



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD      2ª ANUALIDAD      3ª ANUALIDAD      FINAL **X**

Nº Expediente: **2011-014**

Investigador principal: Javier Garzón Niño

Otros investigadores: Pilar Sánchez Blázquez  
María Rodríguez Muñoz  
Esther Berrocoso Domínguez  
Concha Bailón Prieto

Título del Proyecto o subproyecto: Policonsumo de Drogas Asociado al Trastorno Mental Maniaco.  
Bases Biológicas e Implicaciones Terapéuticas.

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

Organismo: Agencia Estatal Consejo Superior Investigaciones Científicas

Centro: Instituto Cajal

Departamento: Neurobiología Molecular, Celular y Desarrollo

Área temática: **Determinantes Biológicos del policonsumo de drogas**

Palabras clave: Trastorno bipolar, Psicosis, Receptores G, Receptor NMDA, cocaína, cannabis.

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

En la predisposición al consumo de drogas se han descrito diversos factores genéticos que confieren una mayor vulnerabilidad en las adicciones. Específicamente, se observa una alta prevalencia de conductas adictivas en pacientes diagnosticados de desorden bipolar. Se postula que la base de esta comorbilidad se encuentra en las alteraciones patológicas del sustrato neurobiológico de estos individuos que eventualmente conducen a la adicción o/y a la enfermedad mental. En base a estas premisas el presente estudio profundiza en la caracterización de la proteína HINT1 como regulador funcional del receptor de glutamato tipo NMDA, al tiempo que analiza las alteraciones funcionales y moleculares presentes en ratones deficientes en la proteína HINT1 y su repercusión en la susceptibilidad a drogas



psicoestimulantes.

El estudio se realizó sobre ratones macho de la cepas CD1, 129svj (wild-type para HINT1<sup>+/+</sup>), animales deficientes en la proteína HINT1 (129svj HINT1<sup>-/-</sup>), y ratones Black Swiss que presentan conductas asimilables a la manía de humanos (adquiridos a Taconic, USA). Los animales se alojaron en las instalaciones del Instituto Cajal (número de registro 28079-31-A), bajo las condiciones legales vigentes. Durante el curso del proyecto, se ha procedido a la caracterización fenotípica de estos animales mediante resonancia magnética y la evaluación de una serie de parámetros comportamentales como son: la actividad espontánea, el grado de preferencia luz/oscuridad, el tiempo de inmovilidad en la natación forzada, la sensibilidad a psicoestimulantes (anfetamina, apomorfina), la preferencia a sacarina y el grado de agresividad en el modelo de residente/intruso. Los datos recogidos se han analizado mediante SigmaStat (SPSS Science, Erkrath, Germany), habitualmente ANOVA y el test Student-Newman-Keuls para la comparación de medias,  $p < 0,05$ . Los resultados obtenidos los podemos resumir en los siguientes puntos: **i)** los ratones 129svj HINT1<sup>-/-</sup> y Black Swiss presentan una conducta ansiolítica, con un mayor grado de exploración en un ambiente novedoso y mayor tiempo de estancia en la zona central del campo abierto y/o en la zona iluminada. **ii)** ambos grupos de ratones muestran una serie de conductas tipo maniaco (mayor agresividad, un incremento en la preferencia a sacarina, menor tiempo de inmovilidad en la natación forzada), que son atenuadas por la administración de estabilizadores de ánimo (litio, valproato), pero no por fármacos antidepresivos. Por tanto, podemos concluir que la carencia en la proteína HINT1 se manifiesta como fenotipo maniaco, por lo que estos animales constituyen un modelo para la detección de fármacos antimaníacos e incluso para el estudio de las bases moleculares de esta patología psiquiátrica.

Por otra parte, **iii)** los ratones HINT1<sup>-/-</sup> son hipersensibles a la anfetamina a la que responden con hiperactividad motora, un efecto asociado a una alteración en la transmisión dopaminérgica postsináptica, **iv)** sin embargo en estos ratones la nicotina presenta una pobre capacidad adictiva. La transmisión dopaminérgica tiene un papel relevante en la respuesta/refuerzo al consumo de nicotina por lo que la alteración de esta neurotransmisión en los animales HINT1<sup>-/-</sup> podría justificar esta observación, **v)** finalmente, ya que los síntomas de la adicción se asocian a las disfunciones cognitivas y sociales, se están evaluando los animales para determinar su nivel de aprendizaje/retención (aprendizaje evitación pasiva) y su sociabilidad. En este punto, hemos observado un alto nivel de aprendizaje y un menor grado de sociabilidad, lo cual concuerda con su mayor tendencia a un comportamiento agresivo. Diversas publicaciones recogen gran parte de la caracterización fenotípica realizada en los diferentes grupos de animales (*Curr Drug Abuse Rev.* 5:199-226, 2012; *European J. Pharmacol.* 2013; *Front Pharmacol.* 2014; *Neuropharmacology* 2014). El estudio comportamental se encuentra en su fase final y estamos elaborando el manuscrito que será enviado para su evaluación.

A nivel molecular hemos profundizado en el estudio de la conexión HINT1 con receptores, tanto acoplados a proteínas G como de glutamato tipo NMDA, y otras moléculas de señalización. Los resultados de la investigación demuestran que la proteína HINT1 se asocia a diferentes RAPG (MOR, CB1R, 5HT1AR, 5HT2AR, D2R) y es esencial para mantener la conexión/regulación entre estos receptores y el NMDAR (*Antioxidants and Redox Signaling* 19:1766, 2013). Por tanto, en ausencia de HINT1 la señalización mediada por los RAPG está desregulada. En concreto, en el caso del MOR hay una supersensibilización al agonista, su activación conlleva una profunda tolerancia opioide que no está regulada por el receptor glutamatérgico NMDA (*European J.*



*Pharmacol*, 2013), y proporcionan la base molecular que explica los efectos contrapuestos de MOR y NMDAR en el control del dolor (*Curr Drug Abuse Rev*. 5:199-226, 2012). Por otra parte, en este estudio hemos demostrado la importancia de la señalización Redox dependiente del metabolismo del zinc en los efectos de una gran variedad de RAPGs. Así, la activación de los diferentes receptores evaluados (MOR, CB1R, 5HT1AR, 5HT2AR, D2R) induce la liberación de zinc desde la proteína RGSZ2, vía un mecanismo dependiente de nNOS/NO e implicando a la cascada PI3K/Akt. Dado que el zinc ha sido relacionado con depresión este hallazgo abre nuevas posibilidades al estudio de una posible conexión alrededor del zinc entre RAPG, NMDAR y depresión.

Como índice del grado de actividad del receptor NMDA hemos utilizado varios indicadores: i) en primer lugar hemos determinado la liberación de zinc inducida por agonistas de RAPG/NMDAR en rodajas de cerebro de animales HINT1<sup>-/-</sup> y HINT1<sup>+/+</sup>. Además del propio NMDA, diversos agonistas del receptor dopaminérgico, serotoninérgico, cannabinoide y opioide son capaces de producir un aumento en la liberación de zinc que es similar en ambos grupos de ratones. Sin embargo, únicamente los agonistas del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) son capaces de reducir de forma significativa los efectos producidos por la activación del NMDAR en animales HINT1<sup>+/+</sup>, pero no en los HINT1<sup>-/-</sup>. Los receptores NMDA están claramente implicados en diferentes patologías psiquiátricas, particularmente depresión, esquizofrenia, y trastorno bipolar, por lo que por su interés hemos dedicado más tiempo del proyecto que el inicialmente estimado al estudio del control negativo de la función NMDAR por el receptor CB1. Así, hemos descubierto nuevos aspectos del control que ejercen los cannabinoides sobre la función del NMDAR y su implicación en estados psicóticos y esquizofrénicos (*Front Pharmacol* 2014). Nuestros resultados confirman el papel del receptor CB1 como regulador negativo de la función NMDAR protegiendo a las células de daño excitotóxico, al tiempo que ponen en evidencia la necesidad de la proteína HINT1 para mantener esta regulación. De hecho en ratones deficientes en la proteína HINT1 la regulación cruzada entre el RAPG, particularmente el CB1R, con el NMDAR es prácticamente inexistente (*Antioxid Redox Signal*. 2013; *Mol Brain* 2013). En ausencia de activación, los RAPG y la proteína HINT1 colaboran para reducir la actividad del NMDAR. La mayoría de RAPG al ser activados por agonistas promueven vía PKC y Src la respuesta del NMDAR. Sin embargo, el receptor CB1 mantiene el control negativo sobre la función del NMDAR y protege las neuronas frente a la excitotoxicidad producida por glutamato (*Mol Brain* 2013). Estos hallazgos sobre el mecanismo que acopla al CB1 con el de NMDA proporcionan la base de la psicosis cannabica y podría explicar que en ciertos individuos con predisposición el consumo de estas sustancias de lugar o precipitar esquizofrenia (*Antioxid Redox Signal*. 2013; *Frontiers Pharmacol*. 2013; *Int J Neuropsychopharmacology*. 2014). Nuestra propuesta ha sido bien recibida y se le ha dedicado un editorial en el número en el que se publica (*Int J Neuropsychopharmacology*, 17:1911, 2014), así como en notas de prensa de nuestra Institución el CSIC (se adjuntan).

La base mecanística/molecular a estas observaciones la hemos obtenido empleando la técnica de la co-immunoprecipitación, que está descrita en el apartado de metodologías dentro de la solicitud y se ha complementado con el estudio de las interacciones/asociaciones entre proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que en corteza frontal y otras áreas del cerebro además del CB1, la asociación física y funcional entre RAPG y NMDAR depende de la proteína HINT1. Este parte de la investigación se recoge en artículos como (*Antioxid Redox Signal*. 2013; *Mol Neurobiol*. 2013) y un artículo metodológico que nos fue solicitado por la editorial Springer (*Methods Mol Biol*, 2014). Por tanto, hemos descubierto que la



proteína HINT1 es esencial para mantener la conexión entre los RAPG y el receptor NMDA, y entre los RAPG estudiados el cannabinoide CB1 es especial ya que es el único que regula negativamente al receptor NMDA.

Finalmente, otro aspecto relevante de nuestro estudio ha sido demostrar que el control CB1 sobre el NMDAR está regulado por el receptor sigma 1 ( $\sigma$ 1R). Así, los antagonistas del  $\sigma$ 1R liberan la función del receptor NMDA del control negativo del CB1. Este mecanismo operaría únicamente si hubiese riesgo de producirse una hipofunción NMDAR, como la que parece subyacer en esquizofrenia (*Int J Neuropsychopharmacol.* 2014; *Antiox Redox Signal.* 2015). Esto se debe a que la asociación del  $\sigma$ 1R con la subunidad NR1 del receptor NMDA se refuerza con calcio y así ayuda a acoplarse el NMDAR al CB1-HINT1. Un descenso acusado en la permeación de calcio debilita la asociación  $\sigma$ 1R-NR1 permitiendo entonces que los antagonistas del  $\sigma$ 1R lo saquen del NMDAR. En ausencia del  $\sigma$ 1R se aborta la posibilidad de asociación del NMDAR con el CB1. Así mismo, en ausencia de HINT1 esta relación CB1-NMDAR también fracasa, lo que abre la posibilidad de actuar también sobre esta proteína a fin de evitar o revertir al problema de la hipofunción NMDAR causada por cannabinoides. Por tanto,  $\sigma$ 1R y HINT1 son esenciales en la conexión CB1-NMDAR y pudieran constituir no solo el mecanismo de acoplamiento de ambos receptores cuando una función NMDAR excesiva lo requiera, sino también el que los desacople cuando sea preciso. En este punto conviene recordar que ciertos neuroesteroides ejercen efectos agonistas y antagonistas sobre el  $\sigma$ 1R, y por tanto pudieran ser sus ligandos endógenos. Estos hallazgos proporcionan la base para comprender como en determinadas circunstancias un control excesivo por el CB1R puede conducir a una hipofunción NMDAR que puede manifestarse con síntomas psicóticos en individuos vulnerables.

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

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

GARZÓN, J., RODRÍGUEZ-MUÑOZ, M., SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ, P.: "Direct association of Mu-opioid and NMDA glutamate receptors supports their cross-regulation: molecular implications for opioid tolerance" *Current Drugs Abuse Reviews* 5(3):199-226 (2012). Doi: 10.2174/1874473711205030199.

SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, BERROCOSO E, GARZÓN J. The plasticity of the association between mu-opioid receptor and glutamate ionotropic receptor N in opioid analgesic tolerance and neuropathic pain. *Eur J Pharmacol.* 716(1-3):94-105 (2013). Doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.066.

SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, VICENTE-SÁNCHEZ A, GARZÓN J. Cannabinoid Receptors Couple to NMDA Receptors to Reduce the Production of NO and the Mobilization of Zinc Induced by Glutamate. *Antioxid Redox Signal.* 19(15):1766-82 (2013). Doi: 10.1089/ars.2012.5100.

RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, GARZÓN J. Nitric Oxide and Zinc-Mediated Protein Assemblies Involved in Mu Opioid Receptor Signaling. *Mol Neurobiol.* 48(3):769-82 (2013). Doi:



10.1007/s12035-013-8465-z.

VICENTE-SÁNCHEZ A, SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, GARZÓN J. HINT1 protein cooperates with cannabinoid 1 receptor to negatively regulate glutamate NMDA receptor activity. *Mol. Brain* 2013; 6:42 (2013). Doi: 10.1186/1756-6606-6-42.

SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, GARZÓN J. The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction: implications in psychosis and schizophrenia. *Front Pharmacol.* 4:169 (1-10) (2014). Doi: 10.3389/fphar.2013.00169.

SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, HERRERO-LABRADOR R, BURGUEÑO J, ZAMANILLO D, GARZÓN J. The calcium-sensitive Sigma-1 receptor prevents cannabinoids from provoking glutamate NMDA receptor hypofunction: implications in antinociception and psychotic diseases. *Int J Neuropsychopharmacol* 17(12):1943-1955 (2014). Doi: 10.1017/S1461145714000029.

RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, BAILÓN C, GARZÓN J. Detecting zinc release induced by mu-opioid receptor agonists in brain slices. *Methods Mol Biol.* 1230:233-241 (2014). Doi: 10.1007/978-1-4939-1708-2\_19.

GARZÓN J, HERRERO-LABRADOR R, RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, SHAH R, VICENTE-SÁNCHEZ A, WAGNER CR, SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P. HINT1 protein: A new therapeutic target to enhance opioid antinociception and block mechanical allodynia. *Neuropharmacology* 89:412-423 (2015). Doi:10.1016/j.neuropharm. 2014.10.022.

RODRÍGUEZ-MUÑOZ M,, SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P, HERRERO-LABRADOR R, MARTINEZ-MURILLO R, MERLOS M, VELA JM, GARZON J. The  $\sigma$ 1 receptor engages the redox-regulated HINT1 protein to bring opioid analgesia under NMDA receptor negative control. *Antioxid Redox Signal*, 22:799-818 (2015). Doi: 10.1089/ars.2014.5993.

## OBJETIVOS

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

1. Determinar en ratones Black Swiss y 129svj HINT1 (-/-) los parámetros asociados a la manía mediante la batería de test estándar a tal efecto (ver Métodos). La mayor sensibilidad a psicoestimulantes (anfetamina, apomorfina, cocaína, etc.) se verificará mediante su administración a estos animales y valoración en test de actividad motora. Igualmente se procederá a estudiar el grado de propensión al consumo de alcohol y nicotina.

2. Se determinará si fármacos eficaces en reducir signos de manía en Black Swiss lo hacen en el ratón 129svj HINT1 (-/-) y si su efecto es también positivo reduciendo la sensibilidad a psicoestimulantes y la búsqueda de la droga. La eficacia de los anti-maníacos o estabilizadores del ánimo, litio y vapórate, se valorará frente a antidepresivos/anti psicóticos. En este apartado se prestará especial atención a la inhibición de PKC.

3. Aspectos moleculares/substrato biológico. Se determinarán las alteraciones moleculares en la corteza pre-frontal, tálamo y estriado de los ratones 129svj HINT1 (-/-) y Black Swiss en lo relativo a presencia de las proteínas correspondientes y RT-PCR de sus ARNm. Concretamente se



estudiará la presencia y funcionalidad de isoformas PKC convencionales  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II, y  $\gamma$  (las reguladas por HINT1); el estado de la vía Akt/GSK3 $\alpha$ / $\beta$  mediante niveles y fosforilaciones de activación e inactivación de estas cinasas, la activación de receptores de glutamato NMDA mediante estudio de fosforilación de subunidades, y la activación de algunos de sus efectores como PKA/CaMKII y calcineurina/PP1/GSK3 $\beta$ .

4. Los parámetros biológicos que se encuentren alterados en estos animales modelo de Manía se estudiarán tras la exposición a las diferentes drogas así como el efecto que sobre estas alteraciones puedan tener los tratamientos farmacológicos afectivos y fallidos en reducir los síntomas de manía/consumo de drogas.

5. En línea con lo observado para receptores metabotrópicos dopamina D1, glutamatérgico mGlu5a y opioide Mu, se determinará la posible asociación del dopamina D2 con el NMDAR así como la regulación existente entre ambos. Asimismo, se estudiará la asociación entre D1/D2 con la GSK3 $\alpha$ / $\beta$  a la que ambos receptores regulan y cuya función se relaciona con diferentes alteraciones anímicas. Los receptores D1 y D2 están implicados en las vías de refuerzo positivo y por tanto participan de la búsqueda de satisfacción mediante el consumo de psicoestimulantes. Por tanto, es lógico esperar que su función/regulación se encuentre alterada en la base biológica de la manía dando lugar a la propensión a la drogadicción que se describe en estos enfermos.

**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).

1.- Hemos realizado la caracterización fenotípica de los ratones 129svj HINT1<sup>-/-</sup> en relación con sus correspondientes animales *wild type* (WT) y los ratones Black Swiss (importados de Taconic, USA) que se han descrito como modelo de manía. Los resultados obtenidos permiten concluir que los ratones deficientes en la proteína HINT1 son un modelo válido para el estudio de esta patología psiquiátrica. Por otra parte, se ha evaluado la sensibilidad a psicoestimulantes, y el grado de propensión al consumo de drogas, particularmente nicotina. Además, se ha estudiado el efecto producido por cannabinoides en diferentes aproximaciones experimentales, *in vivo* (animal), nivel celular (cultivos neuronales) e *in vitro* (interacciones entre CB1-HINT1-NMDAR).

2.- Se han seleccionado una batería de pruebas tipo (natación forzada, preferencia a sacarina y sensibilidad a psicoestimulantes) para estudiar el efecto de diferentes grupos de sustancias: i) estabilizadores del ánimo como el litio (100 y 200 mg/Kg) y el valproato (100 y 300 mg/kg); ii) inhibidores de PKC (Gö7874 y chelerritrina) y iii) fármacos antidepresivos (citalopran, imipramina, fluoxetina). Los resultados obtenidos en este apartado indican que los animales 129svj HINT1<sup>-/-</sup> muestran conductas tipo maniaco, que se atenúan por compuestos de uso en clínica como litio, valproato, pero no por fármacos antidepresivos. La administración de inhibidores de PKC (por vía periférica y central) fue efectiva para revertir los síntomas de la manía en los 129svj HINT1<sup>-/-</sup> pero no en los Black Swiss. Este perfil de los inhibidores de PKC concuerda con datos clínicos sobre la



eficacia terapéutica de compuestos inhibidores de PKC en la fase maníaca del trastorno bipolar. Por tanto, el comportamiento tipo manía del ratón 129svj HINT1<sup>-/-</sup> podría alternarse con fases tipo depresivo como sucede en el trastorno bipolar humano. Esta posibilidad y sus desencadenantes son objeto de nuestro estudio.

3.- A nivel molecular se han determinado mediante western-blot/PCR los niveles de PKC, PKA, GSK3 y CAMKII. No se han detectado diferencias significativas en los niveles de estas proteínas, aunque si en el grado de fosforilación y/o en su funcionalidad. En concreto se ha determinado la actividad de PKC y calcineurina en muestras procedentes de cerebro de ratones encontrándose una actividad incrementada asociada con la conducta maniaca (129svj HINT1<sup>-/-</sup> > Black Swiss > 129svj HINT1<sup>+/+</sup>). Tras la evaluación de los niveles basales de proteínas de señalización, hemos analizado el papel de HINT1 en la regulación del estado funcional del receptor NMDA. Nuestros resultados ponen de manifiesto el papel esencial de la proteína HINT1 como controlador negativo de la función NMDAR en diferentes modelos experimentales. Así mismo, demostramos que el control que ejerce el receptor cannabinoide CB1 está regulado por la proteína HINT1, de forma que en determinadas circunstancias su desregulación puede causar una hipofunción descontrolada del NMDAR que precipite un cuadro psicótico.

4.- En los animales 129svj HINT1<sup>-/-</sup> los parámetros bioquímicos (actividad PKC, calcineurina, movilización de zinc) y moleculares (fosforilación de proteínas) que se encuentran alterados volvieron a valores de los controles 129svj HINT1<sup>+/+</sup> con fármacos que fueron eficaces como antimaníacos.

5.- Parte del desarrollo de este objetivo ha sido permutado por los estudios en los que hemos caracterizado el mecanismo molecular de regulación negativa ejercida por los cannabinoides vía receptor CB1 sobre el receptor NMDAR. Estudio que es ciertamente relevante a la producción de psicosis cannabica y a la precipitación de esquizofrenia. Esperamos poder completar esta parte con la concesión de un nuevo proyecto del Plan de drogas que ha sido solicitado por un miembro de este equipo investigador. No obstante, hemos avanzado en este objetivo demostrando la asociación del receptor dopaminérgico D2 y del cannabinoide CB1, con el NMDAR en membranas procedentes del cerebro de ratón (inmunoprecipitación e inmunodetección) empleando los anticuerpos (IgGs biotinadas anti-NR1, anti-D2R, anti-CB1R). Además, y de forma análoga a lo descrito para el receptor opioide mu hemos demostrado que existe una estrecha asociación entre estos receptores, el NMDAR, la GSK3 y la proteína HINT1.

#### METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

##### PROYECTADO:

La metodología incluía:

1.- Estudios comportamentales para el fenotipaje de los diferentes grupos experimentales y la evaluación farmacológica de los tratamientos seleccionados.



2.- Análisis molecular empleando técnicas de inmunodetección (niveles de expresión de proteínas por western blot), inmunoprecipitación (asociación entre proteínas), y PCR (niveles de mensajeros).

**EJECUTADO:**

Además de las metodologías propuestas en la Memoria, se han incluido técnicas bioquímicas para la valoración de actividad PKC, PKA y calcineurina. Esta aproximación es complementaria a las propuestas y nos informa no solo de los niveles de estas proteínas sino que son un índice de su estado funcional.

**ACTIVIDADES**

**PROYECTADAS:**

Publicación en revistas Científicas

Presentación en Congresos

**EJECUTADAS:**

**Publicación en revistas Científicas.** 10 artículos publicados y 1 manuscrito en revisión.

**Presentación en Congresos.**

HIT Meeting Switzerland, Junio 2012

EPHAR Meeting, Granada Julio 2012

SFRRI Meeting, Londres Septiembre 2012

XXXIV Congreso SEF, Murcia Septiembre 2013

XXXVII Congreso SEBBM, Granada Septiembre 2014

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

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

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

El proyecto propuesto es un estudio preclínico con un claro componente de aplicabilidad en el área de la salud. Durante este periodo hemos analizado el papel de la proteína HINT1 y los cannabinoides en el estado funcional del NMDAR. Los resultados del estudio ponen de manifiesto la participación de la proteína HINT1 en la funcionalidad del NMDAR, de forma que su ausencia conlleva la aparición de un fenotipo de manía en los ratones y una mayor sensibilidad a drogas psicoestimulantes. Además, hemos demostrado que en determinadas circunstancias la



función NMDAR puede estar desregulada y causar hipofunción glutamatérgica similar a la que acompaña a los cuadros psicóticos. En este mecanismo participa el control inhibitorio ejercido por los agonistas cannabinoides sobre el NMDAR, destacando el papel esencial de la proteína HINT1 para mantener la conexión entre ambos receptores. Así, una disfunción de HINT1 y/o el abuso de cannabis, desplazaría el delicado equilibrio que ejercen los endocannabinoides para controlar la funcionalidad del NMDAR sin que se comprometa la supervivencia celular. Una inhibición exagerada del NMDAR como consecuencia del consumo recreacional y/o abusivo de cannabis produciría un cuadro psicótico más o menos graves asociados a una búsqueda exagerada de placer/recompensa conduciría al consumo de psicoestimulantes. Consideramos que nuestra investigación aporta un nuevo enfoque en el estudio de la vulnerabilidad al consumo de drogas al tiempo que aporta nuevas dianas terapéuticas / biomarcadores, que pueden ser eficaces en el tratamiento y prevención de este tipo de consumo.

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

Jornadas “Drogas y enfermedad mental” (2013).

Publicación en la Web del CSIC de una nota sobre nuestros estudios con cannabinoides y psicosis/esquizofrenia. Nota que se difundió a agencias de noticias y prensa médica especializada tanto nacional como hispanoamericana.

**Conferencia Invitada** “*El complejo proteína HINT1-receptor sigma 1 acopla al receptor cannabinoide 1 al del glutamato NMDA para reducir su función: implicaciones en psicosis*” en las XLII Jornadas Nacionales Socidrogalcohol, dentro de la Sesión: Sistema cannabinoide desarrollo cerebral y psicosis (Logroño, Marzo 2015).

**Entrevistas/Prensa**

<http://www.gacetamedica.com/noticias-medicina/2014-05-23/especializada/el-cannabis-provoca-excesiva-inhibicion-del-sistema-nmdar/pagina.aspx?idart=838010>

<http://www.medciencia.com/descubren-por-que-la-marihuana-puede-producir-esquizofrenia>

<http://psicologiymente.net/investigacion-revela-por-que-la-marihuana-puede-causar-esquizofrenia/>

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

Hemos iniciado una colaboración con el grupo del Prof. Carston R Wagner (Medicinal Chemistry, University of Minnesota, Minneapolis, USA) que nos permitirá disponer de substratos sintéticos e inhibidores de la actividad enzimática del HINT1 potencialmente utilizables.

Fruto de esta colaboración es la publicación: GARZÓN J, HERRERO-LABRADOR R, RODRÍGUEZ-MUÑOZ M, SHAH R, VICENTE-SÁNCHEZ A, WAGNER CR, SÁNCHEZ-BLÁZQUEZ P. HINT1 protein: A new therapeutic target to enhance opioid antinociception and block mechanical allodynia. *Neuropharmacology* 89:412-423 (2015).  
Doi:10.1016/j.neuropharm. 2014.10.022.

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

Para la realización del proyecto de referencia no se ha obtenido financiación concurrente para la



misma finalidad de otra agencia pública o privada

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

-----

**OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR**

Consideramos que nuestro estudio ha sido productivo no solo en número de publicaciones sino también y quizás más relevante en lo relativo a proporcionar conocimiento de cómo el abuso de cannabis fumado puede conducir a psicosis y eventualmente precipitar esquizofrenia en individuos con cierta predisposición o vulnerabilidad. No somos ajenos a la potencialidad de ciertos derivados de los cannabinoides en el tratamiento de enfermedades, por lo que nuestro hallazgo debería servir para prevenir estos riesgos al tiempo que se avanza en su utilización terapéutica.

Otro aspecto también importante es la identificación de ciertos parámetros bioquímicos como subyacentes a comportamientos maníacos. Además, nuestros estudios indican que el ratón deficiente en HINT1 pudiera constituir un modelo de síndrome bipolar que sirviese para la detección de fármacos útiles al tratamiento en humanos y quizás también sirviera para avanzar en el conocimiento de la base fisiológica/bioquímica de este trastorno.

En esta fecha se remite también por correo electrónico a la dirección [pndinvestigacion@msssi.es](mailto:pndinvestigacion@msssi.es) la presente memoria.

En Madrid a 27 de Noviembre de 2014

**NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL**

**Javier Garzón Niño**