

## Memoria Final del Proyecto N° Expediente: 2012/071

**Título:** Caracterización de la función de DREAM en la neurotoxicidad de la metanfetamina y otros psicoestimulantes

**IP del proyecto:** Rosario Moratalla

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 [pninvestigacion@msssi.es](mailto:pninvestigacion@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.

1. Ares-Santos S, Granado N, Oliva I, O'Shea E, Martin ED, Colado MI, **Moratalla R**. Dopamine D(1) receptor deletion strongly reduces neurotoxic effects of methamphetamine. **Neurobiol Dis**. 2012; 45:810-820 **IF=5.4**
2. Madronal N, Gruart A, Valverde O, Espadas I, **Moratalla R**, Delgado-Garcia JM. Involvement of cannabinoid CB1 receptor in associative learning and in hippocampal CA3-CA1 synaptic plasticity. **Cerebral Cortex** 2012; 22:550-556 **IF=6.84**
3. Espadas I, Darmopil S, Vergaño-Vera E, Ortiz O, Oliva I, Vicario-Abejón C, Martín ED, **Moratalla R**. L-DOPA-induced increase in TH-immunoreactive striatal neurons in parkinsonian mice: Insights into regulation and function. **Neurobiol Dis**. 2012; 48:271-81 **IF=5.4**
4. Busceti CL, Buccì D, Molinaro G, Di Pietro P, Zangrandi L, Gradini R, **Moratalla R**, Battaglia G, Bruno V, Nicoletti F, Fornai F. Lack or inhibition of dopaminergic stimulation induces a development increase of striatal tyrosine hydroxylase-positive interneurons. **PLoS One** 2012;7:e44025 **IF=4.09**
5. López-Jiménez A, Walter NA, Giné E, Santos A, Echeverry-Alzate V, Bühler KM, Olmos P, Giezendanner S, **Moratalla R**, Montoliu L, Buck KJ, López-Moreno JA. A spontaneous deletion of  $\alpha$ -synuclein is associated with an increase in CB1 mRNA transcript and receptor expression in the hippocampus and amygdala: Effects on alcohol consumption. **Synapse**. 2013; 67:280-9. **IF=2.95**
6. Ares-Santos S, Granado N, **Moratalla R**. The role of dopamine receptors in the neurotoxicity of methamphetamine. **J Intern Med**. 2013; 273:437-53. **IF=5.48**
7. Granado N, Ares-Santos S, **Moratalla R**. Methamphetamine and Parkinson's disease. **Parkinsons Dis**. 2013;2013:308052.
8. Peraile I, Granado N, Torres E, Gutiérrez-López MD, **Moratalla R**, Colado MI, O'Shea E. Cocaine potentiates MDMA-induced oxidative stress but not dopaminergic neurotoxicity in mice: implications for the pathogenesis of free radical-induced neurodegenerative disorders. **Psychopharmacology** (Berl). 2013. 230:125-35 **IF=4,08**
9. Suárez LM, Solís O, Caramés JM, Taravini IR, Solís JM, Murer MG, **Moratalla R**. L-DOPA treatment selectively restores spine density in D2R-expressing projection neurons in dyskinetic mice. **Biological Psychiatry**, **Biol Psychiatry**. Biol Psychiatry. 2014 75:711-22. **IF=8.28**
10. Urrutia A, Granado N, Gutierrez-Lopez MD, **Moratalla R**, O'Shea E, Colado MI. The JNK inhibitor, SP600125, potentiates the glial response and cell death induced by methamphetamine in the mouse striatum. **Int J Neuropsychopharmacol**. 2014. 17:235-46. **IF=5.64**
11. Gonzalez-Aparicio R, **Moratalla R**. Oleylethanolamide reduces L-Dopa-induced dyskinesias via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's Disease. 2014. **Neurol Dis**, 62:416-25. **IF=5.63**
12. Ares-Santos S, Granado N, Espadas I, Martínez-Murillo R, **Moratalla R**. Methamphetamine Causes Degeneration of Dopamine Cell Bodies and Terminals of the Nigrostriatal Pathway Evidenced by Silver Staining. **Neuropsychopharmacology**. 2014. 39:1066-80. **IF=8.67**

13. Granado N, Ares-Santos S, **Moratalla R**. D1 but not D4 Dopamine Receptors are Critical for MDMA-Induced Neurotoxicity in Mice. **Neurotox Res**. 2014. 25(1):100-9. **IF=3.15**
14. Shen HY, Canas PM, Garcia-Sanz P, Lan JQ, Boison D, **Moratalla R**, Cunha RA, Chen JF. Adenosine A2A Receptors in Striatal Glutamatergic Terminals and GABAergic Neurons Oppositely Modulate Psychostimulant Action and DARPP-32 Phosphorylation. **PLoS One**. 2013 Nov 28;8(11):e80902 **IF=4.09**
15. Heumann R, **Moratalla R**, Herrero MT, Chakrabarty K, Drucker-Colin R, Garcia-Montes JR, Simola N, Morelli M. Dyskinesia in Parkinson's disease: mechanisms and current non-pharmacological interventions. **J Neurochem**. 2014 130:472-89. **IF: 4.24**
16. Ruiz De Diego I, Mellstrom B, Liu T, Naranjo JR, **Moratalla R**. Activation of DREAM, a calcium-binding protein, reduces L-DOPA-induced dyskinesias in mice. **Biological Psychiatry**. 2015; 77:95-105. **IF=9.28**
17. Solís O, Espadas I, Del-Bel EA, **Moratalla R**. Nitric oxide synthase inhibition decreases L-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in Pitx3 (-/-) aphakia mice. **Neurobiol Dis**. 2015. 73:49-59. **IF: 5.28**
18. Carmena A, Granado N, Ares-Santos S, Alberquilla S, Tizabi Y, **Moratalla R**. Methamphetamine-induced toxicity in indusium griseum of mice is associated with astro- and microgliosis. **Neurotox Res**. 2015; 27:209-16. **IF: 3.54**
19. Castro-Hernández J, Afonso-Oramas D, Cruz-Muros I, Salas-Hernández J, Barroso-Chinea P, **Moratalla R**, Millan MJ, González-Hernández T. Prolonged treatment with pramipexole promotes physical interaction of striatal dopamine D3 autoreceptors with dopamine transporters to reduce dopamine uptake. **Neurobiol Dis**. 2015; 74:325-35. **IF: 5.078**
20. Ruiz-DeDiego I, Naranjo JR, Hervé D, **Moratalla R**. Dopaminergic regulation of olfactory type G-protein  $\alpha$  subunit expression in the striatum. **Mov Disord**. 2015; 30:1039-49. **IF: 5.68**
21. **Moratalla R**, Khairnar A, Simola N, Granado N, García-Montes JR, Porceddu PF, Tizabi Y, Costa G, and Morelli M. Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: Main mechanisms. **Progress in Neurobiology**. In revision. **IF:9.99**
22. Solís O, Garcia-Montes JR, González-Granillo A, Xu M, **Moratalla R**. Dopamine D3 Receptor Modulates L-DOPA-Induced Dyskinesia by Targeting D1 Receptor-Mediated Striatal Signaling. **Cereb Cortex**. 2015 Oct 18. pii: bhv231

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

**Objetivo 1. Estudiar el papel de los receptores dopaminérgicos en la muerte de las neuronas estriatales inducida por metanfetamina.**

**Objetivo 2. Estudiar la neurotoxicidad inducida por metanfetamina en hipocampo y corteza: Papel de los receptores dopaminérgicos**

**Objetivo 3. Estudio de la implicación de la vía de transcripción calcio- $\alpha$ CREM-DREAM en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina.**

**Objetivo 4. Implicación de los astrocitos (imagen de calcio) y de la somatostatina en la pérdida de axones dopaminérgicos inducida por metanfetamina.**

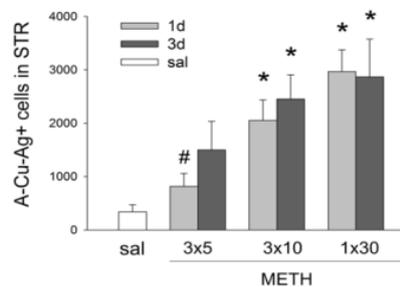
**EJECUTADO:** Todos los objetivos han sido ejecutados en su totalidad. Las 22 publicaciones a que han dado lugar se mencionan más arriba. Para llevar a cabo los objetivos se han realizado técnicas como la tinción amino-cúprico argéntica, inmunohistoquímica para TH, DAT, GFAP y Mac-1, cuantificación de TH y DAT mediante el programa AIS e ImageJ, así como cuantificación estereológica mediante el programa stereo investigator e identificación de células apoptóticas, análisis de PCR-cuantitativa, así como la evaluación del posible efecto neuroprotector del fragmento Hc de la toxina tetánica, que es efectiva en modelos animales del Parkinson..

**Objetivo 1. Estudiar el papel de los receptores dopaminérgicos en la muerte de las neuronas estriatales inducida por metanfetamina.**

**Estudiar el papel de los receptores D1 y D2 en la muerte de las neuronas estriatales**

Para la realización de este objetivo, hemos puesto a punto en el laboratorio la técnica de plata amino-cúprica argéntica (técnica de Olmos, de Olmos y cols. 1994). Esta técnica es esencial a la hora de identificar neuronas en degeneración irreversible. Con la tinción de Plata hemos podido observar que la metanfetamina en ratones salvajes produce una reducción muy leve (1% como máximo (0,7%) de las neuronas estriatales, y que el daño es dosis-dependiente Fig 1.

Utilizando ratones KO del receptor D1 o del receptor D2, observamos que la inactivación de estos receptores no produjo ningún cambio significativo en el porcentaje de neuronas estriatales de proyección o interneuronas, que mueren tras metanfetamina, pese a la reducción de la pérdida de terminales dopaminérgicos, como demostramos (Ares-Santos y cols, 2012, 2013, 2014), dentro del marco del proyecto. Además hemos conseguido establecer de manera contundente, que la metanfetamina produce la degeneración de neuronas dopaminérgicas de la SN (Ares-Santos y cols, 2014).

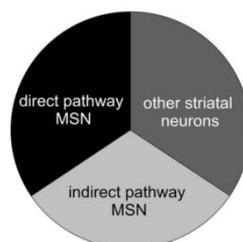


**Figura 1.** Cuantificación mediante estereología de las células teñidas con plata en el estriado de ratones tratados con diferentes dosis de metanfetamina. Tomado de Ares-Santos y cols, 2014, *Neuropsychopharmacology*, 2014. 39:1066-80.

**Identificar el fenotipo molecular de las neuronas estriatales vulnerables a la metanfetamina.**

Dado que el tratamiento de 1x30 fue el que más degeneración de neuronas estriatales produjo (aunque no hubo diferencias significativas entre los regímenes de 3x10 y 1x30), elegimos este protocolo para el estudio de identificación de la vulnerabilidad de las subpoblaciones estriatales. Para esto hemos utilizado ratones transgénicos BAC que tienen marcadas las neuronas D1 con rojo tomate (D1-Tmt) y las D2 con GFP tratándolos con metanfetamina 1x30. Se realizó la plata en combinación con inmunohistoquímica para Tmt o para GFP respectivamente. La cuantificación de las neuronas degenerativas se llevó a cabo mediante estereología, contando el número de neuronas Tmt/plata, GFP plata o sólo positivas para plata en rodajas de estriado de estos ratones, sacrificados 1 día después del tratamiento.

Observamos, que de todas las células teñidas en degeneración, un 34% eran neuronas de proyección de la vía directa (D1-Tmt), un 31% eran neuronas de proyección de la vía indirecta (D2-GFP), y el restante 35% no eran ninguno de estos dos tipos neuronales (Figura 2), por lo que se trataría probablemente de interneuronas, que pese a representar un menor porcentaje en el número de neuronas que existen en el estriado, serían más vulnerables a la neurotoxicidad de la metanfetamina (Ares-Santos y cols, 2014).

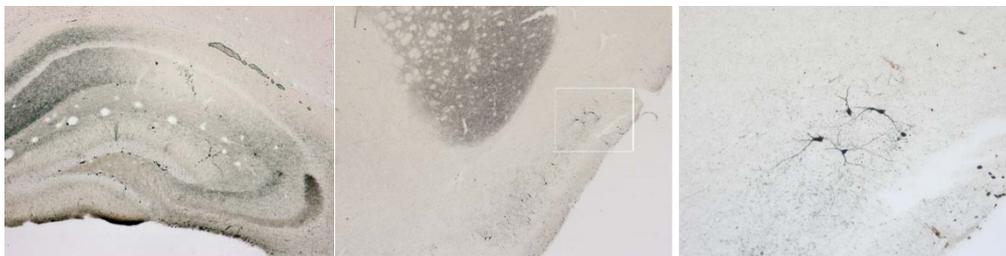


**Figura 2. Diferente vulnerabilidad de las neuronas estriatales del estriado frente a metanfetamina.** Alrededor del 34% son neuronas de la vía directa (D1-Tmt), 31% de la vía indirecta (D2-GFP), y 35% son interneuronas. Tomado de Ares-Santos y cols, 2014, *Neuropsychopharmacology*, 2014. 39:1066-80

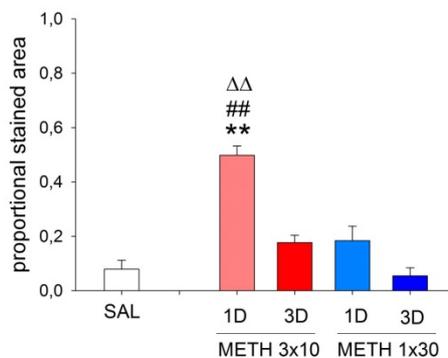
**Objetivo 2. Estudiar la neurotoxicidad inducida por metanfetamina en hipocampo y corteza**

La Meth produce degeneración de terminales y neuronas en diferentes zonas de la corteza, como corteza piriforme (figura 3), prefrontal o entorrinal, y en áreas relacionadas con la amígdala. En estas áreas se observa marcaje de plata y neuronas marcadas pero no parece observarse diferencias entre las diferentes dosis administradas de metanfetamina (3x10 mg/kg o 1x30 mg/kg). También observamos marcaje de plata en el tubérculo olfativo, donde se observa un mayor marcaje de plata con dosis repetidas frente a la inyección de una única dosis de metanfetamina, además de verificarse que hay una mayor señal de plata 1 día después de la administración (figura 4).

También hemos demostrado que la metanfetamina produce neurotoxicidad en *indusium griseum* y en el hipocampo en las regiones del giro dentado CA1 y CA3 de ratón. Además, hemos demostrado que esta neurotoxicidad va acompañada de procesos de inflamación con una activación de los astrocitos y la microglia. Estos datos vienen recogidos en Carmena y cols, (2015).



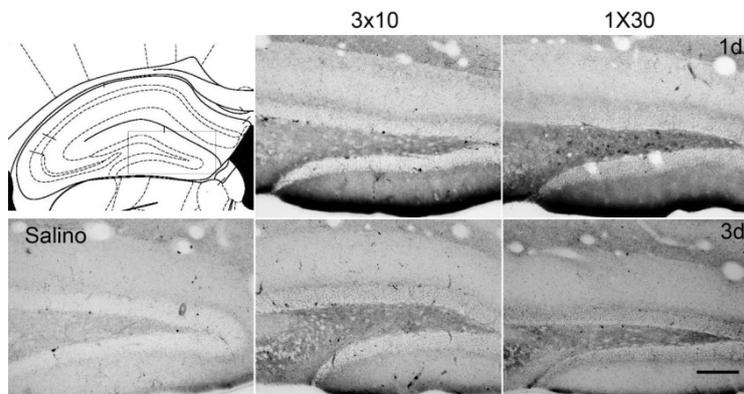
**Figura 3 Estudio de la tinción de plata tras la administración de metanfetamina en varias zonas del cerebro.** La metanfetamina provoca marcaje de plata en el hipocampo y la corteza piriforme.



**Figura 4. Cuantificación del área marcada por plata en el tubérculo olfativo tras la administración de metanfetamina.** La metanfetamina produce en el tubérculo olfativo un aumento de degeneración, observado por un aumento del marcaje de plata, que es más evidente 1 día (1D) después de la dosis de 3x10 mg/kg de metanfetamina que con una dosis de 30mg/kg.

Una de las regiones analizadas en este estudio es la **formación hipocámpica**. Esta región cerebral se encarga fundamentalmente de la memoria, y su deterioro conduce a un déficit cognitivo importante. Puesto que los consumidores de metanfetamina presentan daños no sólo físicos, sino también psicológicos y un deterioro cognitivo severo tras largos años de consumo, tiene sentido estudiar a nivel celular lo que ocurre después de su administración. Se han estudiado las distintas regiones hipocámpicas con el objetivo de analizar si alguna de ellas es más susceptible al daño provocado por la metanfetamina. Se han analizado el giro dentado (DG) y las regiones CA1 y CA3. En el DG se ha detectado degeneración de neuronas y terminales sinápticos en la zona ocupada por las neuronas granulares (Figura 5). Este marcaje con plata se ha observado en ambos tratamientos, de modo que al contrario de lo que ocurría en estriado, no parecen existir diferencias entre los animales tratados con una dosis única y los que recibieron dosis múltiples. **En las regiones CA1 y CA3** se han encontrado algunos cuerpos neuronales marcados con plata, pero son muy poco numerosas y no aparecen en todos los

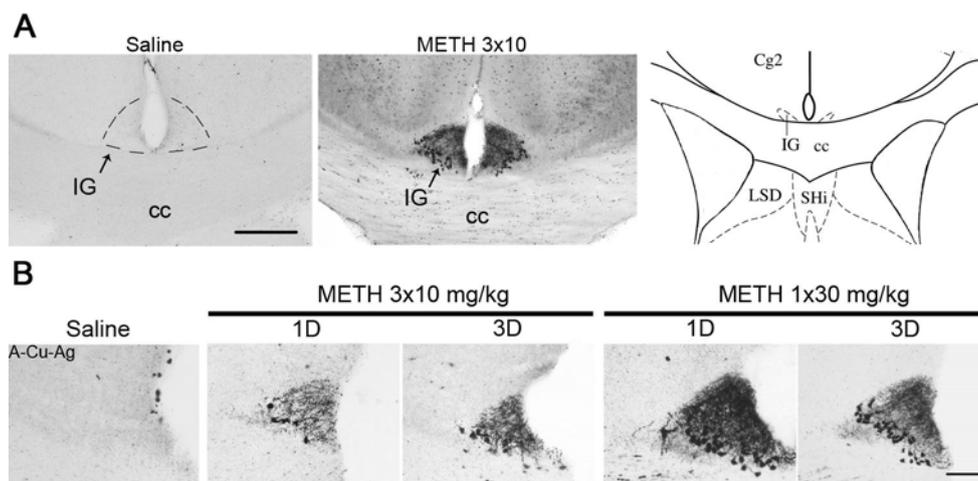
animales, sin embargo, sí se han detectado terminales sinápticos dañados en todos los ratones tratados. Aunque la degeneración del DG y de CA1 y CA3 puede considerarse menor que la estriatal, puede ser igual de importante por las repercusiones que puede tener sobre las funciones cognitivas, como el déficit de atención, memoria o aprendizaje.



**Figura 5. La metanfetamina provoca degeneración en el giro dentado del hipocampo de los ratones tratados con la droga.** Fotografías a gran aumento (20x) de giro dentado de ratones tratados con salino o metanfetamina (dosis de 3x10 mg/kg y de 1x30 mg/kg sacrificados un día y tres días después de la administración). Se muestran secciones teñidas con la técnica de plata (A-Cu-Ag), específica para marcar degeneración. Tomado del trabajo fin de Master de Ana Carmena

Otra área cerebral estudiada es el *indusium griseum*, relacionada con el hipocampo. El tratamiento agudo produce una degeneración de las neuronas del IG que fue similar un día y tres días después de la administración. Sin embargo, en el protocolo de dosis múltiples la degeneración es mayor a los tres días de la administración (Figura 6). La degeneración va acompañada de un aumento de gliosis, aunque los terminales dopaminérgicos no se afectan (Carmena y cols, 2015).

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio confirman la existencia de degeneración en diversas áreas cerebrales incluyendo no sólo al estriado, sino también el hipocampo y la formación hipocámpica de *Indusium Griseum*, así como diversas zonas de la corteza y la amígdala, regiones cerebrales claramente relacionadas con el sistema motor y funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria, lo que podría explicar algunos de los efectos que se observan en los humanos consumidores. Sin embargo, ninguno de los receptores dopaminérgicos parece estar implicado en esta degeneración ya que la inactivación de los receptores no modificó la señal de plata.

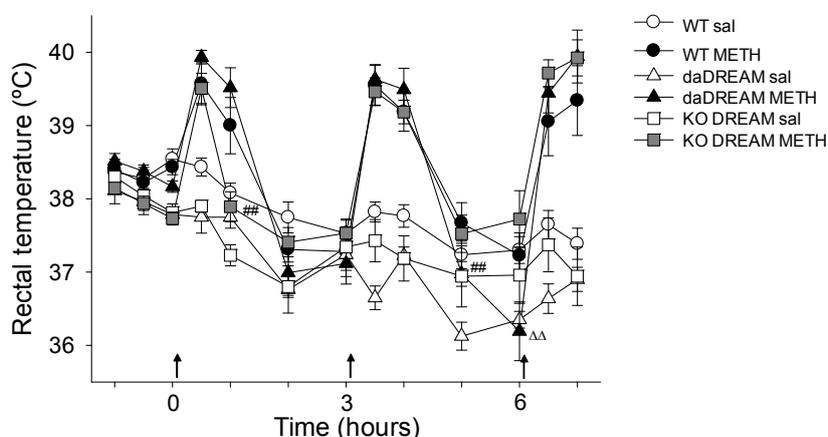


**Figura 6. La metanfetamina produce degeneración en el *indusium griseum*.** Fotografías a gran aumento (20x) de *Indusium Griseum* de ratones tratados con salino o metanfetamina (dosis de 3x10 mg/kg y de 1x30 mg/kg). Se muestran secciones teñidas con la técnica de plata (A-Cu-Ag). Modificado de Carmena y cols., Neurotox Res. 2015; 27:209-16.

**Objetivo 3. Estudio de la implicación de la vía de transcripción calcio- $\alpha$ CREM-DREAM en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina.**

La unión del calcio a DREAM determina un cambio conformacional de la proteína DREAM que la hace incapaz de unirse al sitio DRE y por lo tanto deja de reprimir la transcripción de sus genes diana. Para estudiar el papel de la vía de transcripción calcio- $\alpha$ CREM-DREAM en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina, hemos empleado ratones dominantes activos de DREAM (daDREAM). Estos ratones tienen una forma activa de DREAM que hace que DREAM se mantenga siempre unido al sitio DRE, inhibiendo de esta forma la transcripción génica. El papel de  $\alpha$ CREM en la neurotoxicidad inducida por metanfetamina, lo hemos estudiado de manera indirecta, utilizando los ratones KO de DREAM.

En los ratones daDREAM la metanfetamina produjo un aumento de la temperatura corporal similar al de los ratones WT (Figura 7) y se correlaciona con mayor daño. Mientras que en el caso de los ratones KO DREAM tratados con metanfetamina se produce un aumento de la temperatura corporal similar al observado en los ratones WT (Figura 7), y el daño dopaminérgico producido también es similar,

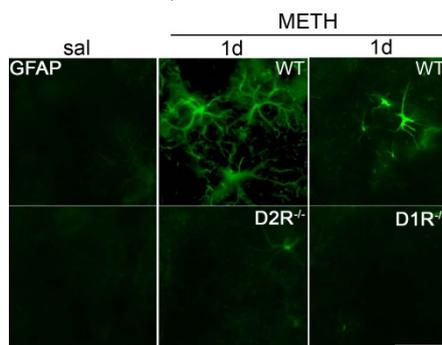


**Figura 7. Temperatura corporal de los ratones daDREAM y KO DREAM tras la administración de 3 inyecciones (marcadas con las flechas) de 5mg/kg de metanfetamina.**

**Objetivo 4. Implicación de los astrocitos (imagen de calcio) y de la somatostatina en la pérdida de axones dopaminérgicos inducida por metanfetamina.**

**Determinar la activación de los astrocitos por metanfetamina y el papel de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en esta activación.**

La metanfetamina aumenta la activación de los astrocitos en las áreas más afectadas por la metanfetamina como el estriado, como demuestra la expresión de la proteína marcadora ácido fibrilar glial (GFAP) que alcanza niveles máximos entre 3 y 7 días después de metanfetamina (O'Callaghan y Miller, 1994; Granado y cols. 2011). Se utilizaron KOD1 (D1R<sup>-/-</sup>) y KOD2 (D2R<sup>-/-</sup>). La inactivación de estos receptores redujo significativamente la activación glial que produce la metanfetamina (Figura 8), lo que pone de manifiesto que estos receptores están implicados en los procesos de degeneración inducidos por metanfetamina (Ares-Santos y cols, 2012, 2013).



**Figura 8.** Papel de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en la activación astrogliar tras metanfetamina. El tratamiento con metanfetamina produce activación de astrocitos reactiva, pero esto no ocurre en el caso de los ratones KOD1 (D1R<sup>-/-</sup>) y KOD2 (D2R<sup>-/-</sup>).

**Determinar si la inactivación de la somatostatina, protege frente a la neuroinflamación inducida por metanfetamina. Realizado en colaboración con el Dr Cadet del NIDA**

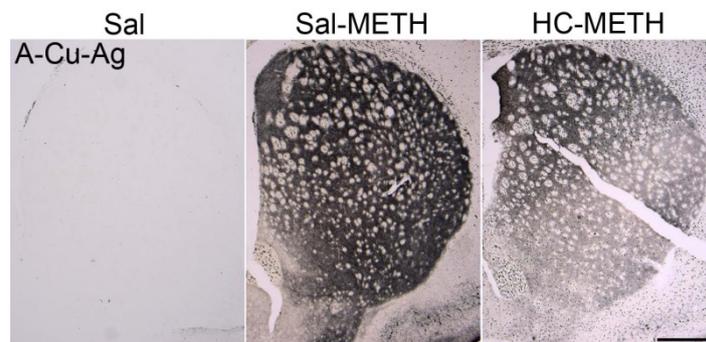
Las partículas lentivirales para silenciar la somatostatina producidas en nuestro laboratorio mediante vectores lentivirales de silenciamiento, redujeron la expresión de somatostatina, aunque no se redujo la expresión de NOS. Por otra parte, el silenciamiento de la somatostatina tampoco produjo una protección significativa frente a la metanfetamina, ya que no modificó la reducción de los niveles de TH estriatales tras la metanfetamina. Debido a la ausencia de efecto de la silenciación de la somatostatina, se decidió junto con el Dr. Cadet, cambiar de estrategia y llevar a cabo el estudio del papel de la toxina tetánica frente a la neurotoxicidad de la metanfetamina, utilizando el fragmento C-terminal de la toxina tetánica (Hc-TeTx). Es un fragmento no tóxico, que protege las neuronas dopaminérgicas en modelos animales de la Enfermedad de Parkinson (EP), aunque su mecanismo de acción no se ha descrito.

En este estudio pudimos comprobar que la administración del fragmento Hc-TeTx tanto administrado antes como después de la metanfetamina ofrece una protección significativa de la pérdida de terminales TH inducida por metanfetamina en el estriado, Figura 9.



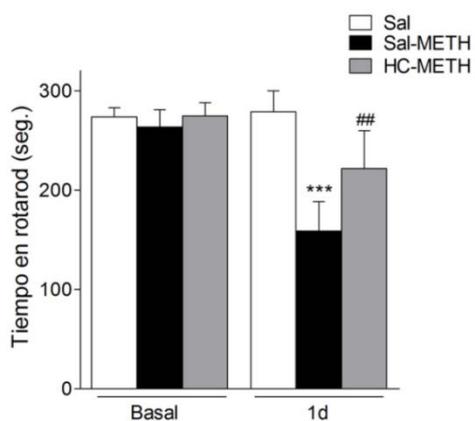
**Figura 9.** La pre-administración del fragmento Hc-TeTx atenuó la disminución de la expresión de TH inducida por METH en el estriado. Tomado del trabajo Fin de Grado de Leticia Perrote

Estos resultados se validaron con la técnica de la tinción de plata que marca selectivamente degeneración irreversible, como se ha indicado en otros informes. Observamos que el fragmento administrado antes y después de la metanfetamina reduce la señal de plata inducida por metanfetamina Fig 10.



**Figura 10.** La pre-administración del fragmento Hc-TeTx atenúa el aumento en la tinción de plata (A-Cu-Ag) inducida por METH en el estriado de ratón. Tomado del trabajo Fin de Grado de Leticia Perrote

Lo que indica una menor degeneración del sistema dopaminérgico que se reflejó también en la reducción de la disminución motora inducida por la pérdida de terminales dopaminérgicos en el estriado Fig 11.



**Figura 11:** El fragmento Hc-TeTx previene frente al daño en la conducta motora inducido por METH. Tomado del trabajo Fin de Grado de Leticia Perrote y de Mendieta et al, 2016, *International Journal of Neuropsychopharmacology*.