



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

FINAL

Número Expediente: 2008I003

Investigador Principal: David Pubill Sánchez

Otros Investigadores: Jorge Camarasa García, Elena Escubedo Rafa y Sara Garcia Ratés.

Título Proyecto o subproyecto: Los receptores nicotínicos: una nueva diana farmacológica para el tratamiento de la comorbilidad neuropsiquiátrica por éxtasis.

Título Proyecto coordinado 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

Comunidad Autónoma: Cataluña

Duración: 3 años

Fecha de inicio: Noviembre 2008

Fecha de finalización: Diciembre 2011

Año Convocatoria: 2008

Área Temática: Farmacología del éxtasis. Comorbilidad neuropsiquiátrica.

Palabras Clave: MDMA, éxtasis, receptores nicotínicos, regulación al alza, sensibilización,

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





En trabajos anteriores al inicio de este Proyecto, nuestro grupo había demostrado que la metanfetamina (MA) y la metilendioximetanfetamina (MDMA, éxtasis) presentaban afinidad por los receptores nicotínicos heteroméricos y homoméricos $\alpha 7$ (García-Ratés y col., 2007, *Tox. Appl. Pharmacol.* 223, 195-205). La finalidad de este proyecto de investigación ha sido el estudio de las consecuencias relacionadas con la interacción de la MDMA con los receptores nicotínicos. Ello conlleva estudiar sus efectos tanto a nivel funcional como en la densidad de receptores, así como sobre la regulación al alza inducida por nicotina, ya que como resultado podría incrementarse la sensibilización y vulnerabilidad a otras drogas. Finalmente, se ha intentado demostrar que fármacos ya utilizados en clínica como el bupropión o la vareniclina, al poder bloquear el efecto de la MDMA sobre los receptores nicotínicos, serían útiles para tratar estos efectos.

1.- Estudios a nivel receptorial y funcional *in vitro*

Ya que la MDMA se presenta en el mercado como una mezcla de dos estereoisómeros (S(+) y R(-)) nos planteamos, como **extensión del objetivo 1**, estudiar el posible efecto diferencial de los estereoisómeros en la afinidad por los receptores nicotínicos y en la entrada de calcio. Se han realizado pues experimentos de fijación de [³H]epibatidina y [³H]metillicaonitina ([³H]MLA) con estos estereoisómeros, así como medida de la entrada de calcio. Hemos descubierto que el isómero (-) MDMA presenta más afinidad por los receptores nicotínicos heteroméricos que el isómero (+), mientras que no presentan diferencias significativas de afinidad hacia los receptores $\alpha 7$, la cual cosa ha concordado con los experimentos de entrada de calcio, donde ambos estereoisómeros no presentan diferencias de eficacia.

Afinidad $\alpha 7$

Drogas	Cél. PC12	
	K _i (μ M)	n _H
S(+)-MA	283 \pm 109	1.2 \pm 0.15
(+/-)MDMA	15.35 \pm 1.03	1.35 \pm 0.11
R(-)MDMA	13.24 \pm 5.27	0.99 \pm 0.08
S(+)-MDMA	11.64 \pm 0.1	0.95 \pm 0.14

Afinidad $\alpha 4\beta 2$

Drogas	Cerebro rata	
	K _i (μ M)	n _H
R(-)-MA	24.33 \pm 1	0.71 \pm 0.11*
S(+)-MA	45.33 \pm 9	0.47 \pm 0.11
(+/-)MDMA	1.44 \pm 0.54	1.03 \pm 0.04
R(-)MDMA	0.63 \pm 0.16	1.02 \pm 0.013
S(+)-MDMA	8.21 \pm 2.02	0.75 \pm 0.11*

Tablas resumen de las afinidades de los diferentes estereoisómeros (y mezcla en el caso de MDMA) de MA y MDMA por los receptores homoméricos $\alpha 7$ en células PC 12 y heteroméricos (mayoritariamente $\alpha 4\beta 2$) en homogeneizado de cerebro de rata.

Finalmente, fruto de una **colaboración** con el equipo del Dr. Fco. Javier Luque, de la Facultad de Farmacia de Barcelona, se han realizado unos estudios de **modelización molecular** de la



unión de la MDMA al receptor $\alpha 4\beta 2$, identificándose un lugar de unión que reconoce preferentemente al grupo amino protonado de la droga a nivel de los aminoácidos Trp147 y Tyr 195, mientras que la interacción del anillo heterocíclico es claramente más débil. El enantiómero R tiene más afinidad, que se atribuiría a una mayor interacción con Tyr 195.

Ensayos *in vitro* de medida de Ca^{2+} intracelular (ver artículo adjunto)

Para caracterizar las consecuencias funcionales de la interacción con los receptores nicotínicos se han utilizado células PC 12, las cuales ya habían sido usadas en los ensayos de fijación de radioligandos y donde demostramos la interacción física con estos receptores (García-Ratés y col., 2007). Ya que la activación de receptores $\alpha 7$ induce entrada de calcio y la de los heteroméricos también, previa activación de canales dependientes de voltaje, el incremento de calcio citosólico se utilizó como medida de la activación celular, que debería antagonizarse con antagonistas nicotínicos específicos. Las células se cargaron con el fluorocromo sensible al calcio Fluo-4 y se transfirieron a un espectrofluorímetro de microplacas dotado de un dispensador automático.

Cuando se probó el efecto de la MDMA sobre la respuesta inducida por los agonistas nicotínicos acetilcolina (ACh), nicotina y PNU 282987 (selectivo $\alpha 7$), ésta inhibió dicha respuesta de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, cuando la MDMA se aplicó sola, fue capaz de inducir una entrada de calcio también de forma concentración-dependiente, sin llegar a los niveles de respuesta máxima inducidos por el agonista, pero de forma sostenida. Ello hace pensar que la MDMA actuaría como **agonista parcial**. Para determinar el tipo de receptores y vías implicadas en la respuesta a MDMA se ensayaron diversos antagonistas y bloqueadores. Dicha respuesta fue prácticamente inhibida en su totalidad por metillicaconitina (MLA) y α -bungarotoxina, mientras que la dihidro- β -eritroidina no la afectó, lo que indica que **la respuesta a MDMA está mediada por la activación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$** . Asimismo, el efecto de la MDMA fue parcialmente antagonizado por los bloqueadores de la salida de calcio del retículo endoplásmico dantroleno y 2-aminofenilborato, lo que indica la participación de la liberación de calcio del retículo inducida por la entrada inicial a través del receptor (*calcium-induced calcium release*). Ello concuerda con otros trabajos que caracterizan la respuesta $\alpha 7$ en células PC 12 (Dickinson y col., 2007, *J. Neurochem.* 100, 1089-1096). También se demostró la participación de canales de calcio dependientes de voltaje, ya que la respuesta a MDMA también fue parcialmente inhibida por Cd^{2+} y nitrendipino. Finalmente, demostramos que el factor desencadenante de la respuesta es la entrada de Ca^{2+} extracelular, ya que si el experimento se realizaba con un medio sin calcio y con EGTA, la MDMA carecía de efecto.

Otro aspecto que se estudió es el efecto del tratamiento con MDMA sobre los niveles basales de Ca^{2+} , ya que un incremento prolongado puede conllevar la desregulación de dicho catión y activar vías citotóxicas. Cuando las células PC 12 se incubaron con 50 μM de MDMA durante varias horas, éstas presentaron niveles basales sobre un 25 % más altos que los controles a las 6 y 24 h de tratamiento, mientras que las tratadas con nicotina (50 μM) a modo de comparación, sólo presentaron incrementos al cabo de 1 h de tratamiento y a las 6 y 24 h no presentaban diferencias respecto a los controles. Ello indica que **la MDMA induce incrementos sostenidos del Ca^{2+} citosólico que, a diferencia de la nicotina, no pueden ser compensados por la célula.**

Una de las consecuencias de un incremento sostenido del Ca^{2+} citosólico es la activación de enzimas dependientes de calcio como la sintasa de óxido nítrico o la calpaína. Para evidenciar la activación de la calpaína estudiamos mediante Western blot la aparición de fragmentos de 145-



150 kDa de la proteína del citoesqueleto α -espectrina, que es uno de sus sustratos. Asimismo, también se analizó el fragmento de 120 kDa que resulta de su corte por la caspasa 3, la cual está implicada en procesos de apoptosis. Se evidenció un incremento significativo de los niveles de fragmentos de 145-150 kDa y de 120 kDa, lo que indica que **la exposición prolongada a MDMA induce la activación de la calpaína y la caspasa 3, ambas implicadas en vías citotóxicas.** Trabajos previos de nuestro grupo habían implicado a la caspasa 3 en la muerte neuronal en células granulares de cerebelo (Jiménez y col., 2004, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 223-234). El pretratamiento con MLA inhibió los incrementos de las bandas analizadas, lo que indica que es un proceso mediado por la activación de los receptores $\alpha 7$.

La exposición prolongada a ligandos nicotínicos, independientemente de sus propiedades agonistas o antagonistas, puede producir, además de la regulación al alza de la densidad de receptores, un incremento en la respuesta (regulación al alza funcional). Por ello estudiamos las consecuencias de la exposición a MDMA (50 μ M) en la respuesta a los agonistas nicotínicos específicos $\alpha 7$, PNU 282987, y de los receptores heteroméricos con subunidad $\beta 2$, 5-I-A-85380. En ambos casos se evidenció una mayor respuesta (15-20 % mayor) en las células pretratadas con MDMA, lo que indica que **la MDMA induce regulación al alza funcional de los receptores nicotínicos.**

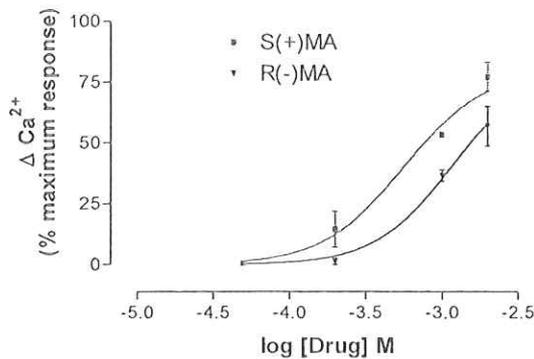
Así pues, **hemos demostrado que la MDMA, mediante la activación de los receptores nicotínicos $\alpha 7$, provoca un incremento duradero del Ca^{2+} citosólico que se traduce en la activación de la calpaína y de la caspasa 3, lo cual explicaría parte de sus efectos citotóxicos y aporta un nuevo mecanismo de acción para esta droga.** Asimismo, como ligando nicotínico, la MDMA provoca regulación al alza funcional de los receptores nicotínicos, tanto $\alpha 7$ como heteroméricos, la cual cosa estaría implicada en procesos de sensibilización.

Ensayos *in vitro* de medida de Ca^{2+} intracelular con los estereoisómeros de MDMA y MA

Se han estudiado los posibles efectos antagonistas sobre la entrada de calcio inducida por un agonista $\alpha 7$ puro (PNU 282987) y el efecto agonista propio de los estereoisómeros de MA y MDMA en células PC 12. Los estereoisómeros de la MDMA no presentaron grandes diferencias de potencia entre sí, mientras que la S(+)-MA resultó un agonista parcial más potente que la R(-)-MA.

Drogas	PC12	
	CI_{50} (μ M)	CE_{50} (μ M)
R(-)MA	466 \pm 20	1145 \pm 72
S(+)-MA	326 \pm 2 *	560 \pm 5.2 *
(+/-)MDMA	29.88 \pm 2.52	49.75 \pm 5.71
R(-)MDMA	46 \pm 2.12	55.68 \pm 5
S(+)-MDMA	15 \pm 5.5 *	30.45 \pm 3.5

Tabla que muestra las constantes de inhibición (CI_{50}) de la entrada de Ca^{2+} inducida por el agonista selectivo $\alpha 7$ PNU 282987, por los diferentes estereoisómeros o racémicos, así como la concentración eficaz 50 (CE_{50}) como indicativo de su propia eficacia para inducir una entrada de Ca^{2+} (agonista). * $P < 0,05$ vs. el isómero (-).



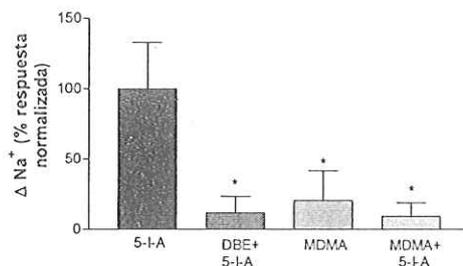
Efecto agonista de los estereoisómeros de la MA sobre la entrada de calcio en células PC 12.

Estudios complementarios en ovocitos de *Xenopus*

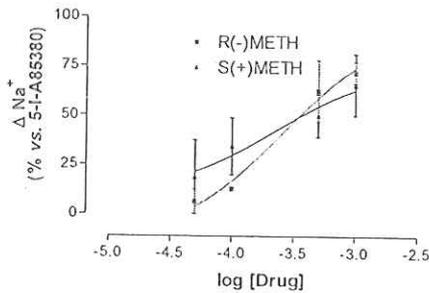
Fruto de una colaboración con el grupo del Dr. Luis Gandía, del Instituto de Farmacología Teófilo Hernando, tuvimos la oportunidad de estudiar los efectos de la MDMA sobre las corrientes inducidas por la activación de los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ en ovocitos de *Xenopus* transfectados con el gen humano de dichos receptores. Los resultados confirmaron lo obtenido con los experimentos de medida del Ca^{2+} ; la MDMA inhibió de manera dependiente de concentración la respuesta inducida por ACh en ambos receptores con CI_{50} micromolares bajas y fue capaz por sí misma de inducir corrientes en los receptores $\alpha 7$. Estos experimentos fueron realizados por la becaria Sara García, que se trasladó a los laboratorios del grupo durante 6 semanas, como parte de su programa de formación.

Ensayos *in vitro* de medida de Na^+ intracelular

Finalmente se estudió el efecto de la MDMA y la MA sobre la **entrada de sodio** a través de los receptores heteroméricos, utilizando cultivos primarios de células corticales de ratón, ya que las PC 12 no incorporaban el fluorocromo específico para el sodio, el CoroNa Green. Los resultados demostraron que **la MDMA racémica y sus dos estereoisómeros por separado se comportan como antagonistas** de estos receptores, mientras que **la MA se comporta como agonista parcial y no existen diferencias de potencia entre sus dos estereoisómeros**. Ello podría explicar, juntamente con sus efectos más dopaminérgicos, el mayor poder adictivo de la metanfetamina, ya que los receptores nicotínicos heteroméricos juegan un papel primordial en el establecimiento de la adicción.



Efecto antagonista de la MDMA (50 μM) sobre la entrada de sodio en células corticales de ratón inducida por el agonista 5-I-A85380 (15 μM). Se compara con el antagonista $\alpha 4\beta 2$ dihidro- β -eritroidina (DBE). * $P < 0,05$ vs. 5-I-A.



Efecto agonista de los estereoisómeros de la MA sobre la entrada de sodio en células corticales de ratón.

Drogas	Células corticales	
	CI ₅₀ (μM)	CE ₅₀ (μM)
R(-)MA	13.68 ± 1.3	257.9 ± 0.8
S(+)-MA	12.06 ± 2.1	223.6 ± 3.3
(+/-)MDMA	5.09 ± 0.1	
R(-)MDMA	0.37 ± 0.02 *	
S(+)-MDMA	9.7 ± 1	

Tabla que muestra las constantes de inhibición (CI₅₀) de la entrada de Na⁺ inducida por el agonista selectivo α4β2 5-I-A85380 por los diferentes estereoisómeros o racémicos, así como la concentración eficaz 50 (CE₅₀) como indicativo de su propia eficacia para inducir una entrada de Na⁺ (agonista). Se observa que la MA se comporta como agonista parcial, mientras que la MDMA como antagonista (no indujo entrada de Na⁺ por sí sola).

2.- Experimentos sobre regulación al alza *in vivo*

Para confirmar los resultados obtenidos anteriormente en células PC 12, se realizó un tratamiento de ratas que se dividió en 4 grupos de 6 animales: salino (control), MDMA, nicotina y MDMA+nicotina. El tratamiento duró 10 días durante los cuales, los grupos que recibían nicotina, se trataron con 2 mg/kg de nicotina bitartrato dihidrato, dos veces por día (separadas 7h). Los grupos que recibían MDMA lo hicieron durante los últimos 4 días, a razón de dos administraciones de 20 mg/kg cada día. El resto de animales y días se trató con suero fisiológico, de manera que todas las ratas recibieron el mismo número de inyecciones. Al día siguiente de finalizar el tratamiento, los animales se sacrificaron y se les extrajo y diseccionó el cerebro en grandes zonas como corteza prefrontal y parietal, hipocampo, estriado y el conjunto formado por tálamo+hipotálamo. Se obtuvo una preparación cruda de membranas y se realizaron experimentos de fijación de los radioligandos [³H]epibatidina (marca receptores heteroméricos) y [³H]MLA (marca los receptores α7).

Por lo que respecta a los receptores nicotínicos heteroméricos (principalmente α4β2) medidos mediante la fijación de [³H]epibatidina, la MDMA provocó un incremento en la fijación del radioligando de alrededor del 30% en la corteza cerebral (frontal y parietal) de rata. Cuando la MDMA se asoció a nicotina, la cual por sí sola también provoca una regulación al alza similar, el incremento en la fijación de radioligando se vio potenciado, sobretodo en la corteza frontal (del 30% al 70%). En el estriado y en tálamo+hipotálamo, la MDMA no indujo regulación de los receptores y no modificó la inducida por la nicotina.

Con estas mismas muestras, se solubilizaron los receptores y se realizó la inmunoprecipitación selectiva con anticuerpos anti-α4 y anti-β2, obteniéndose resultados similares, lo cual indica



que los receptores heteroméricos que mayoritariamente sufren esta regulación al alza son los $\alpha 4\beta 2$.

Los receptores $\alpha 7$ se cuantificaron mediante la fijación de [^3H]MLA. En este caso, la MDMA sólo indujo un ligero incremento de los receptores en la corteza parietal, pero potenció significativamente el efecto regulador de la nicotina en la corteza prefrontal y en el hipocampo.

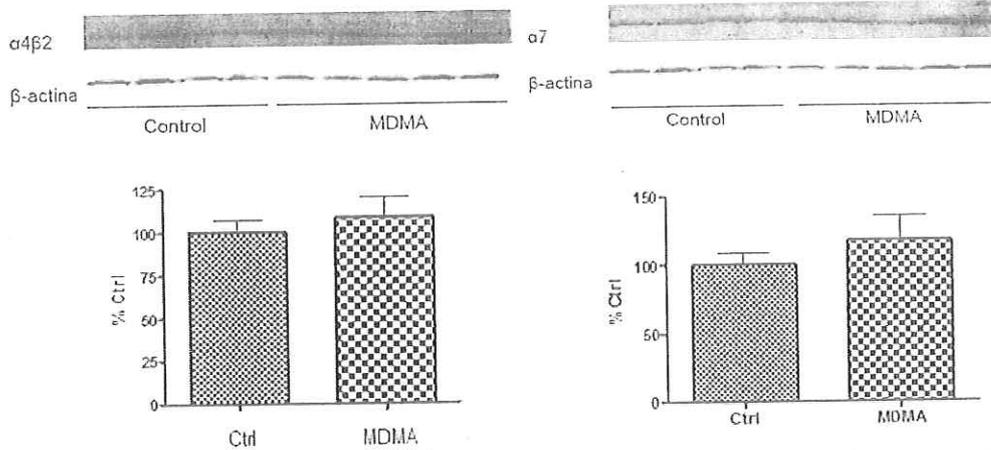
Así pues, hemos demostrado que la MDMA induce *in vivo* la regulación al alza de los receptores nicotínicos por lo que respecta a la fijación de radioligandos específicos, principalmente de los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ y potencia en algunas áreas el efecto regulador de la nicotina si se asocian. Tenemos un artículo en preparación con dichos resultados.

Sin embargo, un punto interesante era determinar si dicha regulación tenía lugar a dosis de MDMA más moderadas (no neurotóxicas como la utilizada anteriormente), si bien podrían ser durante periodos de tiempo más largos, ya que al repetir la pauta neurotóxica de dos administraciones diarias de 20 mg/kg los incrementos en la unión de [^3H]epibatidina en corteza fueron mucho más modestos (sobre un 12%) que los obtenidos en el tratamiento anterior y no se obtuvieron cambios en la unión de [^3H]MLA en hipocampo. Quizás en este caso la neurotoxicidad inducida fue mayor e impidió la regulación esperada. Por ello se ensayaron pautas de menor dosis y mayor duración (10 días), utilizando 5 y 10 mg/kg/día.

En la pauta de 5 mg/kg se encontraron incrementos significativos de receptores heteroméricos en estriado (19%) y $\alpha 7$ en hipocampo (30%), pero no en corteza. En la de 10 mg/kg se encontró un incremento del 20% en corteza frontal y del 15% en el estriado, mientras que en el hipocampo los $\alpha 7$ no dieron incrementos significativos debido a la gran desviación de los resultados en este área, si bien la media era mayor. (17%).

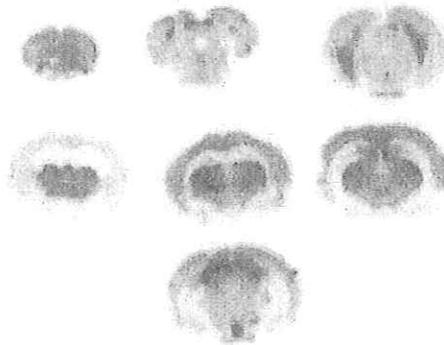
Vistos los resultados, se decidió mantener los 10 días de tratamiento e incrementar el número de administraciones diarias a dos, con la finalidad de prolongar los niveles plasmáticos de MDMA, y reduciendo la dosis para minimizar la neurotoxicidad. Así pues, se han ensayado 7 mg/kg 2 veces al día (separadas 6 h) durante 10 días. En este caso se ha detectado un incremento muy significativo (alrededor del 25%) de los receptores heteroméricos en una sección coronal que contenía los colículos superiores y todas las estructuras del tronco encefálico que se encuentran por debajo, incluida el área tegmental ventral (ATV, implicada en la adicción). Asimismo, en la corteza frontal también se han encontrado incrementos significativos (25%, $P < 0,05$) en la densidad de receptores heteroméricos y en la corteza parietal se observa una tendencia al incremento, si bien no ha resultado estadísticamente significativa, probablemente por el número de animales usado (5 por grupo).

Se han realizado ensayos de Western blot en corteza frontal (donde se había detectado incremento de receptores heteroméricos) con anticuerpos anti- $\alpha 4$ y anti- $\alpha 7$ para determinar si la regulación al alza se acompañaba de un incremento en la proteína total. Los resultados han mostrado que no hay cambios en la inmunoreactividad, lo que indicaría que la regulación al alza implicaría cambios post-traduccionales, al igual que pasa con la nicotina.



Western blots representativos de los niveles de las subunidades $\alpha 4$ y $\alpha 7$ en corteza frontal de ratas control y tratadas con MDMA (10 días $2 \times 7 \text{ mg/kg/día}$). Debajo se muestra la cuantificación correspondiente.

A partir de estos resultados, se decidió tomar esta última pauta para realizar los **estudios de autoradiografía**. Se han tratado 12 nuevos animales (6 control y 6 MDMA) y se han cortado sus cerebros en secciones coronales para realizar dicho estudio. **Se ha puesto a punto la autoradiografía con $[^{125}\text{I}]$ epibatidina**, obteniéndose finalmente unas imágenes definidas con una fijación inespecífica no detectable. En el momento de redactar este informe se **están realizando los experimentos** con las muestras tratadas. Se muestran a continuación imágenes representativas. Asimismo estamos estableciendo los criterios de cuantificación, un proceso que requiere tiempo frente al ordenador. Nos comprometemos a **informar al PNSD de los resultados finales** cuando hayamos finalizado esta tarea, ya que se prevé obtener una nueva publicación con los resultados. Asimismo, está previsto realizar las autoradiografías con $[^{125}\text{I}]\alpha$ -bungarotoxina para marcar los receptores homoméricos $\alpha 7$.



Imágenes autoradiográficas representativas obtenidas marcando los receptores nicotínicos heteroméricos con $[^{125}\text{I}]$ epibatidina.

Finalmente, añadir que fruto de los experimentos realizados sobre sensibilización en ratones (apartado siguiente) también se ha estudiado el efecto del tratamiento de 10 días con MDMA y la posterior abstinencia sobre la población de receptores nicotínicos de determinadas áreas cerebrales, demostrándose importantes efectos reguladores en zonas como la corteza y el hipocampo.



3.- Experimentos *in vivo* sobre sensibilización y regulación al alza funcional

Experimentos con metanfetamina

Íntimamente relacionado con el proyecto original y dados unos resultados preliminares que debían ser complementados, inicialmente el objetivo se planteó a la inversa (si el hecho de haber consumido nicotina potenciaba los efectos del derivado anfetamínico y con ello su efecto adictivo) y con otro derivado anfetamínico ampliamente consumido, la metanfetamina (MA). **Este trabajo derivó en una publicación de la que se adjunta separata.** En ella se ha demostrado que el tratamiento "crónico" de ratones con nicotina (0,5 mg/kg/día, 4 días) potencia el incremento de actividad locomotora inducido por MA y dicha potenciación es bloqueada por antagonistas nicotínicos $\alpha 7$ (MLA) y $\alpha 4\beta 2$ (dihidro- β -eritroidina), lo cual indica que dicha sensibilización viene mediada por receptores nicotínicos.

Por otra parte, el incremento de actividad locomotora inducido por MA no es antagonizado por los antagonistas nicotínicos, lo cual corrobora el hecho ampliamente reconocido de que se trata de un efecto dopaminérgico (ver separata adjunta).

Como parte de este trabajo también se ha estudiado la participación de los receptores nicotínicos en la analgesia inducida por MA en los tests de la placa caliente, las contracciones por ácido acético y el test de la inyección subplantar de formalina. La MLA antagonizó el efecto analgésico de la MA en los tests de las contracciones y la formalina, pero no en la placa caliente, mientras que la dihidro- β -eritroidina, por el contrario, sólo antagonizó el efecto analgésico en la placa caliente. De ello se deduce que el efecto analgésico de la MA a nivel espinal y supraespinal es mediado por receptores $\alpha 7$, mientras que los receptores heteroméricos con subunidad $\beta 2$ sólo participan a nivel supraespinal.

Experimentos con MDMA

Asimismo, se ha realizado un tratamiento crónico con MDMA en ratones Swiss CD-1 (5 mg/kg/día durante 10 días). La actividad locomotora se ha medido los días 1 y 10 y se ha evaluado el efecto de una nueva dosis de esta droga sobre el **incremento de actividad locomotora**, transcurridos 15 días libres de droga después de la última administración. **El hecho de haber consumido anteriormente éxtasis, potencia muy significativamente los efectos de una nueva única dosis, la cual cosa indica una sensibilización que incrementaría sus efectos reforzadores.**

Los valores del área bajo la curva de los gráficos de actividad (registro de la actividad durante 6 h, medida en 36 bloques de 10 min.) son:

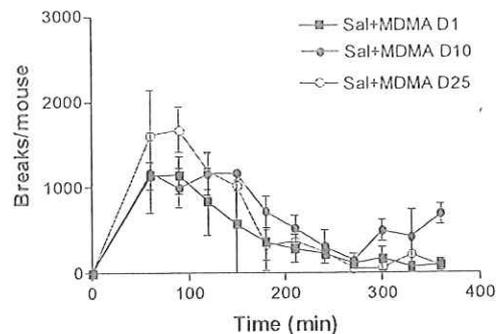


Día 1 (control MDMA): 166290

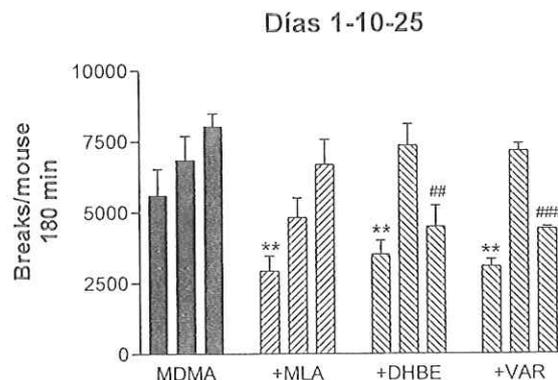
Día 10: 242010*

Día 25: 228150*

* $P < 0,05$ vs. día 1



Posteriormente se evaluó el efecto del pretratamiento con los antagonistas nicotínicos dihidro- β -eritroidina (1 mg/kg i.p., DHBE, antagonista $\alpha 4\beta 2$) y MLA (5mg/kg i.p., antagonista $\alpha 7$), así como el agonista parcial $\alpha 4\beta 2$, vareniclina (0,3 mg/kg, i.p., VAR) sobre la sensibilización producida por la MDMA después de los 15 días de abstinencia. Los resultados se muestran en la siguiente figura:



Las tres barras para cada sustancia corresponden (de izquierda a derecha) a la actividad locomotora medida los días 1 (inicio), 10 (última dosis) y 25 (dosis tras 15 días de abstinencia), ** $P < 0,01$ vs. MDMA día 1; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ vs. MDMA día 25. Puede observarse que los tres fármacos inhibieron el incremento de actividad locomotora inducido por MDMA el primer día de tratamiento, lo que implicaría tanto a los receptores $\alpha 4\beta 2$ como a los $\alpha 7$ en el efecto agudo de la MDMA sobre la locomoción (se discute en el siguiente apartado). Sin embargo, dicho bloqueo desaparece cuando el tratamiento progresa (día 10) y después de 15 días de abstinencia, sólo la DHBE y la vareniclina antagonizaron el incremento en la hiperlocomoción inducido por MDMA. Ello indicaría que la sensibilización a MDMA en ratones implicaría una **hiperfuncionalidad de los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$** .

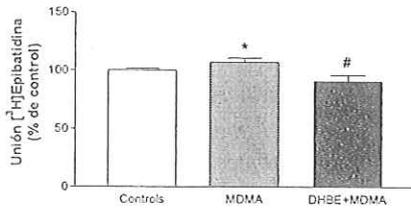
También se midieron las densidades de receptores nicotínicos en diversas áreas de los cerebros de los animales tratados. A continuación se muestran algunos de los resultados obtenidos:



DHBE

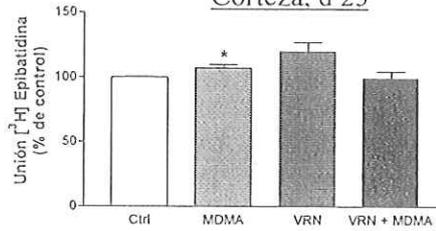
Vareniclina

Corteza, d 25



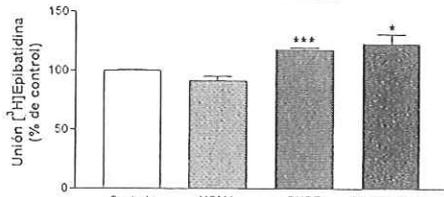
Efectos de la MDMA (5mg/kg), M.A.+MDMA (5mg/kg, 5mg/kg) y DHBE+MDMA (1mg/kg, 5mg/kg) durante 10 días, en la densidad de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ en membranas de corteza de ratones Swiss CD-1 después de 14 días de abstinencia. Se representan los datos en % del control \pm SEM (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs control; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs. MDMA).

Corteza, d 25



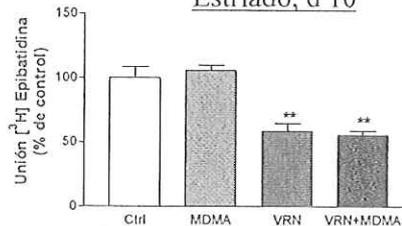
Efectos de la MDMA (5mg/kg), VRN+MDMA (5mg/kg, 5mg/kg) y +MDMA (1mg/kg, 5mg/kg) durante 10 días, en la densidad de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ en membranas de corteza de ratones Swiss CD-1 después de 14 días de abstinencia. Se representan los datos en % del control \pm SEM (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs control; #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs. MDMA).

Estriado, d 10



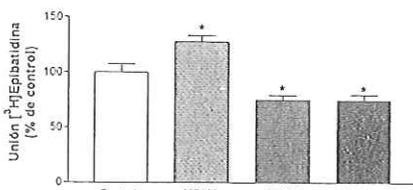
Efectos de la MDMA (5mg/kg), DHBE (1mg/kg) y DHBE+MDMA (1mg/kg, 5mg/kg) durante 10 días sobre la densidad de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ en membranas estriales de ratones Swiss CD-1. Los datos se representan en % del control \pm SEM (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs control).

Estriado, d 10



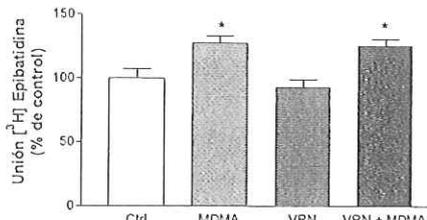
Efecto de la MDMA (5mg/kg), VRN (0,3mg/kg) y VRN+MDMA (0,3mg/kg, 5mg/kg) sobre la densidad de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ en membranas estriales de ratones Swiss CD-1. Se representan los datos en % del control \pm SEM. (**P<0,01 vs control).

Estriado, d 25



Efectos de la MDMA (5mg/kg), DHBE (1mg/kg) y DHBE+MDMA (1mg/kg, 5mg/kg) durante 10 días y 14 días de abstinencia, sobre la densidad de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ en membranas estriales de ratones Swiss CD-1. Se representan los datos en % del control \pm SEM (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs control).

Estriado, d 25



Efecto de la MDMA (5mg/kg), VRN (0,3mg/kg) y VRN+MDMA (0,3mg/kg, 5mg/kg) sobre la densidad de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ en membranas estriales de ratones Swiss CD-1. Se representan los datos en % del control \pm SEM. (*P<0,05 vs control).

Puede observarse que el tratamiento con MDMA provoca que, el día 25, después de 15 días de abstinencia, haya una mayor cantidad de receptores nicotínicos heteroméricos en el estriado, principal área implicada en el incremento de actividad locomotora, lo cual facilitaría la liberación de dopamina en este área.

La DHBE *per se* incrementa los receptores mientras dura el tratamiento, pero pasado el periodo de abstinencia puede observarse que revierte el incremento de receptores inducido por MDMA, lo que explicaría su efecto antagonista sobre la hiperlocomoción y la sensibilización.



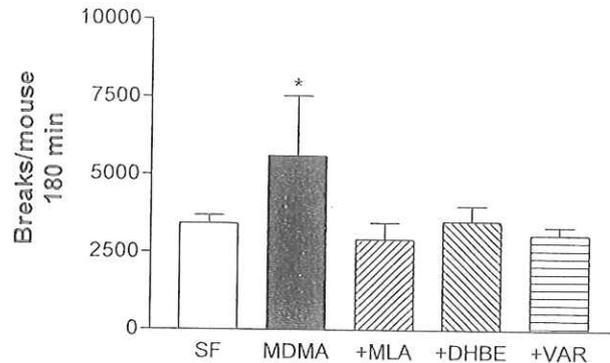
La VAR induce regulación a la baja durante el tratamiento de 10 días, pero no **inhibe el incremento detectado el día 25 en el estriado, pero sí en la corteza**. Aún y así, los animales pretratados con VAR no experimentaron el incremento en la hiperlocomoción por MDMA el día 25. Ello indica que la regulación receptorial inducida por estas sustancias en las diversas áreas cerebrales es compleja y complica la explicación que relacionaría incremento de receptores en estriado y sensibilización.

Por lo que respecta a la MLA, ésta indujo una disminución de receptores heteroméricos en el estriado medidos el día 10 (de hecho, la hiperlocomoción este día es menor que con DHBE y vareniclina) e inhibió la regulación al alza el día 25. Ello implicaría un efecto desensibilizador. Sin embargo, no inhibió la hiperlocomoción inducida por MDMA el día 25, si bien el valor de actividad motora es menor. Ahora bien, la asociación MLA+MDMA indujo un incremento de alrededor del 50% en los receptores $\alpha 7$ del hipocampo, lo cual podría ser indicativo de que en otras áreas implicadas en la hiperlocomoción también podría darse este incremento y contrarrestar el efecto sobre los heteroméricos, aunque estos razonamientos requieren una mayor profundización.

4.- Experimentos sobre la interacción con los transportadores de monoaminas

Se ha finalizado un estudio sobre los efectos diferenciales de la MDMA y uno de sus principales metabolitos, la α -metildopamina, sobre los transportadores de dopamina y serotonina en sinaptosomas de cerebro de rata, dando lugar a **un artículo** que se referencia más adelante. Concretamente, en este trabajo se ha demostrado que la α -metildopamina es capaz de inhibir la captación de serotonina mediante competición con ésta, ya que no presenta afinidad por el lugar de los inhibidores del transporte y que no es capaz, a diferencia de la MDMA, de provocar cambios persistentes en el transportador que conduzcan a un bloqueo del transporte (Chipana y col., 2006, *Neuropharmacology* 51, 885-895). Por otra parte, la α -metildopamina inhibe la captación de dopamina por parte de los terminales serotoninérgicos depleccionados, lo que podría ejercer un cierto efecto protector frente a la neurotoxicidad serotoninérgica. Por lo que respecta al transportador de dopamina (DAT), el metabolito inhibe la captación de dopamina con mayor potencia que la MDMA y provoca cambios permanentes (persisten después de lavar la droga) que no son dependientes de la concentración ni de la dopamina endógena, lo que apunta a una reacción directa con el DAT. Finalmente, la α -metildopamina no presenta afinidad por los receptores nicotínicos, a diferencia del compuesto original.

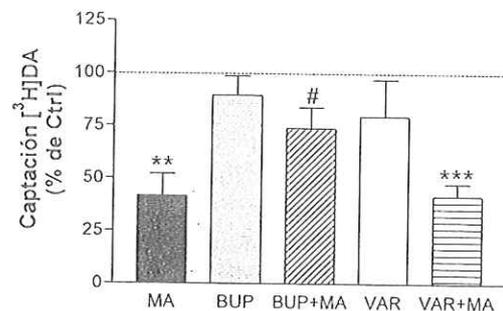
También, de acuerdo con el objetivo 6 (especificado en el siguiente apartado), evaluamos el efecto de los antagonistas nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ (dihidro-beta-erotroidina, DHBE, y MLA, respectivamente) y del agonista parcial $\alpha 4\beta 2$ vareniclina (VAR) sobre el incremento agudo de actividad locomotora inducido por MDMA. Este aumento es indicativo sobre la funcionalidad del transportador de dopamina. Como puede evidenciarse en el gráfico siguiente, los tres compuestos antagonizaron la hiperlocomoción registrada durante 180 minutos, lo que indicaría que **los receptores nicotínicos participan en el incremento de hiperlocomoción inducido por MDMA en ratón**.



* $P < 0.05$ vs. SF

Efectos agudos de diferentes ligandos nicotínicos sobre la hiperlocomoción inducida por una dosis aguda de MDMA (5 mg/kg)

Otro punto a trabajar era el posible efecto protector de los fármacos agonistas parciales o antagonistas nicotínicos sobre la pérdida de función del DAT inducida por la preincubación con un derivado anfetamínico. Se han realizado pruebas en células PC 12 y sinaptosomas de estriado de rata, pero las PC 12 no reflejaron el comportamiento buscado y los sinaptosomas incubados con las diferentes sustancias no proporcionaban resultados reproducibles. La MDMA no inducía cambios persistentes en el DAT, si bien se comportaba como un inhibidor competitivo, por lo que se escogió la MA como estímulo capaz de producir una inhibición duradera del DAT. Asimismo, se optó por utilizar como modelo el tratamiento *in vivo* de ratas con una sola dosis de MA (Sandoval, V. y col., 2001, *J. Neurosci.* 21, 1413-1419), extraer los sinaptosomas de sus estriados y medir la captación de [³H]dopamina. De acuerdo, con esta referencia, la administración aguda de MA provoca una inhibición persistente del DAT que se traduce en una menor captación del sustrato marcado. Paralelamente, se pretrataron animales con bupropión (BUP, 30 mg/kg, i.p.) y vareniclina (VAR, 3 mg/kg, s.c.). Los resultados se muestran a continuación:



Efecto del pretratamiento con bupropion o vareniclina sobre la inhibición del transporte de dopamina en sinaptosomas de estriado de rats tratadas. Los resultados son la media \pm SEM de los valores de 5-6 ratas por grupo. ** $P < 0,01$, *** $P < 0.001$ vs. control, # $P < 0,05$ vs. MA.

Puede observarse que sólo el bupropion (antagonista $\alpha 7$ e inhibidor del DAT) y no la vareniclina previno la pérdida de función del DAT. Ello indicaría que los receptores $\alpha 7$ juegan un papel más importante en la inhibición del DAT que los heteroméricos, o bien que debido a sus efectos sobre el DAT inhibiría la entrada de la MA dentro del terminal neuronal, inhibiendo así su toxicidad.



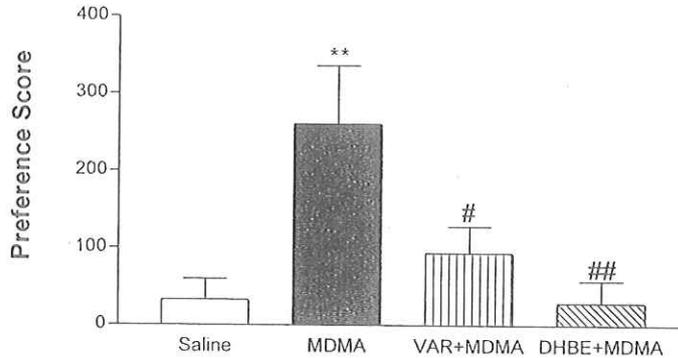
5.- Sobre las alteraciones cognitivas y la neurotoxicidad

Continuando con el estudio de los efectos de los antagonistas nicotínicos $\alpha 7$ sobre las alteraciones cognitivas inducidas por derivados anfetamínicos, se ha finalizado y publicado un estudio (referenciado más adelante) que muestra que **la memantina**, un fármaco utilizado en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer que además bloquea los receptores nicotínicos $\alpha 7$, **no sólo es útil para prevenir las alteraciones cognitivas inducidas por MDMA** (Chipana y col., 2008, *Neuropharmacology* 54, 1254-1263), **sino que también es efectivo para las producidas por la metanfetamina (MA)**, el otro derivado anfetamínico más importante en cuanto a uso recreacional. Así, la memantina previene los déficits cognitivos mostrados por ratas Long Evans tratadas con MA en pruebas como el reconocimiento de objetos, el campo abierto o el laberinto acuático de Morris.

Las alteraciones cognitivas van estrechamente relacionadas con la neurotoxicidad. Por ello hemos realizado dos estudios en que se ha evaluado el efecto de la asociación a MDMA del modulador alostérico de los receptores nicotínicos $\alpha 7$, PNU 120586, y del agonista de estos receptores, PNU 282987, sobre la neurotoxicidad de esta droga. La hipótesis consistía en que si la MDMA activa de forma continuada estos receptores colaborando a la neurotoxicidad, cualquier otro fármaco que facilite su activación potenciaría dicha toxicidad. Los resultados, administrando los moduladores antes que la MDMA, no han mostrado diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento (MDMA y PNU+MDMA). Estos resultados sólo pueden explicarse de forma hipotética, pero debería estudiarse qué pasaría si se administrara primero la MDMA y después el PNU 282987.

6.- Sobre la adicción

Se ha puesto a punto la técnica de **preferencia condicionada de lugar** con ratones, para estudiar el efecto de los ligandos nicotínicos sobre la preferencia de lugar inducida por la administración de MDMA. Esta técnica se realiza en un recinto que consta de dos compartimentos claramente diferenciables (suelo, color de las paredes, etc) comunicados por un compartimento central. El primer día se registra durante 20 minutos y libre acceso a los dos compartimentos el tiempo que pasa cada ratón en cada uno, mediante una cámara acoplada a un ordenador. Seguidamente se realiza la fase de confinamiento, donde se administra a cada ratón durante 10 días suero salino (grupo control) o MDMA y suero a días alternos y se confina a uno de los compartimentos, siempre un mismo compartimento para suero y el otro para MDMA para cada ratón. Seguidamente, en la fase de prueba se coloca al ratón en el compartimento central con libre acceso a los otros dos y se registra el tiempo que permanece en cada uno de los compartimentos. En principio, si la droga es adictiva, hará que el ratón pase significativamente más tiempo en el compartimento donde la recibió, y menos en la que recibió suero. Sobre este modelo, hemos estudiado el efecto de la vareniclina (VAR) y la dihidro- β -eritroidina (DHBE) sobre la conducta adictiva inducida por MDMA demostrando, tal y como se observa en la siguiente gráfica, que ambas sustancias (agonista parcial y antagonista de los receptores $\alpha 4\beta 2$) antagonizan la preferencia de lugar inducida por la droga. Así pues **podemos concluir que los receptores nicotínicos heteroméricos participan directamente en los efectos adictivos de la MDMA.**



Preferencia condicionada de lugar por MDMA en ratones y su modulación por VAR y DHBE. ** $P < 0.01$ vs. salino; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. MDMA

7.- Efectos sobre la respuesta inmunitaria

Si bien no estaba especificado en el proyecto original, consideramos interesante continuar un estudio ya iniciado sobre el papel de los receptores nicotínicos en la supresión por MDMA de la citocina $TNF\alpha$. Está descrito que la MDMA reduce drásticamente la producción de esta citocina, inducida por la administración previa de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Connor y col., 2000., Life Sci. 67, 1601-1612) y hemos querido averiguar si los receptores nicotínicos participan en ello. Para ello se realizaron tratamientos *in vivo* en ratas y sobre sangre de rata en cultivo. La dihidro- β -eritroidina y el hexametonio, ambos antagonistas de receptores nicotínicos heteroméricos, antagonizaron el efecto de la MDMA, mientras que el antagonista $\alpha 7$ MLA no tuvo efecto. Dicho antagonismo no tuvo lugar *in vitro*, lo cual indica que se trata de un efecto a nivel nervioso periférico. Este trabajo ha dado lugar a otra publicación que se adjunta.



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

Escubedo, E., Camarasa, J., Chipana, C., Garcia-Rates, S., and Pubill, D. (2009). Involvement of nicotinic receptors in methamphetamine- and MDMA-induced neurotoxicity: pharmacological implications. *Int. Rev. Neurobiol.* 88, 121-166. *Artículo de revisión que acumula resultados anteriores y parte de los resultados preliminares de este proyecto.*

Camarasa, J., Rates, S. G., Pubill, D., and Escubedo, E. (2009). The involvement of nicotinic receptor subtypes in the locomotor activity and analgesia induced by methamphetamine in mice. *Behav. Pharmacol.* 20, 623-630.

Camarasa, J., Ros, C., Pubill, D., Escubedo, E. (2010). Tumour necrosis factor alpha suppression by MDMA is mediated by peripheral heteromeric nicotinic receptors. *Immunopharmacology and Immunotoxicology.* 32, 265-271. *Como consecuencia de la finalización de un trabajo que se había iniciado.*

Garcia-Ratés, S., Camarasa, J., Sánchez-García, A.I., Gandía, L., Escubedo, E., Pubill, D. (2010). The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on nicotinic receptors: intracellular calcium increase and functional upregulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244, 344-353.

Camarasa, J., Rodrigo, T., Pubill, D., and Escubedo, E. (2010). Memantine is a useful drug to prevent the spatial and non-spatial memory deficits induced by methamphetamine in rats. *Pharmacol. Res.* 62, 450-456.

Escubedo, E., Abad, S., Torres, I., Camarasa, J., and Pubill, D. (2011). Comparative neurochemical profile of 3,4 methylenedioxymethamphetamine and its metabolite alpha-methyltyrosine on key targets of MDMA neurotoxicity. *Neurochem. Int.* 58, 92-101.

Pubill, D., Garcia-Ratés, S., Camarasa, J., Escubedo, E. Neuronal Nicotinic Receptors as New Targets for Amphetamine-Induced Oxidative Damage and Neurotoxicity. *Pharmaceuticals* (2011) 4: 822-847.

Editor: Diego Muñoz-Torrero. Autores: Escubedo, E., García-Ratés, S., Camarasa, J., Pubill, D. Chapter 7: Involvement of nicotinic receptors in methamphetamine and MDMA induced neurotoxicity: Pharmacological studies. En: *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 2011: 155-174

Camarasa, J., Rodrigo, T., Pubill, D., Escubedo, E. Memory impairment induced by amphetamine derivatives in laboratory animals and in humans. A review. *Biomolecular concepts* 2011.



Tesis Doctoral

García-Ratés, Sara. Interacción de los derivados anfetamínicos con los receptores nicotínicos: aspectos moleculares y funcionales. Directores: Dr. David Pubill y Dra. Elena Escubedo. Defendida en julio de 2011. Calificación: Sobresaliente *cum laude*.

Comunicaciones a Congresos y Simposios

Comunicaciones orales:

García-Ratés, S., Escubedo, E., Camarasa, J., Pubill, D. Effect of MDMA on cytosolic calcium levels in PC 12 cells. Role of nicotinic receptors. Reunión Anual de la Red de Trastornos Adictivos. Tarragona, 15-16 septiembre de 2009.

Pubill, D., García-Ratés, S., Jacas, J., Camarasa, J., Escubedo, E. Involvement of nicotinic receptors in MDMA-induced toxicity and cytosolic calcium increase in PC 12 cells. 15th International Symposium on Chromaffin Cell Biology. Mérida, México, 12-16 noviembre de 2009.

Comunicaciones al congreso **WorldPharma 2010** (16th World Congress on Basic and Clinical Pharmacology) realizado en Copenhagen (Dinamarca), 17-23 de julio de 2010.

In vivo upregulation of central nicotinic receptors induced by MDMA and its association with nicotine.

David Pubill, Sara García-Ratés, Elena Escubedo, Jordi Camarasa.

Laboratory of Pharmacology and Pharmacognosy. Faculty of Pharmacy. University of Barcelona. Av. Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona.

We had demonstrated that MDMA (ecstasy) has affinity for nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) and can induce their upregulation in PC 12 cells as nicotine does. Here we assessed whether such upregulation takes place in vivo and the consequences of its association with nicotine (NIC). Male adult Sprague-Dawley rats were treated either with nicotine bitartrate dihydrate alone (2 mg/kg, s.c., b.i.d.) for 10 days or associated with MDMA (20 mg/kg, s.c, b.i.d) during the last four days. Also, another two groups received MDMA alone or saline following the same schedule. All were killed on day 11. Binding experiments with [³H]epibatidine (EB) and [³H]methyllycaconitine (MLA) were performed in homogenates of brain areas to quantify heteromeric and homomeric $\alpha 7$ nAChRs, respectively. MDMA did not modify the regulatory effects of NIC in the striatum. In prefrontal cortex NIC and MDMA induced each significant increases in [³H]EB binding (around 30%) with respect to saline-treated rats, that were significantly potentiated (up to 70%) when both drugs were associated. Also in this area, [³H]MLA binding was increased about 40% with NIC+MDMA but not when they were given alone. In the hippocampus MDMA potentiated the $\alpha 7$ regulatory effects of NIC (25% to 52% increase) but alone was devoid of effect. Specific immunoprecipitation of solubilized receptors suggests that the upregulated heteromeric nAChRs contain $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits. Western blots with specific $\alpha 4$ and $\alpha 7$ antibodies showed no significant differences between the groups, pointing that upregulation is due to posttranslational events rather than increased receptor synthesis.



Memantine prevents the cognitive deficits induced by methamphetamine in rats.

Camarasa, J.; Rodrigo, T., Pubill, D., Escubedo E.

Lab. Pharmacology and Animal Experimentation Unit. Faculties of Pharmacy and Psychology. University of Barcelona. SPAIN

Methamphetamine (METH) is a street drug abused by young people. This study seeks to determine whether pre-treatment with memantine (MEM) counteracts the memory impairment induced by METH in rodents. In mice, both METH (1 mg/Kg) and MEM (5 mg/Kg) induced a locomotor stimulant response (AUC saline: 72887 ± 6909 , MEM: 280605 ± 25130 , $P < 0.001$, METH: 256680 ± 28431 , $P < 0.001$). Non-spatial memory was assessed in the Object Recognition Test. MEM pre-treatment recovered the ability of rats to discriminate between a familiar and a novel object, which had been abolished by the METH treatment. METH-treated rats showed impaired learning in the Morris water maze. The escape latency time was shorter in animals treated with saline ($F_{2,58} = 5.434$, $P < 0.01$), MEM ($F_{2,123} = 4.402$, $P < 0.01$), or MEM+METH ($F_{2,213} = 7.263$, $P < 0.001$) as trials progressed. In contrast, METH-treated rats showed a higher escape latency ($P < 0.05$) than saline-treated animals. Probe trial demonstrated that animals treated with saline or MEM spent longer in the target quadrant than in the opposite. Moreover, MEM alone induced an improvement of learning (time spent in the target: 25.82 ± 2.44 s and opposite: 7.60 ± 1.30 s). METH-treated rats showed a cognitive deficit (time in the target: 17.40 ± 1.23 s and opposite: 14.62 ± 2.10 s, not different from random: 15.00 s). MEM pre-treatment prevented this deficit (23.58 ± 3.22 s, target and 11.14 ± 2.35 s, opposite). MEM constitutes the first successful approach to prevent the cognitive deficits induced by amphetamine derivatives, irrespective of their neurochemical profile.

In vitro neurochemical profile of MDMA and its metabolite alpha-methyl dopamine.

Escubedo, E., Abad, S., Torres, I., Camarasa, J., Pubill, D.

Lab. Pharmacology. Faculty of Pharmacy. University of Barcelona. SPAIN

Several studies suggest that MDMA-induced neurotoxicity is dependent on its metabolic disposition. In rats, the N-demethylation of MDMA leads to the formation of α -methyl dopamine (MeDA). Both compounds have different affinity profile for the serotonin transporter (SERT) ($K_i = 3.10 \pm 1.48$ μ M for MDMA and 0.12 ± 0.15 mM for MeDA) but similar affinity for the dopamine transporter (DAT) (assessed by [3 H]WIN 35428 binding) ($K_i = 14.78 \pm 5.58$ μ M and 16.94 ± 8.73 μ M respectively). They inhibited [3 H]DA uptake with IC₅₀ values (3.90 ± 2.30 and 0.11 ± 0.02 μ M respectively). The DA uptake inhibition by MDMA but not by MeDA is dependent on NOS, PKC and nicotinic receptor. Conversely, MeDA preincubation followed by washout induces a reduction in [3 H]WIN 35428 binding, but not MDMA, pointing to a direct effect of the metabolite on DAT. A hypothesis about MDMA neurotoxicity states that DA enters in serotonergic terminals where it is deaminated by MAO-B, resulting in free-radical formation and the selective degeneration of the serotonergic axons. The effect of both compounds on MAOB was very different (IC₅₀ values of 1.00 ± 0.23 mM MeDA and 70.10 ± 13.20 μ M MDMA). MeDA but not MDMA inhibited DA uptake via SERT (IC₅₀ about 20 nM at DA 5 nM) in hippocampal synaptosomes. Both MeDA effects, MAOB and DA uptake inhibition, point to the absence of neurotoxic effect of this metabolite.

Effect of MDMA on cytosolic calcium levels in PC 12 cells. Role of nicotinic receptors.

Sara Garcia-Ratés, Elena Escubedo, Jordi Camarasa, David Pubill

Lab. Pharmacology. Faculty of Pharmacy. University of Barcelona. SPAIN

Previous work from our group pointed to a role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) in the neurotoxicity induced by methamphetamine (MA) and 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) because methyllycaconitine (MLA), a specific $\alpha 7$ nAChR antagonist, attenuated neurotoxic effects such as oxidative stress and dopaminergic damage. Also, we demonstrated that MA and MDMA displaced specific nicotinic



receptor radioligands indicating that they can directly interact with nAChR. Once demonstrated the affinity we studied the effect of preincubation with MDMA on nAChR density and, as nicotinic ligands such as nicotine do, MDMA induced binding upregulation of both nAChR types after incubation times ranging from 6 to 48 h. We have now studied the effect of MDMA on the activation of nAChR subtypes and the consequent calcium mobilization using fluorimetry in Fluo-4-loaded PC12 cells. MDMA produced a rapid and sustained increase in fluorescence without reaching ACh-induced maximum effect, and inhibited the ACh- induced response. These results suggest that MDMA acts as a partial agonist on alpha7 nAChRs as the response was almost completely inhibited by MLA (10 nM) and alpha-bungarotoxin (100 nM) but not by the beta2 antagonist dihydro- β -erythroidine. Subsequently, calcium-induced Ca²⁺ release from endoplasmic reticulum and entry through voltage-operated calcium channels are also implicated. Also, treatment with MDMA for 24 h significantly increased basal Ca²⁺ levels and induced an increase in alpha-spectrin breakdown products indicating calpain and caspase 3 activation. Moreover, pretreatment with MDMA induced functional up-regulation of calcium responses to specific agonists of both heteromeric and alpha7 nAChR suggesting a nicotine-like regulatory effect.

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

La metodología empleada ha sido esencialmente la propuesta en el proyecto inicial, excepto por las contribuciones puntuales al trabajo sobre la alfa-metildopamina, el conductal con memantina y metanfetamina y el de los efectos sobre el sistema inmunitario, que se inquiben dentro de la misma temática y han derivado en sendas publicaciones. Por lo que respecta al plan de trabajo, en general se ha ajustado al propuesto en la memoria inicial, aunque se posponieron las autorradiografías para el tercer año, ya que se invirtió un tiempo en encontrar la pauta de tratamiento óptima y además se requería de la partida económica destinada a fungible de la tercera anualidad para poder adquirir los radioligandos. En su lugar, se iniciaron el segundo año los experimentos de preferencia condicionada de lugar, que estaban previstos para el tercero, y se realizó en ratones en lugar de en ratas para evitar un gasto excesivo de fármacos y poder utilizar un dispositivo más manejable.

El encontrar una pauta de tratamiento que provocara regulación al alza de receptores nicotínicos de forma reproducible ha llevado más tiempo que el previsto, lo que ha retrasado el inicio de las autorradiografías. Actualmente estamos finalizando los experimentos y seguidamente pasaremos a su cuantificación, que implica muchas horas de tratamiento informático de las imágenes. Dichos experimentos resultan de gran interés para nuestro grupo y por lo tanto nos comprometemos a finalizarlos con el material y financiación adicional de que disponemos. Obviamente informaremos al PNsD sobre los resultados y sobre las posibles publicaciones que se deriven.



OBJETIVOS PLANTEADOS : (Transcribir los del proyecto original)

A nivel receptorial

In vitro:

1. Demostrar que la MDMA activa los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ y/o potencia el efecto de agonistas nicotínicos específicos co-administrados, provocando un aumento del calcio (caso de los $\alpha 7$) o del sodio (caso de los $\alpha 4\beta 2$) intracelular. Dicho aumento debería anularse por antagonistas específicos de estos subtipos de receptores nicotínicos.
2. Determinar si el pretratamiento con MDMA incrementa la función de los receptores nicotínicos, al igual que hace la nicotina, fenómeno denominado regulación al alza funcional (*functional up-regulation*). Ello se traduciría en una mayor respuesta frente al estímulo con un agonista nicotínico. Estudiar las vías de señalización implicadas.

In vivo:

3. Investigar si la MDMA es capaz de incrementar *in vivo* la densidad de receptores nicotínicos y si este efecto es aditivo o sinérgico con la nicotina. Si así fuera, averiguar si es fruto de un incremento en el número de receptores o de modificaciones postraduccionales, al igual que está descrito para la nicotina.
4. Averiguar si el hecho de haber consumido MDMA con anterioridad potencia el incremento de actividad locomotora inducido por nicotina (efecto producido por hipersensibilidad de las vías colinérgicas de la nicotina).

Sobre la interacción con los transportadores de monoaminas

5. Demostrar *in vitro* que el bloqueo de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ puede inhibir el efecto de la MDMA sobre la funcionalidad de los transportadores de dopamina y serotonina, así como la posible nitrosilación de los mismos.
6. Demostrar que, *in vivo*, la administración de antagonistas específicos de los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ previene el aumento de la actividad motora inducido de forma aguda por MDMA. Dicho aumento es indicativo del efecto sobre la funcionalidad sobre el transportador de dopamina (liberación de dopamina por transporte reverso).

Sobre las alteraciones cognitivas

7. Determinar si las alteraciones cognitivas inducidas por la administración crónica de MDMA pueden ser prevenidas/revertidas por la administración previa de sustancias que impidan su efecto sobre los receptores nicotínicos $\alpha 7$ como el bupropión.



Sobre la adicción

8. Determinar si la adicción a MDMA se anula o atenúa en presencia de fármacos que actúan sobre receptores nicotínicos y que habitualmente se emplean en el tratamiento de deshabituación tabáquica (bupropión como antagonista $\alpha 7$ y vareniclina como agonista parcial $\alpha 4\beta 2$).

9. Valorar si el consumo de MDMA en una pauta que produzca regulación al alza funcional de receptores nicotínicos, favorecería la adicción a otras sustancias psicoestimulantes (nicotina o cocaína).

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)

In vitro

1.- Hemos demostrado que la MDMA se comporta como un agonista parcial de los receptores $\alpha 7$, induciendo una entrada de calcio que, a diferencia de la inducida por nicotina, es prolongada y puede medirse incluso después de 24 h desde su adición. Además, dicha entrada produce la activación de la calpaína y de la caspasa 3, relacionadas con procesos de citotoxicidad. Estos efectos se bloquean con antagonistas específicos $\alpha 7$ como son la metillicaconitina y la α -bungarotoxina. Por lo que respecta a los receptores $\alpha 4\beta 2$, los antagonistas específicos de estos receptores no tienen efecto sobre la entrada de Ca^{2+} inducida por MDMA (sería secundaria a la apertura de canales dependientes de voltaje) y por lo tanto podemos afirmar que la MDMA se comportaría como un antagonista de los receptores heteroméricos ya que sí bloquea el efecto de agonistas específicos. Asimismo se ha corroborado con los experimentos de entrada de sodio.

2.- El tratamiento durante 24 h con MDMA (50 μM) induce una regulación al alza funcional de los receptores tanto $\alpha 7$ como $\alpha 4\beta 2$, que se traduce en una mayor respuesta a los agonistas específicos respectivos PNU 282987 y 5-I-A-85380. Ello apuntaría a una sensibilización a la respuesta a agonistas nicotínicos como la propia nicotina y a una sensibilización a dichos efectos.



Podemos afirmar que, dados los resultados, **estos objetivos se han alcanzado en su totalidad**. Además, se han complementado con los estudios de los enantiómeros.

In vivo

3.- Hemos demostrado que la MDMA induce la regulación al alza de los receptores nicotínicos por lo que respecta a la fijación de radioligandos específicos, principalmente de los receptores heteroméricos $\alpha 4\beta 2$ y potencia en algunas áreas el efecto regulador de la nicotina si se asocian. Se han estudiado diversas pautas de administración para obtener una regulación al alza reproducible (apartado 3 del resumen) y se han puesto a punto y comenzado los estudios de autoradiografía, que se están finalizando y cuantificando. Asimismo, se ha evidenciado dicha regulación al alza a partir de los ensayos de sensibilización en ratones (apartado 3 del resumen). Los Western blots realizados con anticuerpos específicos anti- $\alpha 4$ y anti- $\alpha 7$ no detectaron incrementos en la proteína total, por lo que se puede concluir que la regulación al alza de los receptores nicotínicos inducida por MDMA se debe a cambios post-traduccionales.

Podemos decir que este objetivo está **alcanzado casi en su totalidad** ya que tal y como se ha argumentado anteriormente sólo resta terminar el marcaje autoradiográfico y cuantificar los resultados.

4, 5 y 6.- Dados unos resultados preliminares que debían ser complementados, inicialmente el objetivo se planteó a la inversa (si el hecho de haber consumido nicotina potenciaba los efectos del derivado anfetamínico y con ello su efecto adictivo) y con otro derivado anfetamínico ampliamente consumido, la metanfetamina (MA). De ello se ha demostrado que el tratamiento "crónico" con nicotina potencia el incremento de actividad locomotora inducido por MA y dicha potenciación es bloqueada por antagonistas nicotínicos $\alpha 7$ (MLA) y $\alpha 4\beta 2$ (dihidro- β -eritroidina), lo que indica que dicha sensibilización viene mediada por receptores nicotínicos.

También hemos demostrado que el hecho de haber consumido anteriormente éxtasis, en ratones, potencia muy significativamente los efectos de una nueva única dosis (ver resumen), lo que indica una sensibilización e incrementaría sus efectos reforzadores. Esta sensibilización se anula mediante el antagonista nicotínico DHBE o la vareniclina.

El objetivo 5 se ha realizado *ex vivo* (en sinaptosomas estriales de ratas tratadas) debido a que los modelos totalmente *in vitro* no proporcionaron resultados reproducibles. Se ha demostrado que el bupropion previene la inhibición del DAT producida por metanfetamina, mientras que la vareniclina no. No se ha estudiado la nitrosilación del transportador.

Por tanto, los objetivos 4, 5 han sido **alcanzados casi en su totalidad** y el 6 totalmente.



7.- El objetivo se ha **alcanzado en su totalidad**, pero utilizando **memantina** como fármaco antagonista $\alpha 7$ y metanfetamina como droga. Así, la memantina, un antagonista NMDA y $\alpha 7$ previene el deterioro cognitivo inducido por la administración de metanfetamina.

8.- El objetivo 8 **se ha alcanzado** totalmente con vareniclina y DHBE (apartado 6 del resumen). Ambas sustancias inhibieron la preferencia condicionada de lugar inducida por MDMA y, por tanto, son útiles para prevenir su adicción.

9.- El objetivo 9 no se ha trabajado por limitaciones temporales y presupuestarias, si bien queda en la lista de futuros experimentos a realizar.

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

Fruto de este proyecto ha quedado demostrado el papel que juegan los receptores nicotínicos en los efectos producidos por los derivados anfetamínicos (MDMA y MA). Concretamente se ha demostrado un efecto agonista, principalmente de la MDMA, sobre los receptores homoméricos $\alpha 7$ que estaría implicado en sus efectos neurotóxicos a corto y largo plazo. Por ello, el bloqueo de los receptores $\alpha 7$ (por ejemplo con memantina o bupropion) previene dichos efectos neurotóxicos y podría representar una nueva diana para minimizar los efectos a largo plazo del consumo de estas sustancias.

Por otra parte, independientemente de la acción antagonista de la MDMA sobre los nAChR heteroméricos, el efecto regulador de estas sustancias sobre la densidad de población de nAChR podría ser responsable de ciertos trastornos neuropsiquiátricos y en la facilitación del proceso adictivo.

Si bien cuando nos referimos a una droga de abuso, la forma más aconsejable de prevención es no consumirla, este nuevo mecanismo de acción proporcionaría nuevas estrategias para tratar o disminuir la adicción o algunos de los efectos perjudiciales que causan estas drogas.

La memantina ha mostrado resultados prometedores en el tratamiento de la adicción a anfetamina (Levi, M.S. y Borne, R.F., 2002. *Curr Med Chem* 9(20):1807-1818). Sin embargo, en la actualidad no existen fármacos aprobados en la UE o en los EEUU para el tratamiento de la adicción a MA o MDMA. El tratamiento con fluoxetina se ha recomendado como protección de la neurotoxicidad a largo plazo inducida por MDMA, pero recientemente se ha informado de que la fluoxetina reduce el aclaramiento de la MDMA y uno de sus metabolitos, la metilendioxfanfetamina, lo que se traduciría en un riesgo aumentado de los efectos tóxicos agudos de la MDMA (Upreti, V.V. y Eddington, N.D., 2008. *J. Pharm. Sci.* 2008; 97(4):1593-1605).



Hemos demostrado que la vareniclina, utilizada en la deshabituación tabáquica, **ha resultado ser útil en prevenir la adicción a MDMA** en el ensayo de preferencia condicionada de lugar en ratones, lo cual proporciona bases para pensar que podría tener una utilidad similar en humanos.

Asimismo, los tres antagonistas ensayados (DHBE, MLA y vareniclina) inhiben el efecto psicoestimulante (medido como hiperlocomoción) agudo inducido por MDMA, por la cual cosa podrían utilizarse (principalmente la vareniclina) como tratamiento de deshabituación ya que inhibirían el efecto buscado con el consumo repetido.

La MDMA se había utilizado como coadyuvante en la psicoterapia, pero sus efectos adversos llevaron a su retirada. También se ha ensayado y ha sido propuesta como fármaco para tratar trastornos de ansiedad como el estrés post-traumático, pero por los mismos motivos existe reticencia para dicho uso. La disponibilidad de un tratamiento neuroprotector frente a estos efectos (antagonismo de los nAChR $\alpha 7$) podría llevar a reconsiderar o facilitar su uso para estas aplicaciones.

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

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

Ayudas para dar soporte a grupos de Investigación (SGR). Generalitat de Catalunya (AGAUR). I.P. David Pubill Sánchez. Importe: 45560 euros. Periodo: 2009-2013.

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

Como puede observarse, se trata de un proyecto que, a nuestro entender muestra un adecuado equilibrio y coherencia entre subvención otorgada, personal implicado y cumplimiento de objetivos/resultados obtenidos. Fruto de esta investigación se ha descubierto y caracterizado un nuevo mecanismo de acción para los derivados anfetamínicos, principalmente el éxtasis, uno de los más consumidos. Este mecanismo explicaría, junto con los ya descritos, sus efectos neurotóxicos y sobre la adicción.

Esta subvención también nos ha permitido incorporar al grupo una becaria que ha realizado la tesis doctoral y que, tras su finalización, obtuvo un contrato para realizar una estancia post-doctoral en el extranjero. Ello llevó a otorgar el resto de beca del



último año a un nuevo becario (Raúl López) que se incorporó al grupo y que ahora continúa trabajando con nosotros gracias a la financiación autonómica de que disponemos. Ello ya se ha reflejado en la memoria económica.

Si bien ya se han derivado un número aceptable de publicaciones de este proyecto, prevemos que con los resultados que tenemos en nuestro poder pueden todavía derivarse de dos a tres más (autoradiografías, sensibilización y adicción). Tal y como se ha comentado anteriormente, ponemos de manifiesto nuestro compromiso de componerlas y someterlas para publicación, así como de informar al PNsd del proceso.

La experiencia y productividad adquirida por el grupo en esta investigación nos ha permitido obtener una nueva subvención del PNsd para continuar la investigación con nuevos derivados anfetamínicos que están irrumpiendo con tremenda fuerza en el mercado de las drogas de abuso (beta-cetoanfetaminas). Dicha temática presenta unas perspectivas y repercusión sociosanitaria enormes y consideramos que merece que se le dedique esfuerzo y financiación.

La todavía vigencia del presente proyecto durante la convocatoria de ayudas del 2011 fue un impedimento para la consideración de uno nuevo que había presentado como Investigador Principal, si bien ya habría finalizado al inicio del nuevo. Esta limitación supone un parón forzoso en la continuidad de las investigaciones hasta la siguiente convocatoria. Comprendemos que debe existir un mecanismo que permita evaluar los proyectos concedidos con anterioridad, previamente a conceder de nuevos, para evitar subvencionar grupos que hayan incumplido con sus deberes. No atreveríamos a proponer una concesión condicional a la evaluación positiva del informe final del proyecto anterior, para evitar dicha interrupción de un año. Desearíamos que estas consideraciones fueran tenidas en cuenta en próximas convocatorias.

Por lo demás, agradecemos plenamente al PNsd la confianza depositada en nuestro grupo y la financiación otorgada, ya que proporciona un espacio específico para la investigación en drogas y drogodependencias, para la cual es cada vez más difícil obtener financiación de otras fuentes.

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

En Barcelona, a 23 de Enero de 2012

FIRMA

Dr. David Pubill Sánchez

