



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

1ª ANUALIDAD 2ª ANUALIDAD 3ª ANUALIDAD FINAL

Nº Expediente: 2012I102

Investigador principal: David Pubill Sánchez

Otros investigadores: Jorge Camarasa García, Elena Escubedo Rafa, Andrés Ciudad Roberts (becario predoctoral)

Título del Proyecto o subproyecto: Estudio preclínico de la comorbilidad asociada al consumo conjunto de alcohol y mefedrona en la adolescencia.

Título del Proyecto Coordinador en el que se integra (sólo en caso de ser un subproyecto):

Organismo: Universidad de Barcelona

Centro: Facultad de Farmacia

Departamento: Farmacología y Química Terapéutica, Unidad de Farmacología y Farmacognosia

Área temática: (según convocatoria) Comorbilidad y complicaciones derivadas del consumo de cocaína y alcohol. (específica). Consecuencias del consumo conjunto de alcohol y nuevas drogas de diseño en la adolescencia.

Palabras clave: mefedrona, alcohol, neurotoxicidad, policonsumo, adolescencia, adicción, comorbilidad

RESUMEN: (objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2000 palabras).

1. Ámbito de estudio y objetivos

Recientemente han irrumpido en el mercado ilegal **nuevas drogas psicoestimulantes** de síntesis, que se comercializaban inicialmente a través de circuitos legales como Internet (*Legal highs*) en diferentes presentaciones (fertilizante para plantas, sales de baño, ambientadores...), hasta su clasificación como drogas ilegales y reciente prohibición. Su variedad química hace que sus efectos y mecanismos de acción puedan ser diversos, así como su interacción con otras drogas, bien sean legales (alcohol) o ilegales.

La **mefedrona** (4-metil-metcatinona, conocida como MCAT o Miaow-Miaow) encabeza la lista de estas nuevas drogas. Esta sustancia sigue un patrón de consumo similar al de las anfetaminas y los consumidores refieren efectos similares a los de la cocaína y el éxtasis, siendo su intensidad (la referida por los propios consumidores) intermedia entre esas dos drogas de abuso.

Asimismo, el **alcohol** (etanol, EtOH) es la droga más consumida por jóvenes y adolescentes en nuestro país, normalmente siguiendo un patrón de altas dosis concentradas en el fin de semana y finalidades lúdicas. En esta etapa también es muy frecuente el policonsumo de alcohol con otras sustancias psicoactivas, entre las que se encuentra la mefedrona. Existen numerosos trabajos que demuestran el riesgo neurológico que representa este patrón de consumo de alcohol en la adolescencia.



La adolescencia es un periodo de la vida donde la maduración del cerebro culmina, siendo especialmente vulnerable a los efectos perjudiciales de las drogas, y donde existe una gran predisposición para adquirir conductas de riesgo y adictivas. De aquí la gran importancia del estudio de los efectos y los riesgos del consumo de drogas en esta etapa.

Hipótesis

Dada la semejanza de mecanismos de acción de la mefedrona con los de otros derivados amfetamínicos como la MDMA y la elevada vulnerabilidad al consumo de drogas psicoactivas, muchas veces policonsumo con alcohol, que presenta el cerebro del adolescente, se deriva la hipótesis principal:

El consumo conjunto de alcohol, en la adolescencia, potenciaría los efectos conductuales y neurotóxicos de la mefedrona.

Por lo tanto, el **objetivo general** del Proyecto es:

Estudiar en animales de experimentación si la administración conjunta de alcohol y mefedrona durante la adolescencia potencia los efectos conductuales y neurotóxicos de ésta a corto y largo plazo.

Los objetivos específicos se detallan en el apartado correspondiente. Las actividades realizadas se resumen a continuación:

a. Estudio de los efectos psicoestimulantes

Dado que uno de los objetivos del Proyecto consiste en determinar si el alcohol potencia los efectos psicoestimulantes de la mefedrona, se han realizado experimentos para determinar, a nivel agudo, si ello se produce. La técnica utilizada ha sido la medida de la **actividad locomotora**. Para llevarlo a cabo se han utilizado ratones Swiss CD-1 macho, adolescentes (de unas 4 semanas). Después de ensayos previos, las dosis de alcohol y mefedrona se han elegido de tal manera que la de mefedrona diera un incremento de locomoción submaximal, mientras que la de alcohol no provocara efectos depresores. Así, se utilizó una dosis de mefedrona de 10 mg/kg y una de etanol de 1 g/kg. También se realizaron ensayos en presencia de los **antagonistas de los receptores 5HT_{2A} y D₂** ketanserina (1mg/kg) y haloperidol (0,25 mg/kg), respectivamente, que fueron administrados vía intraperitoneal 15 min. antes del respectivo tratamiento establecido.

Los resultados y posterior análisis estadístico mostraron que **la mefedrona produce un incremento significativo de la actividad locomotora y que éste se ve potenciado con la administración conjunta de etanol** a la dosis ensayada (Figura 1 A y B). El etanol solo no produjo cambios significativos en la actividad locomotora en comparación con los ratones que recibieron suero fisiológico.

Tanto haloperidol como ketanserina disminuyeron la hiperlocomoción inducida por mefedrona, lo que indica que tanto dopamina como serotonina intervienen en este efecto, pero sólo **el haloperidol fue capaz de inhibir la potenciación por parte del EtOH** por lo que concluimos que la potenciación viene mediada por un aumento de la liberación de dopamina en el estriado (Figura 1C).

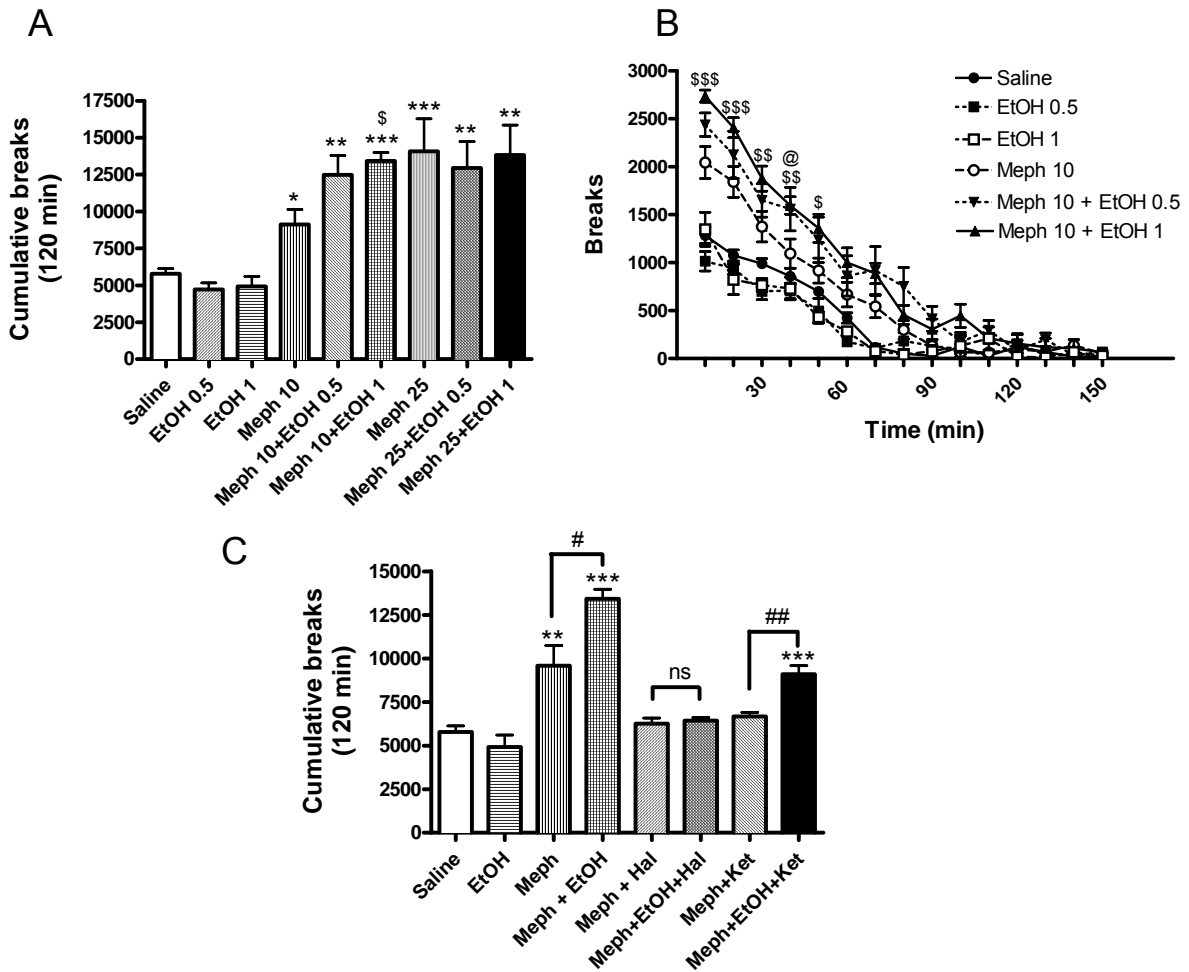


Figura 1. A. Actividad locomotora en ratones adolescentes tras la administración de suero fisiológico (saline), etanol (1 g/kg, EtOH), mefedrona (10 y 25 mg/kg, Meph) y la asociación de ambas drogas. Los valores corresponden al área bajo la curva (AUC) de los trazados que representan las interrupciones de los haces de infrarrojo (breaks) por ratón durante un tiempo de 150 minutos (panel B). El panel C muestra el efecto de los antagonistas D₂ (haloperidol, Hal) y 5-HT_{2A} (ketanserin, Jet) sobre los efectos de la mefedrona y su asociación con EtOH. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.01 diferencia significativa vs. saline; \$ P < 0.05, \$\$ P < 0.01, \$\$\$ P < 0.01, comparación entre Meph 10 + EtOH 1 vs. Meph 10; @ P < 0.05, comparando Meph 10 + EtOH 0.5 con Meph 10; ns, no significativo. #P < 0.05, ##P < 0.01 entre los grupos indicados.

b. Estudios sobre potencial adictivo: preferencia condicionada de lugar

Se ha utilizado un aparato dotado de dos compartimentos de iguales dimensiones pero claramente diferenciados desde el punto de vista sensorial (color y textura) y comunicados por un corredor. El fundamento es que un animal tratado con una droga reforzadora durante varias sesiones y confinado en uno de los compartimentos, tendrá mayor preferencia para permanecer en éste cuando se le dé libre acceso a ambos, ya que buscará volver a experimentar la sensación que le produjo la droga. A mayor permanencia en el compartimento de droga, mayor capacidad de recompensa de ésta, lo que se puede relacionar con el potencial adictivo. El protocolo detallado se explica en la publicación en el *Br. J. Pharmacol.* que se adjunta.

En la Figura 2 se observa que los ratones tratados con MEF y MEF+EtOH presentaron condicionamiento positivo ($P < 0.05$) comparados con los controles (suero, *saline*) a ambas dosis de MEF. **Ello confirma las propiedades de recompensa de la mefedrona.** El índice de



preferencia para ambas dosis de mefedrona fue similar en promedio. Para una misma dosis de MEF, los animales que además habían recibido alcohol presentaron una mayor preferencia, siendo estadísticamente significativa a la dosis de MEF de 25 mg/kg. Como era de esperar y así se había diseñado, el EtOH solo, a la dosis usada (0,75 mg/kg) no produjo preferencia de lugar. Así pues, podemos concluir que en estas condiciones **el etanol potencia los efectos de recompensa de la mefedrona**.

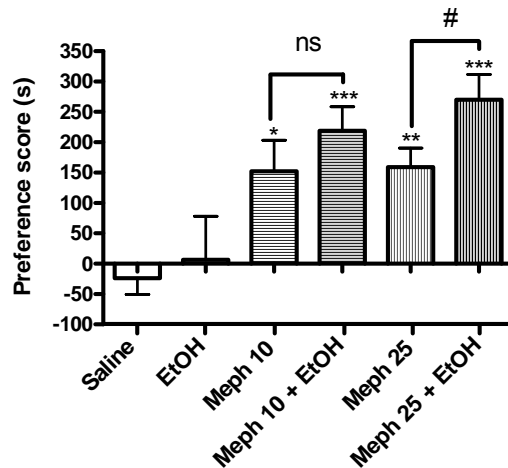


Figura 2. Preferencia condicionada de lugar tras la administración de MEF a 10 y 25 mg/kg sola o asociada a 0,75 g/kg de EtOH. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs saline; # $P < 0,05$ vs MEF 25.

c. Estudio sobre los cambios transcripcionales. Estudios con *microarrays*

Dado que la adquisición de condicionamiento implica cambios neuronales mediados por diversos fenómenos de plasticidad neuronal, los animales utilizados en el experimento de preferencia condicionada de lugar se sacrificaron 24 h después de la fase de prueba, diseccionándose los cerebros y almacenando las diferentes áreas a -80°C para su posterior procesado. Se extrajo el RNA total del estriado anterior, que contiene el núcleo accumbens, implicado en los procesos reforzadores y de adicción y se realizaron se hibridaron con un *microarray* GeneChip Mouse Gene 1.0 ST de Affymetrix, que contiene 28.869 transcritos y variantes. Esta tarea fue encargada a la Unitat de Genòmica Funcional, IDIBAPS, Barcelona, Spain. El análisis genómico se realizó con el programa informático GeneSpring GX.

Después del tratamiento de datos, de entre los genes que experimentaron cambios significativos, se escogieron 5 genes potencialmente interesantes, que sufrieran una expresión diferencial de al menos 1,4 veces, con una $P < 0,01$. Dichos genes y expresión diferencial se validaron mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR). Curiosamente, ninguno de los genes con expresión modificada correspondió a transportadores de neurotransmisores pero sí se observó un cambio importante en la expresión del gen del receptor dopaminérgico D3 (Drd3). Los resultados de estos ensayos se detallan en la publicación en el *Br. J. Pharmacol.*

Se detectaron incrementos por mefedrona en genes implicados en plasticidad neuronal como el de la sinaptotagmina 10 (Syt10), el Arpc5, cuyo grado de sobreexpresión se correlaciona directamente con el índice de PCL. Además, también encontramos la transcripción del gen Camkk1 incrementada de manera significativa en los dos grupos tratados con mefedrona. La proteína que codifica este gen tiene una función importante en la activación de la cinasa dependiente de la cinasa dependiente de calmodulina (cascada de señalización CaMKK-CaMKI), que está directamente implicada en la dinámica de la actina que, a su vez, participa en los procesos de plasticidad sináptica.



También encontramos sobreexpresado de manera significativa el gen Muted en los grupos tratados con mefedrona. Este gen codifica para el complejo BLOC-1 el cual, a su vez, interacciona con el complejo WASH, un activador de ARP2/3 y, por lo tanto, regula también la polimerización de la actina (Ryder et al., 2013). BLOC-1 tiene un papel clave en el tráfico de endosomas ya que se ha implicado en la regulación de la densidad de receptores D₂ en membrana, la biogénesis y fusión de vesículas sinápticas y el desarrollo de neuritas. Estas funciones son clave en el desarrollo neuronal y la transmisión sináptica y probablemente también están implicadas en la adquisición del condicionamiento positivo.

Es bien conocido el estrés oxidativo que inducen los derivados anfetamínicos. Dicho estrés puede ocasionar disfunción mitocondrial y desencadenar apoptosis. En el análisis de los *microarrays* encontramos sobreexpresados de manera notable cinco genes relacionados con la apoptosis en los grupos tratados con mefedrona. Estos fueron Nfu1 y Gpx6, que codifica para una glutatión peroxidasa, que son unas enzimas cruciales en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno.

d. Papel de los receptores dopaminérgicos D₃ en la adquisición del condicionamiento por mefedrona.

El hecho de que en los ensayos de *microarrays* obtuviéramos un marcado incremento en la transcripción del gen del receptor dopaminérgico D₃ y dado que diversos trabajos implican a este receptor en la adquisición de conductas adictivas (Song y col., 2012, *Addict. Biol.*, 17:259-73), nos planteamos un nuevo objetivo secundario que permitiría ofrecer una **aproximación mecanística** a los efectos observados, así como plantear una **hipótesis farmacológica** para prevenirlos.

Concretamente, hemos utilizado el antagonista de los receptores D₃, SB-277011A para pretratar un grupo de ratones y someterlos a PCL, conjuntamente a ratones que no recibieron el antagonista y comparar los efectos reforzadores de la mefedrona sola y asociada a alcohol.

El resultado ha sido claro, tal y como puede apreciarse en la figura 3: **el SB-277011A (SB) antagonizó totalmente tanto la PCL inducida por mefedrona como la de su asociación con alcohol**, la cual cosa refuerza la hipótesis que el antagonismo de los receptores D₃ podría utilizarse para tratar trastornos adictivos como el que nos ocupa, si bien los ensayos realizados hasta la fecha en humanos no han arrojado resultados esperanzadores. **Asimismo, el antagonista inhibió la sobreexpresión del gen del receptor D₃** e, incluso, redujo sus niveles basales en el grupo control y EtOH. Ello indica que el estado del receptor D₃ es capaz de regular su propia transcripción.

Se ha descrito que el factor neurotrófico BDNF participa en la regulación al alza de Drd3 inducida por drogas adictivas como la cocaína (Le Foll y col., 2005, *Neuroreport* 16:175-178), por la cual cosa decidimos también estudiar el papel de sus receptores en la adquisición de PCL inducida por mefedrona y en la regulación al alza de Drd3 que también inducía esta catinona. Por esta razón, se realizó otro tratamiento en que se incluían grupos tratados con un antagonista del receptor del BDNF (TrkB), el ANA-12 (0.5 mg/kg, i.p.), asociado o no a mefedrona, dos dosis diarias durante 2 días previos y durante el protocolo de PCL.

Como puede apreciarse en la figura 3B **el pretratamiento con ANA-12 antagonizó completamente el condicionamiento inducido por mefedrona. Asimismo, inhibió la regulación al alza del RNA de Drd3** (ver artículo *Br. J. Pharmacol.*). Para corroborar la participación del BDNF, el cual se ha descrito que se libera de inmediato tras administrarse la droga, medimos los niveles de su mRNA en corteza prefrontal (se ha descrito que después retrocede hasta núcleo accumbens) tras la administración aguda de mefedrona. Los resultados mostraron incrementos del 50 y 100% a las 2 y 4 h tras la administración, respectivamente, lo que

corroborar su participación en los procesos descritos.

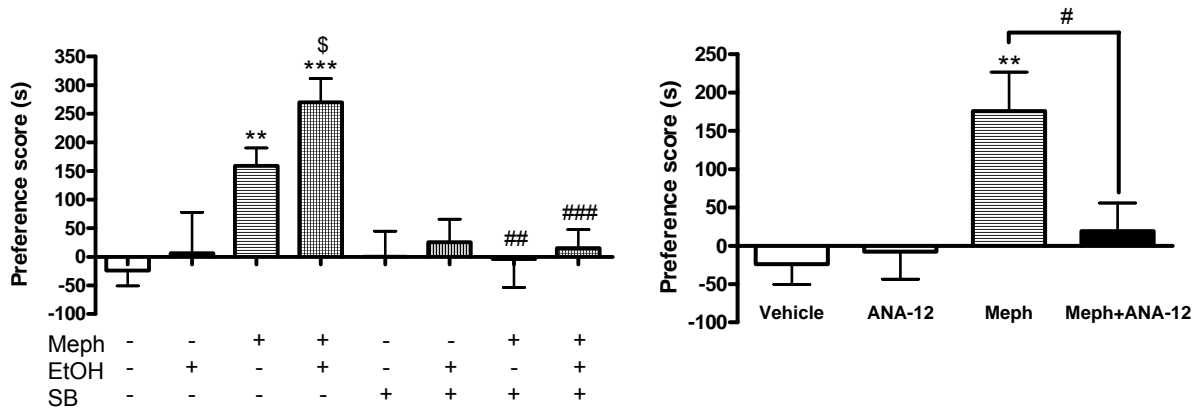


Figura 3. Preferencia condicionada de lugar tras la administración de mefedrona (Meph) a 25 mg/kg sola o asociada al antagonista del receptor D₃, SB-277011A (SB) (panel A) o al antagonista del receptor al BDNF, ANA-12 (panel B). ** P<0,01 y ***P<0,001 vs saline; #P<0,05 entre los grupos indicados; ## P<0,01 y ###P<0,001 vs. el correspondiente grupo sin SB.

Estos resultados indican, pues, que durante el condicionamiento con mefedrona se produce una activación del receptor TrkB, probablemente por BDNF, que participa en la adquisición del condicionamiento y en la posterior regulación al alza del mRNA del receptor D₃.

e) Estudios de microdialisis sobre la liberación de neurotransmisores inducida por mefedrona sola o asociada a alcohol.

Tal y como ya se comunicó oportunamente, este tipo de experimentos que inicialmente estaba previsto realizar en un centro del NIDA, ha acabado realizándose en nuestro laboratorio, ya que un miembro del grupo (Raúl López Arnau) aprendió la técnica con un grupo de Cagliari (Cerdeña) y Andrés Ciudad también tuvo la oportunidad de aprenderla durante su estancia en Baltimore.

Dada la dificultad de aplicar la técnica en ratones debido a su tamaño, y tras el consejo de los grupos donde nuestro personal aprendió la técnica, finalmente se ha decidido realizarla en ratas, con lo que aseguramos más las posibilidades de éxito.

Los imprevistos iniciales y problemas con el detector electroquímico del servicio donde se debía llevar a cabo el análisis de los dializados provocaron un cierto retraso en el inicio de la técnica, pero finalmente se optimizó tanto la técnica en sí como el proceso de detección mediante espectrometría de masas. Como aspecto positivo, ahora disponemos de la metodología en nuestro laboratorio, lo que permite dar continuidad a este tipo de estudios.

Se han realizado experimentos midiendo la liberación de dopamina y serotonina en el núcleo acumbens tras la administración de mefedrona (25 mg/kg), etanol (1 g/kg) y su asociación. **Los resultados muestran, claramente, un marcado incremento de los niveles de ambos neurotransmisores tras la administración de mefedrona y una potenciación de dicho incremento en el caso de combinarla con etanol.** Ello confirma claramente nuestra hipótesis y concuerda con los experimentos conductuales que demuestran el poder de recompensa y adictivo de la mefedrona. Asimismo, se ha observado una disminución de los metabolitos de dopamina (DOPAC y HVA) y serotonina (5-HIAA) que podría deberse, tal y como está descrito para otros derivados anfetamínicos, a la inhibición de la recaptación de monoaminas y a la

posible inhibición de la monoaminooxidasa, lo cual impediría el metabolismo de dichas monoaminas y explicaría la disminución detectada en sus metabolitos. A continuación se muestran los gráficos más representativos de dichos experimentos.

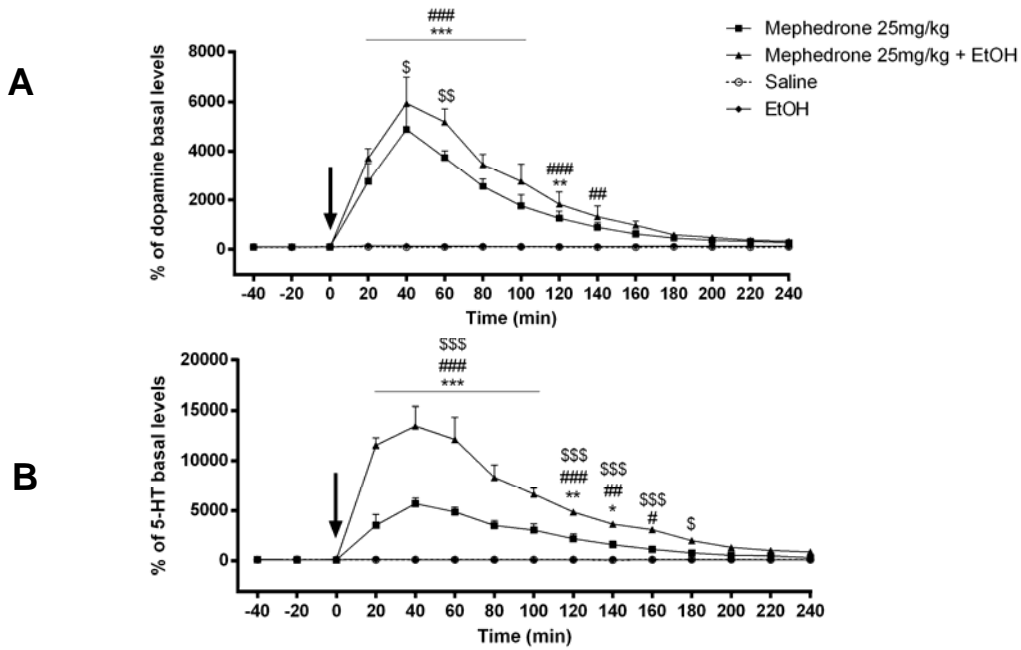


Figura 4. Niveles de dopamina (A) y serotonina (5-HT, B) en núcleo acumbens de rata tras la administración de mepedrona (Meph) a 25 mg/kg sola o asociada a etanol (1 g/kg). *P<0,05; ** P<0,01 y ***P<0,001 mepedrona vs saline; #P<0,05; ##P<0,01 y ###P<0,001 mepedrona vs. Mepedrona+etanol; entre los grupos indicados; \$P<0,05 y \$\$P<0,01; \$\$\$P<0,01, Mepedrona+etanol vs. Saline. Los resultados son la media \pm SEM de 4 animales por grupo.

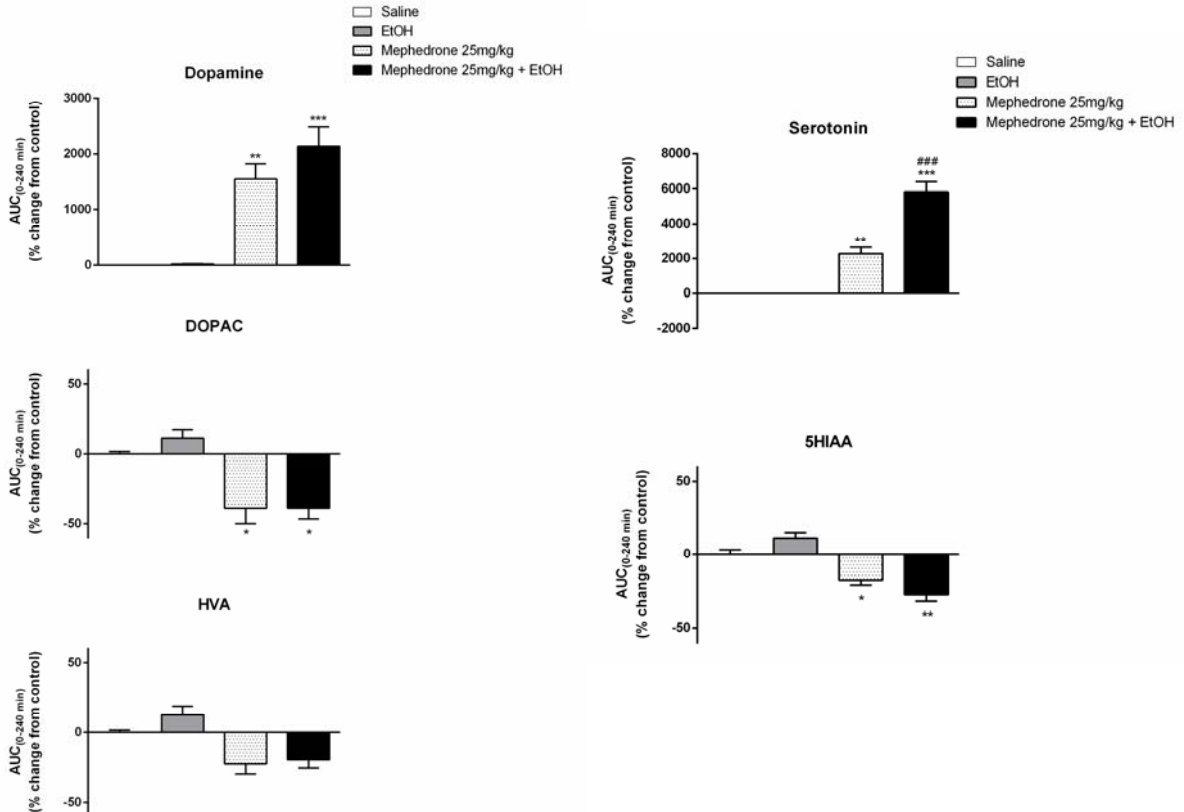




Figura 5. Niveles de dopamina, sus metabolitos (DOPAC y HVA) y serotonina y su metabolito (5-HIAA) en núcleo accumbens de rata tras la administración de mefedrona (Meph) a 25 mg/kg sola o asociada a etanol (1 g/kg). Los resultados se muestran como el área bajo la curva (AUC) de los niveles de cada compuesto en el dializado durante los 240 min de duración del experimento. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs saline; #### $P < 0,001$ vs. Mefedrona. Los resultados son la media \pm SEM de 4 animales por grupo.

e. Estudios sobre neurotoxicidad y/o cambios neuroquímicos

Ya que debido a su similitud con el éxtasis es posible que la mefedrona también produzca neurotoxicidad o alteraciones neuroquímicas similares, se han llevado a cabo experimentos que permiten valorar dichas alteraciones. Se utilizaron ratones machos de unas 4 semanas. Los grupos de tratamiento fueron suero (saline), mefedrona (MEPH, 25 mg/kg 4 dosis en un día, separadas 2h), etanol y Mefedrona + etanol. La dosis de etanol fue decreciente en cada administración, con el fin de que las concentraciones plasmáticas fueran más constantes, ya que su aclaramiento es más lento que el de la mefedrona. Así, se administraron dosis de 2, 1,5, 1,5 y 1 g/kg, solas o conjuntamente con la mefedrona.

Con el fin de corroborar que los niveles de etanol permanecían constantes durante todo el tratamiento usando esta pauta, se realizó un ensayo paralelo en el cual se determinó, mediante cromatografía de gases, la concentración de etanol en sangre 1 hora después de cada administración. Como era de prever, el nivel de alcoholemia de los animales osciló poco a lo largo del tratamiento.

Ya que está descrito para la MDMA que la hipertermia y la temperatura ambiente elevada (correspondería en humanos a aglomeraciones en ambientes cerrados) potencian la neurotoxicidad, la temperatura de la sala se mantuvo a 27 °C durante el tratamiento y hasta una hora después de la última administración. Los animales se sacrificaron al cabo de 7 días, extrayéndose los cerebros y diseccionando la corteza, el hipocampo y el estriado, que se congelaron hasta su procesado. De estas muestras se obtuvo la fracción cruda de membranas, para ensayos de fijación de radioligandos, y la fracción soluble para la determinación de tirosina hidroxilasa.

Se realizó la fijación de [³H]paroxetina (marcador del transportador de serotonina, SERT) para evidenciar alteración serotoninérgica, mientras que se utilizó el [³H]WIN 35428 (marcador del transportador de dopamina, DAT) para detectar alteración dopaminérgica. Los resultados mostraron una **disminución significativa de la fijación de [³H]paroxetina en el hipocampo** de ratones tratados con EtOH y MEPH (Fig. 6A), y una **potenciación con una disminución prácticamente del doble, en el grupo MEPH+EtOH**. Sin embargo, no se detectaron cambios en la fijación de este radioligando en la corteza de los diferentes grupos de tratamiento.

Por lo que respecta a la alteración dopaminérgica, se detectó una disminución, aunque no estadísticamente significativa, de la fijación de [³H]WIN 35428 en corteza frontal del grupo MEPH y una potenciación en dicho descenso, ésta sí muy significativa, en el grupo MEPH+EtOH (Fig. 6B). No se detectaron cambios significativos en la fijación de este radioligando en el estriado.

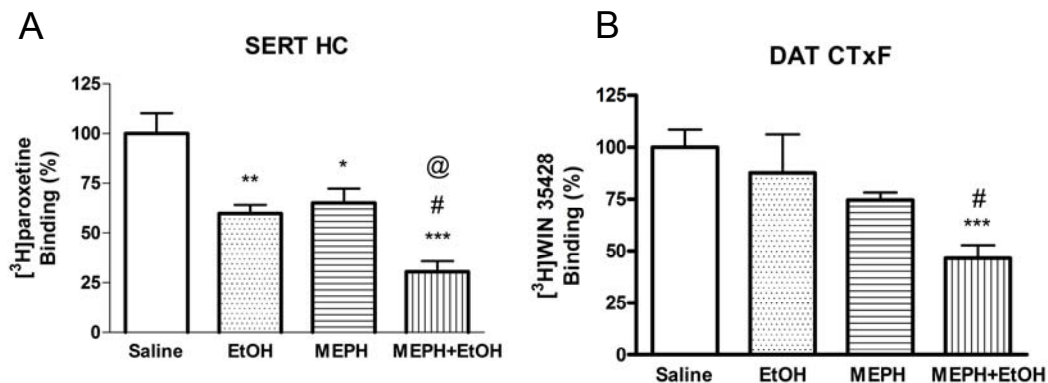


Figura 6. Fijación de radioligandos marcadores de los transportadores de serotonina en hipocampo (panel A) y de dopamina en corteza frontal (panel B) en los distintos grupos de tratamiento. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ vs saline; # $P < 0,05$ vs MEPH; @ $P < 0,05$ vs EtOH.

Como ensayo complementario, se realizó en extractos de corteza cerebral e hipocampo la determinación de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH) y triptófano hidroxilasa 2 (TPH2) mediante Western blot. Dichas enzimas son las limitantes en la síntesis de dopamina y serotonina respectivamente; su disminución indica algún tipo de disfunción en las correspondientes vías neuroquímicas. Los resultados de TH mostraron unos resultados parecidos a los de la fijación del $[^3\text{H}]\text{WIN 35428}$, lo que confirma la alteración dopaminérgica en corteza. Merece la pena **destacar la disminución significativa que provoca el etanol solo**, lo cual corrobora la hipótesis y el mensaje de que el abuso de etanol, en sí mismo, ya es nocivo para el SNC. Las imágenes correspondientes pueden observarse en la publicación en el *Toxicol. Appl. Pharmacol.*

Por lo que respecta a la TPH2, etanol y mefedrona también produjeron una moderada pero significativa disminución (alrededor del 20%) en el contenido de la enzima, que se vio potenciada (hasta alrededor de un 35%) cuando se asociaron ambas drogas.

De todo ello podemos deducir que, **en ratón adolescente, la mefedrona provoca una lesión/alteración serotoninérgica en el hipocampo y dopaminérgica en la corteza, las cuales se potencian con su asociación a etanol**, la cual cosa corrobora el incremento en la vulnerabilidad al daño neuroquímico en el consumo conjunto de ambas drogas. Asimismo, **se corrobora la alteración que el etanol puede producir por sí solo**.

Peroxidación lipídica

Dada la ampliamente reconocida implicación del estrés oxidativo en la neurotoxicidad por derivados anfetamínicos, el tratamiento anterior se repitió sacrificando los animales a las 24 h (ya que es entre las 12 y 24h donde se produce el máximo de dicho estrés) y se procedió a la valoración de la peroxidación lipídica (una medida del estrés oxidativo) se realizó mediante un kit que mide la concentración de malondialdehído (MDA). Tal y como puede observarse en la figura 2 de la publicación en *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, en las áreas cerebrales donde se habían apreciado cambios en los estudios previos con radioligandos, **la asociación de mefedrona y alcohol provocó un mayor incremento en los niveles de MDA, que se relaciona con una mayor peroxidación lipídica y, por tanto, mayor estrés oxidativo**. Por otra parte, el tratamiento con mefedrona sola indujo un incremento significativo ($P < 0,05$) en el hipocampo, observándose una tendencia al incremento (aunque no estadísticamente significativa) en la corteza frontal. Con el etanol se observó también un cierto incremento, si bien no significativo en ambas áreas. De ello deducimos que la asociación de Meph+EtOH provoca un mayor estrés oxidativo que la administración de ambas drogas solas.



Estrés oxidativo: expresión de proteínas relacionadas

Asimismo, con las muestras del anterior tratamiento se determinaron, en corteza cerebral frontal (un área afectada por los cambios en los transportadores de monoaminas) mediante **Western blot, los niveles de proteínas enzimáticas relacionadas con el estrés oxidativo** como son la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa 1 (GPx1) y la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS). Se observaron, tras el tratamiento, incrementos en las tres primeras enzimas, así como una disminución de la nNOS.

Como puede observarse en la figura 3 de la publicación en el *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **fue el tratamiento con mefedrona el determinante de los cambios observados** en la expresión ya que el etanol, administrado solo, no produjo ningún efecto estadísticamente significativo en ninguna de las enzimas estudiadas y no se observó potenciación en la asociación Meph+EtOH.

La catalasa y la SOD son dos enzimas encargadas de degradar el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, respectivamente, las cuales se producen en situación de estrés oxidativo como consecuencia del metabolismo intracelular de la dopamina y serotonina que se liberan al citosol en gran cantidad tras la administración de derivados anfetamínicos como la metanfetamina o la MDMA. La glutatión peroxidasa cataliza la reacción de oxidación del glutatión a glutatión disulfuro, utilizando para ello peróxido de hidrógeno. Tiene como principal función proteger al organismo del efecto degradante de los hidropéroxidos formados de forma endógena.

Finalmente, la nNOS produce óxido nítrico (NO) a partir del aminoácido L-arginina. Si bien el NO juega en el SNC un papel como neurotransmisor, la sobreexpresión de la forma inducible neuronal (nNOS) se ha asociado con procesos de excitotoxicidad por glutamato y con drogas como la metanfetamina, ya que el NO es un radical libre que puede reaccionar fácilmente con el anión superóxido para generar peroxinitrito, que es una especie reactiva de oxígeno muy nociva para la célula. Dado que el tratamiento con mefedrona genera estrés oxidativo, es coherente pensar que las neuronas regulen a la baja la nNOS para no empeorar la el daño oxidativo ya iniciado.

El incremento en estas enzimas sería, pues, la consecuencia de una respuesta celular para intentar neutralizar las especies reactivas que se están produciendo como consecuencia del tratamiento. La no diferencia entre los resultados en los grupos mefedrona y mefedrona+alcohol indican que ambos tratamientos inducirían una respuesta máxima que, en ambos casos, no sería totalmente capaz de neutralizar todo el estrés oxidativo producido, lo cual se traduciría en los incrementos en los marcadores de daño neuronal anteriormente expuestos.

f. Efectos sobre la neurogénesis

Existen trabajos que demuestran un efecto nocivo del alcohol en la **neurogénesis** del hipocampo de ratas o ratones adolescentes (Ehlers y col., 2013, *Neuroscience* 244:1-15) así como de la MDMA (Hernández-Rabaza y col., 2010, *Addict. Biol.* 15:413-23). Por ello, y dados los resultados obtenidos, consideramos interesante estudiar los efectos de Meph y EtOH, así como su asociación en la neurogénesis, principalmente del hipocampo. Por ello se realizó un tratamiento análogo al expuesto más arriba, pero con la diferencia de que los ratones recibieron dos inyecciones de bromo-desoxiuridina (BrdU), y se sacrificaron a los 28 días. La bromo-desoxiuridina se incorpora como un falso nucleótido en las células que se están dividiendo (células precursoras neuronales que se encuentran en la zona granular del hipocampo) y se transmite a las células hijas. Esta sustancia puede marcarse mediante un anticuerpo específico mediante inmunohistoquímica y dar una medida de la neurogénesis que se ha producido. Tras el tratamiento se perfundieron los ratones con paraformaldehído y se realizaron los cortes de los



cerebros fijados para realizar las inmunohistoquímicas.

Después de poner a punto la inmunohistoquímica para determinar la BrdU en cortes mediante fluorescencia y microscopio confocal. Se realizó un **doble marcaje** con anti-NeuN (proteína que marca exclusivamente las neuronas) y con anti-BrdU, para poder determinar si las células marcadas con BrdU son neuronas u otros tipos celulares (glia, etc.). Los resultados y su posterior análisis demostraron un menor número de células hijas en los animales tratados con mefedrona, y aún menor en los tratados con la combinación con etanol (Figura 7). Ello nos indica que, tras el tratamiento intensivo de 1 día con mefedrona, asociada o no a alcohol, **además de producirse los signos de neurotoxicidad anteriormente expuestos, se produce una inhibición de la neurogénesis, que podría traducirse en deterioro cognitivo.**

g. Estudios sobre el deterioro cognitivo.

Laberinto acuático de Morris

Las alteraciones neurológicas producidas por las drogas de abuso pueden tener efectos negativos sobre diferentes tipos de memoria. Una de las metodologías más utilizadas para evaluar memoria espacial es el laberinto acuático de Morris. Consiste en medir la capacidad del animal para recordar la posición de una plataforma oculta bajo el nivel del agua de una piscina y que le sirve para escapar del estímulo aversivo que le representa estar en el agua nadando. **Hemos optimizado la técnica para ratón**, ya que hasta el momento sólo la habíamos realizado en ratas. El ensayo se realizó con los mismos animales utilizados posteriormente para neurogénesis, iniciándose el día 7 después de finalizar el tratamiento.

Del análisis de los resultados, los cuales se muestran en la Fig. 4 del artículo en *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, se observa que el tratamiento con mefedrona empeora la curva de aprendizaje de los ratones, siendo el emperoramiento mayor en el grupo que recibió la combinación con etanol. Asimismo, el día de la prueba, los animales que recibieron la combinación de drogas tardaron significativamente más en alcanzar el área donde se encontraba la plataforma. Así pues **podemos concluir que, en ratones adolescentes, la mefedrona empeora el aprendizaje y la memoria en el laberinto acuático de Morris y que, en algunos de los parámetros medidos, dicho efecto está potenciado por el alcohol.**

Se ha descrito que la serotonina, en el hipocampo, juega un papel primordial en la neurogénesis (Brezun y Daszuta, 1999, 12, *J. Neurosci.* 89:999-1002) y en el establecimiento de la memoria espacial. Así pues, **la disfunción serotoninérgica inducida por mefedrona y su combinación con etanol que hemos descrito, afectaría negativamente a la neurogénesis y a los procesos cognitivos espaciales.**

Evitación pasiva

Se realizó este test en otro grupo de ratones tratado con la misma pauta neurotóxica descrita anteriormente, una semana después del día de tratamiento. Esta prueba mide la capacidad del ratón para recordar un estímulo aversivo (descarga eléctrica) que se produce al entrar en un compartimento del recinto que, a priori, parece más seguro al estar cubierto. Los ratones se sometieron a dos sesiones de aprendizaje consecutivas, en las que se midió el tiempo promedio (en s) que tardaban en entrar en el compartimento cubierto, donde la primera vez se les cerraba la salida y la segunda se les aplicaba la descarga y al cabo de 2 h se volvieron a someter al test. Se calculó la diferencia de tiempos entre la prueba final y las de aprendizaje. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Tiempo (s, test – prueba) (media ± SEM)
Suero fisiológico (control)	192,25 ± 26,78
Alcohol	190,33 ± 31,89
Mefedrona	221,17 ± 22,33
Mefedrona + alcohol	179,17 ± 22,83

Como puede apreciarse, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que **los animales tratados con las drogas no han perdido (o han recuperado) al cabo de una semana, la capacidad de recordar un estímulo aversivo reciente**. Así pues, podemos decir que la mefedrona se comporta, en este test, de manera similar a la MDMA (Murnane y col., 2012, *Psychopharmacology* 220, 495-508).

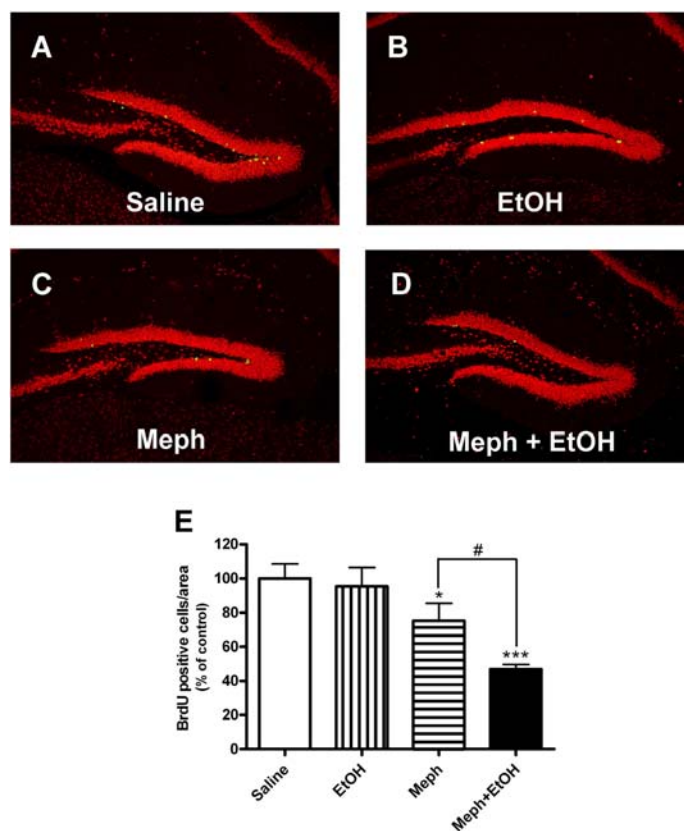


Figura 7. A-D, Doble marcaje inmunohistoquímico de neuronas (NeuN, en rojo) y de neuronas de reciente producción (neurogénesis, BrdU, en verde) en cortes del giro dentado del hipocampo de ratones adolescentes que recibieron los tratamientos indicados. E., cuantificación y estadística de todos los resultados obtenidos (6 animales/grupo). ***P<0,001 vs saline; # P<0,05 entre los grupos indicados.

La imagen de inmunohistoquímica ha sido elegida por la revista *Toxicol. Appl. Pharmacol.* para figurar en la optada del volumen que incluye dicho artículo.



ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN: Se adjuntará una separata de cada uno de ellos y se remitirá una copia en formato digital a pndinvestigacion@msssi.es para el fondo documental de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.

La convocatoria regula en su artículo décimo, punto 3 que la producción científica derivada del proyecto financiado debe ser comunicada a la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas y en cualquier tipo de publicación a que dé lugar, incluso páginas web, **se hará constar expresamente, de forma visible y preferencial que el proyecto se ha realizado con financiación de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.**

Se han publicado los siguientes artículos directamente relacionados con el Proyecto:

- Ciudad-Roberts A, Duart-Castells L, Camarasa J, Pubill D, Escubedo E. The combination of ethanol with mephedrone increases the signs of neurotoxicity and impairs neurogenesis and learning in adolescent CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015 Dec 30;293:10-20.
- Ciudad-Roberts A, Camarasa J, Ciudad CJ, Pubill D, Escubedo E. Alcohol enhances the psychostimulant and conditioning effects of mephedrone in adolescent mice; postulation of unique roles of D3 receptors and BDNF in place preference acquisition. *Br J Pharmacol* 2015 Oct;172(20):4970-84.

Asimismo, parte de los bienes fungibles adquiridos para el proyecto han podido utilizarse para finalizar o complementar otros trabajos de la línea de investigación de catinonas y derivados anfetamínicos que llevamos a cabo, sin que ello haya ido en detrimento de la consecución de los objetivos del presente. De hecho, en algunos de ellos se acababa de caracterizar la neurotoxicidad inducida por la administración de catinonas sola, paso clave para después poder estudiar y comparar con su combinación con etanol. El segundo de ellos estudia los niveles estriatales de MDPV, como a paso previo para poder solicitar un proyecto de continuidad que, en la última convocatoria, ha sido tristemente denegado. Los artículos publicados han sido:

- Abad S, Camarasa J, Pubill D, Camins A, Escubedo E. Adaptive Plasticity in the Hippocampus of Young Mice Intermittently Exposed to MDMA Could Be the Origin of Memory Deficits. *Mol Neurobiol* 2015 Dec 21.
- Novellas J, Lopez-Arnau R, Carbo ML, Pubill D, Camarasa J, Escubedo E. Concentrations of MDPV in rat striatum correlate with the psychostimulant effect. *J Psychopharmacol* 2015 Nov;29(11):1209-18.
- Lopez-Arnau R, Martinez-Clemente J, Rodrigo T, Pubill D, Camarasa J, Escubedo E. Neuronal changes and oxidative stress in adolescent rats after repeated exposure to mephedrone. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015 Jul 1;286(1):27-35.
- Rubio M, Lopez-Arnau R, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. Serotonin is involved in the psychostimulant and hypothermic effect of 4-methylamphetamine in rats. *Neurosci Lett* 2015 Mar 17;590:68-73.
- Lopez-Arnau R, Martinez-Clemente J, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. Serotonergic impairment and memory deficits in adolescent rats after binge exposure of methylone. *J Psychopharmacol* 2014 Nov;28(11):1053-63.
- Martinez-Clemente J, Lopez-Arnau R, Abad S, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. Dose and time-dependent selective neurotoxicity induced by mephedrone in mice. *PLoS One* 2014;9(6):e99002.



- Lopez-Arnau R, Martínez-Clemente J, Abad S, Pubill D, Camarasa J, Escubedo E. Repeated doses of methylone, a new drug of abuse, induce changes in serotonin and dopamine systems in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 2014 Aug;231(16):3119-29.
- Buenrostro-Jáuregui, M.; Ciudad-Roberts, A.; Moreno, J.; Muñoz-Villegas, P.; López-Arnau, R.; Pubill, D.; Escubedo, E.; Camarasa, J. Changes in CREB and deltaFosB are associated with the behavioural sensitisation induced by MDPV. *J. Psychopharmacol.* 2016 30(7) 707–712.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Comunicación en póster al 35 Congreso de la Sociedad Española de Farmacología (Madrid, del 24 al 26 de septiembre de 2014):

- Ciudad-Roberts, A., Pubill, D., Ciudad, C.J., Escubedo, E., Camarasa, J. Alcohol potentiates the reinforcing effects of mephedrone in adolescent mice. Role of D₃ receptors.

Se redactó un abstract que fue aceptado en el congreso WorldPharma 2014, celebrado en Ciudad del Cabo (Sudáfrica) el mes de julio, y que se adjunta a continuación:

Ethanol enhances the psychostimulant and rewarding properties elicited by mephedrone

Ciudad-Roberts A, Ciudad CJ, Camarasa J, Escubedo E, Pubill D.

Background: Mephedrone (4-methylmethcathinone, MEPH) is an increasingly consumed synthetic stimulant, which is commonly combined with many other drugs, but mainly alcohol. Based on previous studies with MDMA, our aim was to assess whether ethanol could effectively potentiate the rewarding and psychostimulant effects of MEPH, measured as Conditioned Place Preference (CPP) and horizontal locomotor activity. Furthermore, we sought to investigate the major transcriptional modifications in the anterior striatum (comprising the nucleus accumbens) caused by the treatment patterns used for CPP experiments.

Methodology: Male Swiss CD-1 mice were used for all experiments grouped as saline, EtOH, MEPH and EtOH+MEPH. The CPP protocol lasted 10 days. Animals were placed in two different compartments and administered the assigned treatment or saline 4 times on alternate days; sacrifice and brain dissection for microarray analysis took place on day 11. Locomotor activity was expressed as cumulative breaks over 120 minutes and recorded in the presence and absence of 5HT_{2A} and D₂ receptor antagonists ketanserin (1mg/kg) and haloperidol (0,25mg/kg) respectively, given intraperitoneally 15 minutes prior to assigned treatment.

Results: MEPH-induced (10mg/kg) locomotor hyperactivity was enhanced by 40% (P<0.05) by the concomitant administration of ethanol (1g/kg). This is due to an increase in DA levels, as potentiation was totally inhibited by haloperidol, but not ketanserin.

CPP experiments demonstrated that upon comparison of groups treated with the same dose of mephedrone animals increased the time spent in the drug-paired compartment by 70% (P<0.05), when administered 25mg/kg concomitantly with ethanol

Microarray data showed differential expression in a wide range of genes caused by MEPH. We focused on 6: *Arcp5* (neuroplasticity), which was potentiated by ethanol; *Gpx6*, *Nfu1* (neurotoxicity); *Drd3*, *Syt10* and *Gnas* (regulatory processes).

Conclusion: We have demonstrated that ethanol enhances the psychostimulant and rewarding properties elicited by MEPH through dopaminergic mechanisms. Microarray results show that the up-regulation of *Arcp5* (implicated in the formation of new synapses and increased cell communication) and *Drd3* (Dopamine D₃ receptor, tightly related to drug-induced reward) probably play an important role in the acquisition of a positive CPP score and its potentiation by ethanol.

This work was funded by a grant from Plan Nacional sobre Drogas (2012I102).



- Comunicaciones en póster en el 9º Fórum de Neurociencias de la FENS (Federation of European Neuroscience Societies), 5-9 julio, 2014, Milán (Italia):
 - **Repeated administration of mephedrone induces hyperthermia and serotonergic impairment in rat brain.** Martínez-Clemente, J., López-Arnau, R., Pubill, D., Escubedo, E., Camarasa, J.
 - **Neurochemical, histological and behavioral changes after methylone exposure in rats.** López - Arnau, R., Martínez - Clemente, J., Pubill, D., Camarasa, J., Escubedo, E.
- Comunicación en póster en el 16 Congreso de la Sociedad Española de Neurociencias (SENC), celebrado en Granada, 23-25 de septiembre de 2015:
Cocaine-like properties of a new drug of abuse: MDPV. Autores: P. Muñoz-Villegas, M. Buenrostro, J. Moreno, A. Gutierrez, A.M. Ciudad, R. López-Arnau, J. Camarasa, D. Pubill & E. Escubedo.
- Comunicación en póster en el congreso internacional Neuroscience 2015, celebrado en Chicago, Noviembre de 2015:
Alcohol enhances mephedrone-induced signs of neurotoxicity and impaired neurogenesis in adolescent CD-1 mice. Autores: A. Ciudad □ Roberts, L. Duart-Castells, J. Camarasa, E. Escubedo, D. Pubill.

OBJETIVOS

PLANTEADOS: (Transcribir los del proyecto original)

1. Determinar si el alcohol potencia el efecto psicoestimulante producido por la mefedrona.
2. Estudiar si el alcohol potencia el poder adictivo de la mefedrona.
3. Estudiar si el alcohol potencia la neurotoxicidad o los cambios neuroquímicos inducidos por la mefedrona.
4. Investigar si la mefedrona provoca deterioro cognitivo y, en caso afirmativo, determinar si éste es potenciado por el consumo conjunto de alcohol.
5. Estudiar los cambios transcripcionales *in vivo* producidos por dosis repetidas de mefedrona y cómo se afectan por la administración concomitante de alcohol. Asimismo, determinar redes génicas de la interacción entre los genes diferencialmente expresados después del tratamiento con el fin de determinar posibles dianas desconocidas de la mefedrona.

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.- Alcanzado.
Objetivo 2.- Alcanzado.
Objetivo 3.- Alcanzado.
Objetivo 4.- Alcanzado.
Objetivo 5.- Alcanzado.

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

PROYECTADO: En general, se ha ejecutado todo lo proyectado. En la actualidad y debido a los retrasos justificados en la ejecución de los experimentos de microdiálisis, todavía estamos ejecutando algunos experimentos



complementarios para poder generar una nueva publicación, que se notificará oportunamente.

EJECUTADO: Se ha ejecutado todo lo previsto y se ha profundizado en el nuevo objetivo secundario que surgió de los resultados de los microarrays, que es el estudio del papel de los receptores dopaminérgicos D3.

ACTIVIDADES

PROYECTADAS: Se han realizado todas las previstas

EJECUTADAS: Todas las proyectadas.

EN CASO DE FINANCIACIÓN DE ESTANCIA AVALADA POR EL NIDA, INDIQUE:

- **Objetivos alcanzados**
- **Actividades realizadas vinculadas con el proyecto**
- **Duración de la estancia**

Como ya se anunció oportunamente y aprobó por parte del PNsd se realizó un cambio respecto a la planificación inicial de dicha estancia. El investigador del NIDA (Dr. John D. Salamone) que estaba inicialmente dispuesto a acoger al beneficiario de la estancia formativa, se ha quedado sin financiación y los últimos proyectos que ha solicitado le fueron denegados. Como consecuencia, le resultó imposible acoger a nuestro becario. Dada esta incidencia, ajena a nuestra voluntad, establecimos contacto con el Dr. Sergi Ferré, jefe del Integrative Neurobiology Section, National Institute on Drug Abuse Intramural Research Program, que accedió a acoger a Andrés Ciudad para realizar dicha estancia.

La estancia duró desde 1-9-2014 hasta 22-12-2014. Los gastos de mantenimiento del cuarto mes corrieron a cuenta del becario, ya que las dificultades surgidas durante la puesta a punto de la técnica hicieron que tres meses resultaran insuficientes para alcanzar la formación suficiente.

A grandes rasgos, durante esta estancia se ha intentado profundizar en el papel de los receptores dopaminérgicos D3 en los efectos de las drogas psicoestimulantes, aprendiéndose la técnica del Proximity ligation assay y técnicas inmunohistoquímicas que serán de utilidad para el equipo investigador. Asimismo, ha iniciado el aprendizaje de la técnica de microdialisis que, como ya se comunicó, se está poniendo a punto en nuestro laboratorio.

A continuación se exponen con más detalle las actividades realizadas:

Proyecto principal: Detección ex-vivo del heterómero D1-D3 mediante Proximity Ligation Assay

Introducción e hipótesis

En los trabajos realizados hasta el momento como parte de este Proyecto, descubrimos que un tratamiento de condicionamiento con mefedrona provoca una importante subida de la expresión del gen del receptor dopaminérgico D3 (Drd3), junto a una marcada preferencia de lugar. El bloqueo del receptor dopaminérgico D3 (Dr3) durante este tratamiento, así como el bloqueo del receptor del factor de crecimiento BDNF (TrkB, el cual participa en los cambios en Drd3) inhibieron los efectos de recompensa de la mefedrona en la prueba de CPP, así como la regulación al alza de Drd3. Esto se suma a múltiples evidencias que se han publicado en la última década sobre la importancia de los receptores dopaminérgicos D3 (D3R) postulándose, pues, que podrían ser potenciales dianas terapéuticas para el tratamiento de la adicción.

Marcellino et al. (2008) descubrieron que los efectos estimulantes de la dopamina mediados por D1 pueden ser potenciados a través de la activación concomitante de D3, la cual no tiene efecto



por si sola. Los trabajos de Marcellino et al. (2008) y Fiorentini (2008) sugieren que este efecto es producido por la heteromerización de ambos receptores.

El grupo del Dr. Sergi Ferre, del NIDA intramural research program (Baltimore, MD) caracterizó, *in vitro*, la naturaleza molecular de este heterómero y de sus interacciones a nivel de las vías de señalización del AMPc y del p-ERK, así como su potencial importancia en adicción (Guitart et al., 2014). Acordamos, pues, colaborar con ellos para determinar si:

- a) Este heterómero también está presente en el tejido (*in vivo*)
- b) En caso afirmativo, si la administración de psicoestimulantes (mefedrona y cocaína) provoca una regulación al alza del heterómero.

Para responder a estas cuestiones, se recurrió a la técnica del *Proximity Ligation Assay* (PLA), mediante la cual se pueden identificar proteínas que están a una distancia de menos de 16 nm. Aunque sea posible que, debido a distribución al azar, D1 y D3 estén a menos de esa distancia sin heteromerizar, es correcto asumir que la mayor parte de la señal obtenida a través de esta técnica es debida a la existencia de heterómeros.

Método:

La PLA se basa en la detección inmunológica de las proteínas de interés. Hay dos posibles variantes de PLA: la PLA directa y la indirecta. En la indirecta, las proteínas son detectadas mediante anticuerpos primarios, que a su vez son detectados por otros secundarios que están unidos a una cadena de nucleótidos. El anticuerpo secundario correspondiente a cada uno de los primarios tiene un oligonucleótido con una secuencia distinta que, a su vez, son complementarias, de tal manera que son capaces de hibridar, formando un complejo circular de ADN que puede ser amplificado mediante una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que utiliza nucleótidos acoplados a un fluorocromo, lo cual genera un marcaje de fluorescencia amplificado que puede visualizarse mediante un microscopio de fluorescencia o confocal. La PLA directa se basa en el mismo principio pero se diferencia por el uso de anticuerpos primarios que ya están unidos a los nucleótidos complementarios. Esta variante es mucho más cara, pero da menos falsos positivos.

Se utilizaron ratones C57-BL6 de cepa salvaje y knockouts (KO) de receptores D1 y D3 (como control negativo), que fueron anestesiados, perfundidos con PBS y paraformaldehído (PFA). Los cerebros fueron post-fijados y se realizaron cortes coronales de 40 micras de grosor; estos cortes fueron colocados inmediatamente en una solución crioprotectora y almacenados a -20°C.

Para poder realizar la técnica de PLA es necesario disponer de buenos anticuerpos contra las proteínas de interés. Por este motivo, como paso previo a los experimentos programados, probamos anticuerpos contra D1R y D3R, para asegurarnos de su funcionalidad, visualizándolos mediante anticuerpos secundarios fluorescentes mediante técnica de inmunohistoquímica. Se realizaron múltiples pruebas y variaciones de protocolo para poner a punto condiciones óptimas mediante las cuales los anticuerpos anti-D3R produjeran el marcaje adecuado. Solamente se obtuvo señal, aunque muy débil, en ensayos *in-vitro* con células transfectadas con el receptor. También se obtuvo señal en el ensayo con el anticuerpo anti-D3 de Millipore, exclusivamente en muestras de rata, pero su distribución era marcadamente distinta a la descrita para los D3R en la literatura. La señal también estaba restringida a células granulares. Debido a estas circunstancias y al hecho de que la presencia de la señal no era consistente en todos los animales perfundidos y cortes realizados, concluimos que era debida a uniones inespecíficas del anticuerpo.

Debido a la limitación de tiempo, se decidió proceder a la puesta a punto de la técnica de PLA con el anticuerpo validado contra D1R. Al formar parte del plan de investigación del proyecto vigente del laboratorio de Ferré y colaboradores, se prosiguió con la identificación del dímero D1R-D1R *in-situ* en cortes coronales de tejido cerebral. También se trató de realizar la PLA para la identificación del dímero D3R-D3R con los anticuerpos testados sin éxito mediante



inmunohistoquímica. La lógica detrás de esta idea es que la PLA es una técnica de amplificación de señal, mediante la cual es posible detectar pares de proteínas individuales y, por tanto, más sensible que la inmunohistoquímica. Por este motivo, aunque la presencia de D3R y la funcionalidad de su anticuerpo fueran bajas, se podría obtener una señal clara.

El correcto funcionamiento de la técnica de PLA fue validado con el anticuerpo contra D1R en ratones de cepa salvaje y KO. Como era de esperar, también se obtuvo señal con el anticuerpo para D3 de Millipore (el único de los dos anti-D3R que fue testado), aunque ésta no seguía ninguna pauta en cuanto a distribución en el cerebro. Además, también se obtuvo señal en los animales KO para D3R, lo cual confirmó que el anticuerpo es inespecífico, como se había postulado a raíz de los resultados de las inmunohistoquímicas.

Proyecto secundario: Comparación de la presencia de dopamina y glutamato en el núcleo accumbens después de la estimulación eléctrica de la corteza prefrontal medial o estimulación mediante optogenética de las proyecciones de la corteza prefrontal medial en el núcleo accumbens. Efectos de antagonistas de los receptores de adenosina A_{2A} sobre este fenómeno.

Como parte del aprendizaje de la técnica de microdiálisis, y con el fin de aplicarla en nuestro laboratorio en los experimentos marcados en el proyecto vigente, el becario participó en otro proyecto en el cual se está trabajando en el laboratorio del Dr. Ferré y colaboradores.

Introducción e hipótesis:

Esta parte del proyecto se centraba en elucidar la vía por la cual la estimulación eléctrica en la corteza prefrontal medial (mPFCx) es capaz de causar una liberación de dopamina en el núcleo accumbens (NAcc). Se postuló que la liberación de dopamina podría ser debida a la suma de un efecto directo (mediante las proyecciones de las neuronas corticales al estriado) y un efecto indirecto (proyecciones de la corteza al área tegmental ventral o VTA, que a su vez contiene neuronas que proyectan al NAcc). Para diferenciar entre estos dos efectos, se realizaron experimentos de microdiálisis, mediante los cuales se recogió muestra en el NAcc siguiendo dos diseños experimentales. La microdiálisis comporta la correcta colocación de la rata anestesiada sobre un potro de estereotaxia, su intervención quirúrgica para la implantación del electrodo y la cánula en la zona deseada y, después de la intervención, las estimulaciones, recogida de muestras y posterior análisis de los dializados.

Por un lado se estimuló eléctricamente el mPFCx mediante un electrodo; este es el método clásico para excitar neuronas y provocar liberación de neurotransmisores en las áreas donde proyectan. Paralelamente se realizaron experimentos de estimulación optogenética de las neuronas en el NAcc provenientes del mPFCx. La base de esta técnica es la infección de las neuronas del mPFCx con un virus que expresa y transfecta un gen que codifica para un canal iónico de rodopsina sensible a la luz (channelrhodopsin) de tal manera que cuando se excita el canal con una luz azul, éste se abre dejando entrar sodio que despolariza la neurona e induce su activación. Este virus se esparce por la neurona, induciendo la expresión de los canales de rodopsina, después de tres meses, a lo largo de las proyecciones de la misma. Después de este periodo de tiempo, se excita el NAcc mediante fototransducción a través de una fibra óptica implantada en éste. De este modo solamente se ven afectadas las neuronas que expresan channelrhodopsin (por ejemplo, las que provienen del mPFCx). Ello permite comparar, mediante microdiálisis, la cantidad de dopamina liberada por neuronas directamente provinientes del mPFCx respecto a la cantidad total de dopamina liberada después de la estimulación del mPFCx.

Como complemento a los experimentos de microdiálisis, se realizaron inmunohistoquímicas para detectar la proteína ERK fosforilada, como medida de estimulación neuronal en secciones



coronales de ambos grupos (animales estimulados eléctricamente y por optogenética). El objetivo de este experimento fue determinar si la estimulación eléctrica del mPFCx es capaz de excitar las neuronas del mPFCx, la VTA y el NAcc simultáneamente, lo cual encajaría con la hipótesis de la existencia de una vía indirecta de liberación de dopamina en el NAcc, mediada por la VTA. Este efecto debería de no estar presente en los animales estimulados mediante optogenética.

Resultados:

Al tratarse de un proyecto en el cual nuestro grupo no participa explícitamente, los resultados son estrictamente confidenciales hasta ser publicados. Este proyecto permitió que el becario aprendiera las bases de microdiálisis, estimulación eléctrica y estimulación por optogenética.

Publicación:

Como consecuencia de esta colaboración, se ha derivado el siguiente artículo en revista:

Quiroz, C., Orrú, M., Rea, W., Ciudad-Roberts, A., Yepes, G., Britt, J.P., Ferré, S. Local Control of Extracellular Dopamine Levels in the Medial Nucleus Accumbens by a Glutamatergic Projection from the Infralimbic Cortex. J. Neurosci. 2016 36(3):851-859.

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

Los resultados obtenidos en ratones demuestran claramente que la combinación con etanol **incrementa tanto los efectos conductuales** (psicoestimulación, recompensa/condicionamiento), **como perjudiciales** (daño dopaminérgico, serotoninérgico, estrés oxidativo, disminución de neurogénesis y pérdida de memoria) inducidas por la mefedrona en ratones adolescentes. Lo primero implica un incremento en el potencial de abuso y adicción, mientras que lo segundo conlleva un incremento en la morbilidad o sintomatologías psiquiátricas que pudieran asociarse.

Ello permite **establecer una alerta respecto a dicha combinación**, la cual es muy frecuente en jóvenes durante sus sesiones de fiesta y diversión. Este proyecto sienta las bases para **advertir a la población de los posibles riesgos** y da motivos justificados para su estudio traslacional en humanos. Asimismo, dichos efectos deberían también ser estudiados en individuos adultos, en los cuales la maduración del cerebro ha finalizado.

**TRANSFERENCIA Y DIFUSIÓN DE RESULTADOS A LA CIUDADANÍA: ACCIONES LLEVADAS A CABO
(en caso de memoria de segunda anualidad o de memoria final)**

Se han realizado 6 comunicaciones a congresos que han permitido transmitir, de forma directa, nuestros estudios a numerosos investigadores de todo el mundo.

Se ha efectuado, en fecha 13 de octubre, una Conferencia de Investigación en la Facultad de Farmacia de Barcelona, destinada a profesores y alumnos, con el título: Neuropsicofarmacología de las nuevas drogas psicoestimulantes y su asociación con alcohol. Conferenciante: David Pubill.

PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL PROYECTO (solo en caso de memoria final)

Ninguno

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

Ninguno

**SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS
(Organismo, convocatoria y cantidad)**

Ninguna

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

Los resultados y publicaciones obtenidas de este proyecto continúan la línea de investigación y productividad científica que nuestro grupo ha estado llevando a término durante los últimos años. Cabe decir que hemos sido pioneros y principales en el estudio de las catinonas en nuestro país. Dichos estudios también han arrojado resultados preliminares que sustentan y justifican la continuidad de dicha investigación con nuevas catinonas como la MDPV. Desafortunadamente, la no concesión del proyecto solicitado en la convocatoria 2015 por E. Escubedo provocará que



dicho trabajo quede interrumpido. Por lo demás, seguimos creyendo en la idoneidad del PNsd para el fomento y financiación de la investigación sobre drogas en nuestro país.

En esta fecha se remite también por correo electrónico a la dirección pndinvestigacion@msssi.es la presente memoria.

En Barcelona a 27 de enero de 2016

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Signed,

David Pubill Sánchez