de interés porque el déficit de DAO, la enzima degradadora de D-serina, se relaciona con vulnerabilidad a psicosis en humanos. El producto génico de DAOA es un activador del gen DAO que sintetiza la enzima DAO, y variaciones en el gen DAO se sabe que inducen efectos indirectos en la neurotransmisión NMDA (Chumakov et al., 2002; Goldberg et al., 2006), lo que se asocia a un alto riesgo de “psicosis cocaínica” en humanos (Satel et al., 1991; Bartlett et al., 1997)

Objetivo 2

Se han realizado estudios sobre neuroplasticidad, o sea la administración crónica de cocaína ha de inducir cambios morfológicos sinaptogénicos y neuritogénicos en áreas de los circuitos mesocorticolímbico y mesoestriatal, en paralelo a cambios adictivos. Estos estudios han dado lugar a una tesis doctoral de Susana Ramiro Fuentes, y a un trabajo de fin de máster de la alumna Paula Gavira Martín. La tesis doctoral ya ha sido presentada con el título: “Estudios sobre el papel de los receptores CB1 y D3 mesolímbicos y cambios neuroplásticos en la adicción a cocaína en ratas”. Este trabajo ha dado lugar a dos artículos relacionados con el tema, uno publicado en *Neuroscience* (167: 205–215, 2010) y otro en *Psychopharmacology* (214:949–959, 2011).

Se ha detectado que la cocaína a dosis repetidas durante 5 días (que inducen sensibilización motora mantenida) induce cambios a largo plazo (a los 18 días de la última dosis, tras un nuevo challenge) en dos marcadores de neuroplasticidad: la estathmina y el p-21Arc. La primera se regula al alza en el núcleo accumbens, lo que podría relacionarse con cambios plásticos sobre síntesis de microtúbulos en dicho núcleo, que es crítico en la consolidación del proceso adictivo. La estathmina es un importante regulador de la dinámica de microtúbulos en neuronas. Por otra parte, p21-

Arc se regula a la baja en la corteza prefrontal, indicando una menor actividad plástica en dicho centro. Este centro se ha relacionado con hipofrontalidad en los adictos, de modo que es interesante una regulación a la baja de dicha proteína plástica. La proteína p21-Arc es un marcador de elongación neurítica, y forma parte del complejo “actin-related protein 2/3” (complejo Arp2/3), que participa de modo decisivo en la polimerización de la actina y en la organización de los filamentos resultantes (Goldberg et al., 2000; Goley y Welch, 2006). Finalmente, hay también cambios subcrónicos tras cocaína típicos (en la quinta inyección continuada), como aumento de la expresión de tirosina-hidroxilasa en estriado dorsal y ventral y de PKA en corteza prefrontal y nucleus accumbens, de acuerdo con diversos autores (Terwilliger et al., 1991; Vrana et al., 1993). Estos cambios se relacionan con cambios neuroplásticos tempranos de naturaleza adictiva en animales de experimentación y en humanos. Ello ha dado lugar a un artículo enviado a *Psychopharmacology*.

APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRACTICA DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE LAS DROGODEPENDENCIAS.

Se ha observado que los ratones carentes de DAO, D-aminooxidasa, presentan una respuesta psicotogénica más acentuada al tratamiento crónico con cocaína, con clara alteración del PPI. Ello podría explicar cierto papel de la D-serina en la psicosis cocaínica.

Se ha observado que la cocaína crónica induce cambios morfológicos sinaptogénicos y neuritogénicos que indican una profunda remodelación sináptica en las neuronas del nucleus accumbens y corteza prefrontal, de los circuitos mesocorticolímbico y mesoestriatal, con cambios citotóxicos importantes en cultivo. Ello tiene repercusiones en la comprensión de los cambios plásticos subyacentes a la adicción en humano, pues concuerdan con el papel del núcleo accumbens y la hipofrontalidad detectada en la consolidación de la adicción, y en el daño citotóxico inducido por las drogas de abuso como la cocaína.

Finalmente, se ha detectado que los receptores PPARalfa y TRPV1 participan en los cambios plásticos inducidos por cocaína, lo que podría tener repercusiones en la comprensión de la neuroplasticidad inducida por cocaína.

PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL PROYECTO.

Se ha registrado en 2011 una patente indirectamente relacionada con el proyecto, sobre el uso de sulfamidas.

Patente nº P201130486 (española)

Título: USO DE DERIVADOS DE SULFAMIDAS COMO NEUROPROTECTORES

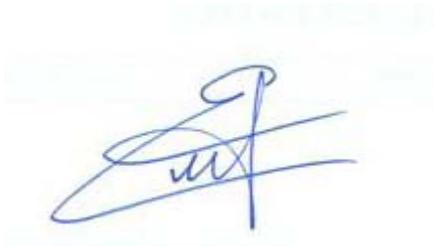
Inventores: Rodríguez de Fonseca, Fernando; Suárez Pérez, Juan; Romero Cuevas, Miguel; Fernández Espejo, Emilio; Goya Laza, Pilar; Prosper, Juan Antonio

OTRAS SUBVENCIONES O AYUDAS RECIBIDAS PARA ESTE PROYECTO: origen, cantidad, en qué se aplica

Ninguna

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR.

En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección pndinvestigación@msps.es la presente memoria.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a vertical stroke, positioned above the text 'Investigador principal'.

Investigador principal

En Sevilla a 20 de diciembre de 2012