



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DEL RECEPTOR 5HT_{2A} Y
DE LA VÍA AKT/GSK3 COMO
MECANISMOS MOLECULARES DE
LA PSICOSIS INDUCIDA POR EL
CONSUMO CRÓNICO DE CANNABIS**

Alumno/a: *Ibarra Lecue, Inés*

Fecha: *Septiembre 2014*

Profesor/a Director/a
Dr./a. Leyre Urigüen

Referencia

Curso Académico
2013/2014

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LA ESQUIZOFRENIA EN EL CONTEXTO SOCIAL ACTUAL	1
1.2. EL PAPEL DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5HT_{2A} EN LA ESQUIZOFRENIA	2
1.3. LA RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE CANNABIS Y LA ESQUIZOFRENIA	3
1.4. EL GENOTIPO AKT1 Y EL DESARROLLO DE LA ESQUIZOFRENIA EN CONSUMIDORES DE CANNABIS.....	5
2. OBJETIVOS	7
2.1. OBJETIVO GENERAL	7
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. DESARROLLO	8
3.1. TRATAMIENTO CRÓNICO DE RATONES JÓVENES CON THC..	8
3.2. EVALUACIÓN DEL ESTADO COMPORTAMENTAL Y DE LA FUNCIONALIDAD <i>IN VIVO</i> DEL RECEPTOR 5HT_{2A}.....	9
3.2.1. Inhibición prepulso del reflejo de la respuesta del sobresalto (PPI)	9
3.2.1.1. Parámetros.....	10
3.2.1.2. Equipo	10
3.2.1.3. Procedimiento del ensayo	11
3.2.1.4. Análisis estadístico de los resultados.....	12
3.2.2. Respuesta <i>head-twitch</i> (HTR) de funcionalidad <i>in vivo</i> del receptor 5HT_{2A}	13
3.2.2.1. Procedimiento.....	13
3.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE 5HT_{2A} Y AKT/GSK3 MEDIANTE <i>WESTERN BLOTTING</i>	13
3.3.1. Preparación del tejido: homogeneizado total de corteza de cerebro de ratón.....	14
3.3.2. Determinación del contenido proteico. Método DC	14
3.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida	15
3.3.4. Transferencia a membranas de nitrocelulosa	16
3.3.5. Inmunodetección.....	17
3.3.6. Análisis estadístico de los resultados	18
4. RESULTADOS	19

4.1. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN PREPULSO DE LA RESPUESTA DE SOBRESALTO (<i>PrePulse Inhibition of Startle Reflex</i>, PPI).	19
4.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PSICÓTICA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE (±) DOI: RESPUESTA DE <i>HEAD TWITCH</i>	21
4.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOT</i>	22
4.3.1. Receptor serotoninérgico 5-HT_{2A}	22
4.3.2. Proteína de señalización Akt en su forma fosforilada (Ser473)	23
4.3.3. Proteína de señalización Akt total	24
4.3.4. Proteína de señalización GSK3 (isoforma β) en su forma fosforilada (Ser9)	24
4.3.5. Proteína de señalización GSK3 (isoforma β) total	25
4.3.6. Proteína ribosomal S6 en su forma fosforilada (Ser240-244)	25
4.3.7. Proteína ribosomal S6 total	26
5. DISCUSIÓN	27
5.1. EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL	27
5.1.1. Inhibición prepulso de la respuesta de sobresalto (<i>PrePulse Inhibition of Startle Reflex</i>, PPI)	27
5.1.2. Respuesta de <i>head twitch</i>	29
5.2. EVALUACIÓN NEUROQUÍMICA <i>IN VITRO</i>	31
6. CONCLUSIONES	37
7. BIBLIOGRAFÍA	38

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ESQUIZOFRENIA EN EL CONTEXTO SOCIAL ACTUAL

La esquizofrenia es una enfermedad mental de carácter crónico que afecta aproximadamente al 1% de la población, principalmente con edades comprendidas entre los 15 y 45 años. Se trata de una enfermedad de inicio en la adolescencia o comienzo de la madurez y cuyo potencial discapacitante persiste y se agrava a lo largo de la vida. La etiología de la esquizofrenia es multifactorial con evidencias de factores genéticos y ambientales. El carácter hereditario de la esquizofrenia se ha estimado en un 73-90% y los factores genéticos que predisponen a la enfermedad son múltiples y heterogéneos. Los estudios epidemiológicos parecen sugerir que el mayor riesgo de desarrollar esquizofrenia es producto de interacciones genético/ambientales (predisposición genética a agresiones ambientales) y del fenómeno de epistasia (fenotipo dependiente de la interacción entre diversos genes). Las manifestaciones clínicas de la esquizofrenia se dividen en síntomas positivos, síntomas negativos y déficits cognitivos.

A causa de los déficits asociados y de su carácter crónico, la esquizofrenia se encuentra entre las diez causas principales de discapacidad por enfermedad del mundo y según la World Health Organization (2001), se estima que es la quinta enfermedad más costosa para la sociedad en términos de atención requerida y pérdida de productividad, con un coste anual en la Unión Europea que supera los 35 mil millones de €, según Andlin-Sobocki y Rössler (2005). A nivel nacional, en el año 2009 los antipsicóticos atípicos más empleados (risperidona y olanzapina) se encontraron entre los 8 primeros fármacos que más gasto generaron, con un coste económico superior a 350 millones de euros (Sistema Nacional de Salud (2010)). Además, según el estudio de Palmer *et al.* (2005), el riesgo de muerte prematura en la población esquizofrénica es aproximadamente dos veces mayor en la población general, siendo el suicidio la principal causa de este exceso de mortalidad, con una prevalencia estimada entre 5-10%. En este sentido, se ha estimado que entre el 25% y 50% de los pacientes con esquizofrenia cometen por lo menos un intento de suicidio en su vida, según el estudio llevado a cabo por Meltzer (2002). Dada su prevalencia, la tendencia a la cronicidad y el riesgo suicida de pacientes con

esquizofrenia así como los elevados costes socio-sanitarios, la investigación de esta enfermedad es un objetivo prioritario de los sistemas de salud mundiales.

1.2. EL PAPEL DEL RECEPTOR DE SEROTONINA 5HT_{2A} EN LA ESQUIZOFRENIA

Estudios recientes llevados a cabo por Vollenweider *et al.* (1998), Gonzalez-Maeso *et al.* (2007) y Geyer y Vollenweider (2008) han demostrado que las dos clases principales de alucinógenos psicodélicos, las indolaminas (LSD, psilocibina) y las feniletilaminas (mescalina) inducen sintomatología similar a la esquizofrenia de tipo paranoide a través de la activación de los receptores de serotonina 5HT_{2A}. El receptor de serotonina 5HT_{2A} pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Los agonistas 5HT_{2A} no alucinógenos señalizan a través de la vía canónica activando proteínas Gq/11 e inducen el factor de transcripción c-fos mientras que los agonistas 5HT_{2A} alucinógenos lo hacen tanto a través de la vía canónica como mediante la activación de proteínas Gi/o, induciendo los factores de transcripción c-fos y egr-2. Marek *et al.* (2001) han propuesto que el potencial alucinógeno del LSD y análogos tendría lugar sobre los receptores de serotonina 5HT_{2A} presinápticos presentes en neuronas tálamo-corticales. Sin embargo, estudios de Gonzalez-Maeso *et al.* (2007), Puig *et al.* (2003) y Beique *et al.* (2007) de huella transcriptómica, de expresión y anulación selectiva de los receptores 5HT_{2A} en corteza cerebral, electrofisiológicos y lesiones talámicas parecen sugerir que la presencia de 5HT_{2A} en neuronas piramidales corticales es suficiente y necesaria para observar las respuestas celulares y comportamentales de los fármacos alucinógenos. Varios estudios de casos y controles llevados a cabo por Inayama *et al.* (1996) y Williams *et al.* (1997) han asociado polimorfismos del gen que codifica el receptor 5HT_{2A} con la esquizofrenia. Estudios en tejido *postmortem* llevados a cabo por Gonzalez-Maeso *et al.* (2008) han demostrado que existe un incremento en la densidad de receptores serotoninérgicos 5HT_{2A} en corteza prefrontal de sujetos esquizofrénicos jóvenes libres de tratamiento y que dicho incremento desaparece en sujetos en tratamiento con antipsicóticos. La densidad de receptores 5HT_{2A} disminuye con la edad, desapareciendo los cambios ligados a la esquizofrenia, lo que es concordante con una disminución de la sintomatología psicótica con la progresión de la edad de los sujetos afectados. Este aumento de la densidad podría deberse a un

aumento del estado de alta afinidad de dichos receptores serotoninérgicos 5TH_{2A} en la corteza prefrontal de sujetos esquizofrénicos, tal y como han demostrado Muguruza *et al.* (2013).

1.3. LA RELACIÓN ENTRE EL CONSUMO DE CANNABIS Y LA ESQUIZOFRENIA

El hecho de que las alteraciones cognitivas que tienen lugar durante los procesos psicóticos y los efectos farmacológicos del consumo de cannabis presenten cierta similitud (hecho evidenciado en el estudio de Emrich *et al.* (1997)), así como la descripción del desarrollo de psicosis transitorias debidas a la intoxicación por cannabis, presentes en los estudios de Mathers y Ghodse (1992) y Thornicroft (1990), sugirió la posible relación entre el consumo de cannabis y la esquizofrenia. El consumo de cannabis presenta mayor prevalencia en los individuos con esquizofrenia respecto a la población general, siendo la sustancia ilegal más consumida entre estos sujetos. El desarrollo temprano de la enfermedad, la mayor psicopatología y el aumento de recaídas, el fracaso del tratamiento antipsicótico y el pronóstico desfavorable son algunas de las consecuencias que se han atribuido al consumo de cannabis en individuos con esquizofrenia. En la actualidad existen diversos estudios epidemiológicos, como los de Smit *et al.* (2004), Semple *et al.* (2005) y Moore *et al.* (2007) que parecen sugerir que el consumo de cannabis es un factor de riesgo para el desarrollo de la esquizofrenia. Estos datos epidemiológicos sugieren la existencia de una relación entre el consumo de cannabis y el desarrollo de la esquizofrenia ya que, según estudios de van Os *et al.* (2002), Zammit *et al.* (2002), Arseneault *et al.* (2004) y Henquet *et al.* (2005) el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta con la frecuencia de consumo. Sin embargo, a pesar de que el abuso de cannabis se asocia con un incremento del riesgo de desarrollar un trastorno psicótico, la mayoría de los consumidores de cannabis no desarrollan dicho trastorno; lo que sugiere que existen otros factores que también están implicados en el desarrollo o no de la enfermedad.

La concentración del principio activo de la marihuana (tetrahidrocannabinol- THC) en preparaciones de cannabis que se consumen entre la población también es un factor que, probablemente, influye en el riesgo a sufrir psicosis, según el estudio de Di Forti *et al.* (2009). Por otro lado, numerosos estudios llevados a cabo por

Arseneault *et al.* (2002), Stefanis *et al.* (2004), Rubino y Parolaro (2008) y Konings *et al.* (2008) han sugerido que el consumo de cannabis durante la adolescencia aumenta el riesgo de desarrollar esquizofrenia en la edad adulta. Tal y como evidencia el estudio de Fernandez-Ruiz *et al.* (2004), tanto los receptores cannabinoides como los propios endocannabinoides aparecen en estadios tempranos del desarrollo del cerebro, y parecen estar implicados en los procesos de sinaptogénesis en circuitos neuronales durante el desarrollo, según estudios realizados por Harkany *et al.* (2008). Se ha descrito que el sistema endocannabinoide tiene un papel significativo en el desarrollo neuronal, papel que ejercería mediante su papel modulador sobre la liberación de glutamato. El cannabis, a través de la activación de los receptores CB₁ podría interferir en estos procesos fisiológicos normales, provocando alteraciones en la liberación de glutamato que inducirían efectos neurotóxicos leves y, consecuentemente, defectos estructurales. La maduración del córtex prefrontal (PFC) es uno de los procesos más importantes durante la adolescencia y es posible que el consumo de cannabis en este periodo crítico del desarrollo afecte predominantemente a los procesos de consolidación de determinados neurocircuitos de dicha región cerebral.

El antipsicótico atípico clozapina, una de cuyas dianas principales son los receptores 5HT_{2A}, parece ser el fármaco más prometedor en el tratamiento de la esquizofrenia en pacientes con dependencia a cannabis. Este hecho está apoyado por datos clínicos preliminares y por modelos neurobiológicos desarrollados por Green *et al.* (2007) que sugieren un efecto terapéutico específico de la clozapina en trastornos psicóticos asociados al consumo de cannabis.

Varios estudios indican que los agonistas cannabinoides regulan la actividad de los receptores 5HT_{2A} por lo que se puede sugerir la posibilidad de que la exposición crónica a cannabinoides pueda inducir la regulación de los receptores en el cortex, variando tanto su número como su funcionalidad.

1.4. EL GENOTIPO AKT1 Y EL DESARROLLO DE LA ESQUIZOFRENIA EN CONSUMIDORES DE CANNABIS

Uno de los posibles mecanismos implicados en esta regulación podría estar relacionado con la funcionalidad de la kinasa Akt1, de manera que el cannabis podría regular los receptores 5HT_{2A} en parte a través de la Akt1.

Son diversos los estudios de casos/controles y cohortes familiares que sustentan la hipótesis de que Akt1 es un gen implicado en la esquizofrenia, entre ellos se encuentran los llevados a cabo por Zhao *et al.* (2006), Emamiyeh *et al.* (2004), Beaulieu *et al.* (2004), Lei *et al.* (2008), Alimohamad *et al.* (2005), Kozlovsky *et al.* (2006) y Kang *et al.* (2004). La asociación genética de Akt1 y esquizofrenia se ha confirmado en población europea en el estudio de Schwab *et al.* (2005), japonesa en el estudio de Ikeda *et al.* (2004), de Oriente Medio en el estudio de Bajestan *et al.* (2006), China en el estudio de Xu *et al.* (2007), Irlandesa en el estudio de Thiselton *et al.* (2008) y británica en el estudio de Mathur *et al.* (2010). Con todo ello, parece que la asociación genética de Akt1 con esquizofrenia no se limita a fondos genéticos específicos y que se reproduce en diferentes poblaciones. Además, estudios como el llevado a cabo por Pietilainen *et al.* (2009) han identificado variantes alélicas de Akt asociadas con alteraciones cognitivas y con aberraciones neuroanatómicas en las redes neurales de la corteza prefrontal. Por otro lado, variaciones en el gen Akt1 se han asociado al desarrollo de esquizofrenia en individuos consumidores de cannabis, tal y como se muestra en los estudios de Di Forti *et al.* (2012), van Winkel (2011) y van Winkel *et al.* (2011). En este contexto, estudios de neuroimagen como el de Bhattacharyya *et al.* (2010) han demostrado que sujetos sanos portadores de una variante alélica del gen Akt1 presentan una mayor respuesta psicótica y una mayor activación estriatal tras la administración de THC. En definitiva, se han identificado diferentes polimorfismos en el gen Akt1 en individuos con esquizofrenia pero se desconoce si estos cambios genéticos producen efectos funcionales y, si los hubiera, cómo afectarían al desarrollo de la esquizofrenia. La deficiencia en Akt está mecanísticamente ligada a alteraciones en la corteza prefrontal y a fenotipos esquizofrenia-like en modelos animales. Este hecho se demuestra en el estudio de Lai *et al.* (2006). Akt es activada por la fosfoinositol-3 kinasa (PI3K) en respuesta a la estimulación por receptores tirosina kinasa y receptores acoplados a proteínas G

(GPCR), entre ellos los receptores CB₁ y CB₂. Además, Akt es susceptible de ser modulada por fármacos, como la rapamicina, que la activa. A su vez, Akt1 regula negativamente, mediante fosforilación, la actividad de GSK3 β , kinasa constitutivamente activa. Existen evidencias (Beaulieu *et al.* (2007)) que sugieren la existencia de una disfunción en las vías de señalización de Akt/GSK3 β en la esquizofrenia y que dicha disfunción tiene un papel relevante en la patogénesis de la enfermedad. En este contexto, los estudios llevados a cabo por Zhao *et al.* (2006), Emamian *et al.* (2004), Lei *et al.* (2008) y Beaulieu *et al.* (2004) han descrito un menor contenido y menor actividad de Akt así como la consecuente activación de GSK3 β en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia. Los estudios más recientes, como el llevado a cabo por Alimohamad *et al.* (2005), sugieren que los antipsicóticos inducen la regulación de GSK3 β en el cerebro. Así, se ha demostrado que la clozapina aumenta *in vivo* los niveles de fosforilación de GSK3 β en corteza cerebral de ratones y estudios en cultivos celulares sugieren que este aumento de la fosforilación de GSK3 β está acompañado de la activación de Akt. Estos datos parecen indicar que la acción terapéutica de la clozapina está mediada en parte por la activación de la vía Akt/GSK3 β . Por otro lado, la administración aguda de cannabinoides regula la vía Akt tanto *in vivo* como *in vitro*. El THC, en concreto, administrado de forma aguda, es capaz de activar o inhibir la vía Akt, dependiendo de la dosis y del tipo celular. Sin embargo, no existen estudios sobre la regulación de esta vía *in vivo* tras una exposición prolongada a THC. A la vista de todos los datos anteriormente expuestos, se puede hipotetizar que la exposición crónica a THC modula los receptores 5HT_{2A} y que esta modulación podría llevarse a cabo a través de la vía de señalización Akt/GSK3 β .

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los mecanismos a través de los cuales el consumo crónico de THC facilita el desarrollo de psicosis, y en concreto de esquizofrenia.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Objetivo 1:* Valorar el estado comportamental de los animales tratados con THC para analizar la presencia de signos “psicosis-like”
- *Objetivo 2:* Determinar la funcionalidad *in vivo* del receptor 5HT_{2A} mediante técnicas comportamentales. Evaluar la modulación de la densidad (anticuerpos) del receptor 5HT_{2A} tras la exposición crónica a THC.
- *Objetivo 3:* Determinar el estado basal y la funcionalidad de la vía Akt/GSK3 β tras la exposición crónica a THC mediante un estudio de la expresión proteica total y fosforilada.

3. DESARROLLO

La señalización celular del receptor de serotonina 5HT_{2A} y de la vía Akt1/GSK3 β representan candidatos en la inducción y/o precipitación de psicosis tras el consumo crónico de cannabis. Este proyecto estudiará el mecanismo molecular subyacente a este proceso etiopatológico. Se utilizarán ratones salvajes tratados crónicamente con THC y sus respectivos controles. En los animales se estudiarán los cambios comportamentales en la inhibición de prepulso (PPI) y la expresión proteica de receptores 5HT_{2A} en la corteza cerebral. El estado basal de la vía Akt1/GSK3 β y la modulación tras el consumo de THC en corteza cerebral se cuantificará mediante anticuerpos específicos.

3.1. TRATAMIENTO CRÓNICO DE RATONES JÓVENES CON THC

Para el desarrollo de este trabajo se empleó un modelo de exposición crónica a THC en animales en una etapa de desarrollo equivalente a la adolescencia. Los animales de experimentación a utilizar en este estudio fueron 48 ratones macho Swiss de 35 días de edad (día postnatal 35, pn35) y peso aproximado de 25-40 gramos, procedentes del Estabulario de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). 16 ratones fueron utilizados para evaluar la expresión proteica mediante *western blotting*, mientras que 32 ratones se utilizaron para evaluar el estado comportamental.

El mantenimiento y estabulación de las colonias se realizó por parte del animalario de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Durante el tratamiento los animales permanecieron estabulados, en grupos de entre ocho y diez a una temperatura constante de 22°C, una humedad relativa del 65-70% y un ciclo de luz/oscuridad de 12h con acceso libre a agua y comida.

Se procedió a realizar una administración cada 24 horas, durante 30 días, con THC a una dosis de 10 mg/kg por vía intraperitoneal (n=24). El THC fue disuelto en la solución vehículo compuesta por etanol (5%), cremofor (5%) y suero salino (90%) para su administración.

De forma simultánea, se realizó una administración cada 24 horas, durante 30 días, con solución vehículo por vía intraperitoneal, estableciendo de esta forma el grupo control (n=24) del modelo de tratamiento.

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo se evaluaron y aprobaron por el CEBA (Comité de Ética para el Bienestar Animal) y el CEIAB (Comité de Ética en la Investigación con Agentes Biológicos y organismos modificados genéticamente) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Además, este trabajo se realizó respetando la legislación española que regula la protección de animales empleados en experimentación y otros propósitos científicos (L358/1 de 18/12/1986). En todos los casos, el manejo y sacrificio de los animales se llevó a cabo acorde con la Directiva del Consejo Europeo 86/609/CEE sobre bienestar animal.

3.2. EVALUACIÓN DEL ESTADO COMPORTAMENTAL Y DE LA FUNCIONALIDAD *IN VIVO* DEL RECEPTOR 5HT_{2A}

3.2.1. Inhibición prepulso del reflejo de la respuesta del sobresalto (PPI)

Una vez finalizado el tratamiento con THC se sometieron tanto a los animales tratados con THC (n=16) como a los tratados con solución vehículo (n=16) a la prueba de inhibición prepulso (PPI) en condiciones basales y tras la inducción por MK-801 (0,35 mg/kg vía intraperitoneal).

La inhibición prepulso del reflejo de la respuesta del sobresalto es una técnica de comportamiento que hace referencia a la reducción en la magnitud de la reacción motora que se produce en respuesta a un estímulo sensorial (pulso) cuando es precedido por otro estímulo sensorial previo más débil (prepulso), el cual no es capaz de generar respuesta motora por sí mismo. El grado por el cual el prepulso es capaz de inhibir la respuesta al pulso se considera una medida de procesamiento de la información sensomotora. La reducción de la amplitud de la respuesta refleja la capacidad del sistema nervioso para adaptarse temporalmente a un estímulo sensorial fuerte cuando una señal previa más débil es emitida en forma de aviso.

El paradigma “Prepulse Inhibition” (PPI) es habitualmente utilizado para evaluar el filtrado sensorimotor y procesos atencionales involucrados en el procesamiento selectivo de información. Se trata de un reflejo procesado en el tronco del encéfalo en respuesta a una estimulación táctil o auditiva inesperada. La disminución en la respuesta refleja es inducida de forma automática por la pre-exposición a un estímulo débil antes de la presentación del estímulo de mayor intensidad.

Esta prueba se utiliza ampliamente en modelos animales de trastornos en los que los animales expresan una inhabilidad para filtrar el acceso de información irrelevante a los dominios sensoriales, motores o cognitivos y, por tanto, no presentan una disminución en el reflejo de sobresalto durante la prueba PPI.

3.2.1.1. Parámetros

La presencia y la magnitud de la inhibición prepulso dependen de una variedad de factores o parámetros que incluyen:

- Estímulo principal/ pulso: Consiste en un estímulo acústico que desencadena respuesta motora por parte del animal.
- Estímulo prepulso: Se trata de un estímulo acústico que precede al pulso y que no genera respuesta motora por parte del animal.
- Sonido de fondo (background noise): Presenta intensidad constante y está presente durante todo el ensayo. No debe generar ningún tipo de respuesta por parte del animal, y su principal función es mantener un sonido ambiente homogéneo durante todo el procedimiento experimental.
- Intervalo prepulso- pulso: Periodo de tiempo existente entre la presentación del estímulo prepulso y la presentación del estímulo pulso.

3.2.1.2. Equipo

Para el estudio de la inhibición prepulso se empleó el sistema combinado *StarFear* (PanLab S.L.U., Barcelona, España) que permite registrar y analizar la señal generada por el movimiento del animal mediante un sistema de alta sensibilidad de transducción del peso.

El sistema constó de:

- Caja de atenuación *StarFear* insonorizada que incluye la cámara de experimentación formada por paredes de metacrilato negras y una puerta frontal transparente.

- Cilindro de restricción: Se encuentra en el interior de la cámara de experimentación y presenta unas dimensiones de 11x34 cm que limitan el área de movimiento del animal.
- Rejilla electrificable: Superficie sobre la que se coloca el cepo de restricción. Consiste en una unidad piezoeléctrica encargada de la detección y transducción de cualquier movimiento como desplazamiento de masa.
- Altavoz: Se encuentra instalado en el interior de la cámara y genera los estímulos acústicos correspondientes.
- Acoplador de carga: Se encarga de amplificar y filtrar la señal que se recibe desde la rejilla, así como de enviar los datos al ordenador.
- Interfaz: Actúa de conexión entre el ordenador y el acoplador de carga. Amplifica la señal acústica que envía la tarjeta de sonido del ordenador y que es generada por el programa para ajustarla al nivel de audio deseado en el interior de la caja. Actúa de indicador del evento activo en el protocolo.
- Ordenador: Controla la emisión del sonido y de la luz en el interior de la cámara de experimentación. Permite la digitalización de las señales enviadas por los diferentes componentes del sistema.



Imagen 1. Cilindro de restricción del sistema combinado *StarFear*. PanLab S.L.U.



Imagen 2. Caja de atenuación e interfaces del sistema combinado *StarFear*. PanLab S.L.U.

3.2.1.3. Procedimiento del ensayo

Los animales se habituaron durante un periodo mínimo de una hora a la sala de comportamiento donde se llevó a cabo el ensayo. El nivel de los diferentes estímulos acústicos emitidos, así como del sonido de fondo, se calibró antes del comienzo del ensayo con un medidor de decibelios (dB) digital. El cepo de restricción se limpió con etanol al 70% entre animal y animal para mantener el mismo olor ambiental.

Un procedimiento muy importante a realizar en los estudios de PPI es el uso de un “pre-ensayo” en el que los animales son testados para alcanzar grupos experimentales equilibrados, así como un ajuste del protocolo. De este modo, se disminuye la variabilidad y se aumenta la sensibilidad para detectar los efectos de las diferentes manipulaciones experimentales (Davis & Wagner, 1969). Una vez seleccionados los grupos experimentales y con el protocolo establecido, se introdujo al animal en el cepo de restricción situado en el interior de la cámara de experimentación. El ensayo comenzó con un periodo de aclimatación de 10 minutos en el cual se presentó un sonido de fondo de 70 dB que fue mantenido a lo largo de todo el proceso. Cada sesión comenzó con una serie de cinco exposiciones al estímulo sonoro denominado pulso que sirvió para obtener una respuesta más estable por parte del animal y que no se tuvieron en cuenta posteriormente para el análisis. Tras este periodo, se sometió a los ratones a una combinación pseudorandomizada de:

- Diez pulsos de intensidad 120dB y duración de 60 ms.
- Diez prepulsos para cada valor de intensidad deseado (85, 90 y 95 dB) de 20 ms de duración.
- Diez fases en las que se presenta el prepulso precediendo el pulso (120 dB, 60 ms) para cada valor de intensidad del prepulso (85, 90 y 95 dB, 20 ms). Ambos estímulos separados por un periodo de 60 ms.
- Diez presentaciones denominadas “No estímulo” en las cuales únicamente está presente el sonido de fondo y permite recoger la señal emitida por el animal en ausencia de estímulo.

La inducción de alteraciones en la inhibición prepulso se llevó a cabo mediante la administración intraperitoneal del antagonista del receptor ionotrópico de glutamato NMDA, dizocilpina (MK-801) en una dosis de 0,35 mg/kg. El ensayo de PPI se comenzó 20 minutos después de la administración de dicha sustancia.

3.2.1.4. Análisis estadístico de los resultados

El % PPI se calculó para cada prepulso como la magnitud del reflejo en presencia del propio prepulso en comparación con la magnitud de la respuesta al pulso.

(% PPI = (respuesta al pulso - respuesta al prepulso-pulso)/respuesta al pulso); estos datos fueron analizados mediante análisis de varianzas (ANOVA de una y dos vías) con mediciones repetidas en las distintas intensidades y mediante *t-tests* para muestras independientes (por grupos). La magnitud de la respuesta se analizó para cada grupo mediante *t-tests* para muestras independientes. Las diferencias se consideraron significativas a partir de $P < 0,05$.

3.2.2. Respuesta *head-twitch* (HTR) de funcionalidad *in vivo* del receptor 5HT_{2A}

Para evaluar la funcionalidad de los receptores 5HT_{2A} se sometió a los animales tratados con THC, así como a sus respectivos controles a la prueba de *head-twitch* en respuesta al agonista selectivo 5HT_{2A/2C} alucinógeno (\pm) DOI (2,5-dimetoxi-4-yodoamfetamina) (1 mg/kg intraperitoneal).

La evaluación del movimiento denominado *head-twitch* es un procedimiento comportamental que permite el estudio de la respuesta psicótica de los animales tras la administración de una sustancia alucinógena. Esta respuesta consiste en un movimiento rápido y rotacional de la cabeza alrededor del eje rostral-caudal.

3.2.2.1. Procedimiento

El día del ensayo, los ratones se colocaron en jaulas de plástico individuales, permaneciendo un período mínimo de una hora en la sala de comportamiento antes del comienzo de la evaluación. Transcurridos 5 minutos desde la administración intraperitoneal de (\pm) DOI al sujeto de estudio, se comenzó la cuantificación del número de movimientos *head-twitch* realizados por los animales de manera individual durante veinte minutos.

3.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE 5HT_{2A} Y AKT/GSK3 MEDIANTE WESTERN BLOTTING

Para la evaluación de la expresión proteica del receptor 5HT_{2A}, así como de las proteínas de señalización Akt y GSK3 β totales y fosforiladas se utilizó la técnica de inmunodetección mediante *western-blot*, siguiendo metodologías descritas por Urigüen *et al.* (2013).

El *western blot* (WB) es una técnica semicuantitativa empleada para detectar la presencia de proteínas específicas en una muestra compleja. Se engloba dentro de las técnicas conocidas como inmunoquímicas debido a que se basa en la especificidad de la reacción antígeno- anticuerpo. Consiste en diferentes fases: la separación de las proteínas en base a su peso molecular o *electroforesis*; la *transferencia de las proteínas* del gel de electroforesis a una membrana de nitrocelulosa que inmoviliza las proteínas y facilita el acceso de los anticuerpos a las proteínas; la *incubación* de la membrana con una solución que contiene el anticuerpo específico que reconoce y se une a la proteína específica; y la *cuantificación* de la señal inmunoreactiva.

3.3.1. Preparación del tejido: homogeneizado total de corteza de cerebro de ratón

Las muestras de corteza de ratón (~150 mg) se descongelaron a 4°C y se homogeneizaron en 10 volúmenes de tampón de homogeneización (TBS 10X (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; pH 7,5), 50 µL/g Cocktail de Inhibidores de Proteasas Sigma, 10 µg/mL antipain, 10 µg/mL chymostatin, 1mM Na₃VO₄, 1 mM NaF) utilizando un Potter (15 pulsos), añadiendo a continuación 0,1 volúmenes de tampón BCD 10X (tampón de homogeneización, 10% Igepal, 5% Desoxicolato de sodio, 1% SDS, 250 mM CHAPS). Tras 30 minutos de incubación en hielo, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14000 rpm y 4°C, quedándonos con el sobrenadante y descartando el *pellet*. El contenido de proteínas se determinó en el sobrenadante utilizando el método DC, con BSA como estándar.

Tras la medición, las muestras se diluyeron en tampón de homogeneización hasta conseguir una concentración de 4mg/mL y se alicuotaron. Posteriormente, se añadió Laemmli comercial (95% de volumen) y β-mercaptoetanol (5% del volumen) a cada muestra, consiguiendo así una concentración final de 2 mg de proteína/mL. Finalmente, se alicuotaron las muestras en un volumen de 50 µL.

3.3.2. Determinación del contenido proteico. Método DC

La cuantificación proteica de los homogeneizados totales para los experimentos de *Western blot* se llevaron a cabo mediante determinación colorimétrica, utilizando un Kit Bio-Rad (Dc Protein Assay, Bio-Rad Laboratories, California, USA).

Brevemente, se añadieron 25 μL de reactivo A' y 200 μL de reactivo B a un volumen de 5 μL de muestra. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm e un lector de microplacas ELX808 (BioTek® Instruments, Winooski, USA). Los valores proteicos se extrapolaron de una línea estándar llevada a cabo con BSA entre 0 y 0,8 mg/mL. El análisis de regresión lineal y la extrapolación de los datos se desarrolló con el software GraphPad Prism 5® (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA, www.graphpad.com).

3.3.3. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (“*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”) es el método analítico más utilizado para separar las diferentes proteínas de una muestra.

Los geles para la electroforesis consistieron en una fase superior (gel de concentración), en donde las proteínas se concentraron antes de la electroforesis, y una fase inferior (gel de resolución), en donde las proteínas se separaron conforme a su peso molecular.

La composición de estas dos fases fueron similares, variando el porcentaje de acrilamida-bisacrilamida y la concentración de Tris-HCl. La composición de cada gel de un grosor de 1,5 mm se describe en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Composición de los geles de concentración y resolución de grosor 1,5 mm

Compuestos	Gel de resolución 12% poliacrilamida	Gel de concentración 5% poliacrilamida
Poliacrilamida 30%	21ml	3,4 ml
Tris-HCl 1,5 M	13,1ml	-
Tris-HCl 1 M	-	2,5 ml
mQH ₂ O	17,5 ml	13,6 ml
SDS 10%	525 μl	200 μl
TEMED	36,8 μl	20 μl
APS 10%	368 μl	200 μl

Antes de la solidificación del gel de concentración, se insertó un peine de 15 carriles (Bio-Rad) para permitir que las muestras corran por separado.

Antes de cargar las muestras, se calentaron durante 10 minutos a 95°C en el Thermoblock para asegurarse que las proteínas estaban totalmente desnaturalizadas, y para evitar cualquier posible plegamiento de proteína y/o agregación.

Las muestras y los marcadores de peso molecular se cargaron según el patrón:

MW-POOL-SS1-THC1-SS2-THC2-SS3-THC3

MW-POOL-SS4-THC4-SS5-THC5-SS6-THC6

MW-POOL-SS7-THC7-SS8-THC8

Siendo MW el marcador de peso molecular, SS los sujetos control y THC los sujetos sometidos al tratamiento crónico de THC.

Se cargó una cantidad de proteína de 20 µg.

El tampón de electroforesis consistió en una solución de Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glicina y 0,1% SDS.

Durante los primeros 30 minutos de electroforesis, se aplicó un voltaje de 60V para concentrar todas las proteínas en el gel de concentración, a continuación se aplicó durante aproximadamente 2 horas un voltaje de 120V para correr las proteínas en el gel de resolución. La electroforesis se paró cuando el frente llegó al final del gel.

3.3.4. Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Para permitir la accesibilidad de los anticuerpos, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro: 0,45 µm) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) aplicando un campo eléctrico. Para facilitar la transferencia de las proteínas entre el gel y la membrana de nitrocelulosa, ambas se mantuvieron en contacto y bajo presión mediante tres papeles de filtro Whatman (3MM) y una esponja en cada lado, manteniendo todo ello compacto en un casete (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Los casetes se introdujeron en cubetas con tampón de transferencia (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% metanol; pH 8,3). El tampón se mantuvo en agitación y las cubetas se introdujeron en hielo para evitar el calentamiento causado por el campo eléctrico. El tiempo de transferencia y el amperaje usados fueron: 0,3 A por cubeta durante 1 hora.

Una vez terminada la transferencia, las membranas de nitrocelulosa se lavaron con tampón TBS para eliminar el metanol residual del tampón de transferencia de las membranas de nitrocelulosa. Se realizaron tres lavados rápidos y tres de 10 minutos.

3.3.5. Inmunodetección

Tras el lavado de las membranas, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y agitación constante (agitador orbital ELMI Sky Line, Progen Scientific Ltd, London, UK) en solución de bloqueo para disminuir las uniones no específicas de anticuerpos y la señal de fondo. La composición de la solución de bloqueo consistía en 5% de leche en tampón TBS.

Tras el bloqueo, las membranas de nitrocelulosa se incubaron durante toda la noche a 4°C y agitación constante en el tampón de incubación conteniendo los anticuerpos primarios a una concentración determinada (dependiente del anticuerpo). Las distintas soluciones se exponen en la **Tabla 2**. Cada membrana de nitrocelulosa se incubó simultáneamente con dos anticuerpos primarios, uno contra la proteína diana y otro contra la β actina, que se usó como control de carga de proteína en el gel de electroforesis.

A la mañana siguiente, las membranas se lavaron de nuevo con TBS para eliminar los restos de anticuerpos primarios que no se habían unido a las proteínas. Entonces, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados fluorescentes apropiadamente diluidos (**Tabla 2**) en tampón de incubación durante una hora a temperatura ambiente y agitación constante. Se utilizaron dos anticuerpos secundarios conjugados fluorescentes distintos: los anticuerpos conjugados Alexa Fluor® 680 para la detección de la proteína diana (la señal fluorescente se visualiza en color rojo en el sistema de detección) y los anticuerpos conjugados IRDye® 680 para la detección de la β -actina (señal fluorescente visualizada en color verde en el sistema de detección).

Finalmente, las membranas se lavaron con TBS para eliminar las trazas de anticuerpos que no se habían adherido a los anticuerpos primarios (ya adheridos a las membranas). La señal inmunorreactiva se detectó y cuantificó utilizando el sistema

de imagen infrarroja Odyssey (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA) y se obtuvieron los valores de intensidad integrados.

Tabla 2. Condiciones experimentales para los experimentos de *Western blot* en muestras de cerebro de ratón

Proteína	Contenido proteico total	Peso molecular (kDa)	Solución de bloqueo	Solución de incubación	Dilución del anticuerpo primario	Dilución del anticuerpo secundario
P-Akt	20 µg	60	5% leche	Sol. Bloqueo + 0,1% Tween 20	1:1000	1:2500
Akt	20 µg	60	5% leche	Sol. Bloqueo + 0,1% Tween 20	1:1000	1:2500
P-GSK3	20 µg	51 (isoforma α) 46 (isoforma β)	5% leche	Sol. Bloqueo + 0,1% Tween 20	1:500	1:2500
GSK3	20 µg	51 (isoforma α) 46 (isoforma β)	5% leche	Sol. Bloqueo + 0,1% Tween 20	1:500	1:2500
P-S6	20 µg	32	5% leche	Sol. Bloqueo + 0,1% Tween 20	1:1000	1:2500
S6	20 µg	32	5% leche	Sol. Bloqueo + 0,1% Tween 20	1:1000	1:2500
5HT_{2A}	20 µg	53	5% leche	Sol. Bloqueo + 0,1% Tween 20	1:500	1:2500

3.3.6. Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del programa GraphPad Prism 4®, expresándose los resultados como media±SEM (error estándar de la media). La comparación estadística entre el grupo a estudiar con respecto a sus controles emparejados se realizó mediante un test *t de Student*, siendo la diferencia significativa cuando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN PREPULSO DE LA RESPUESTA DE SOBRESALTO (*PrePulse Inhibition of Startle Reflex, PPI*)

El PPI hace referencia al grado con el cual un estímulo sensorial débil (prepulso) es capaz de inhibir la respuesta motora refleja frente a un evento sensorial intenso (pulso). Esta inhibición es una medida simple del procesamiento de la información sensoriomotora. Este procesamiento es uno de los paradigmas experimentales más importantes en investigación neuropsiquiátrica. Está ampliamente relacionado con la esquizofrenia debido a observaciones clínicas en las que los pacientes diagnosticados de dicha enfermedad son incapaces de filtrar o procesar un estímulo irrelevante y, por tanto, presentan déficits en los valores de PPI (Revisado de Braff *et al.*, 2001), convirtiendo este paradigma en un candidato válido e importante como intermediario o marcador endofenotípico en estudios genéticos. Se trata de un esquema robusto y conservado entre especies, con un alto grado de homología entre las medidas en roedores y humanos.

Al analizarse los datos en función del valor de intensidad del prepulso, se observó una disminución estadísticamente significativa en los porcentajes de inhibición mostrados por el grupo de animales tratados con THC en comparación con su respectivo grupo control para los valores de intensidad del prepulso de 85 dB ($*p < 0,05$) y 90 dB ($*p < 0,05$). Por otro lado, se decidió realizar este ensayo de inhibición prepulso en animales control y tratados con THC sometidos a tratamiento agudo con el fármaco propsicótico dizocilpina (MK-801) 0,35 mg/kg i.p., con el objetivo de observar si este tratamiento era capaz de producir un déficit del % PPI. Este fármaco fue capaz de inducir una disminución significativa del % PPI en el grupo de animales tratados con THC tras su administración aguda para la intensidad de prepulso de 90 dB ($*p < 0,05$). (**Figura 1**)

En lo referente a la amplitud de la respuesta frente al pulso (120 dB, 60 ms), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores presentados por los diferentes grupos de estudio, control y tratado con THC. Sin embargo, sí se

observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de animales sometidos a tratamiento agudo con dizocilpina en comparación con los no tratados con dizocilpina. Esta diferencia se observó tanto en el grupo de animales control ($t=3,81$; $**p<0,01$) como en el grupo de animales tratados con THC. ($t=3,44$; $**p<0,01$).

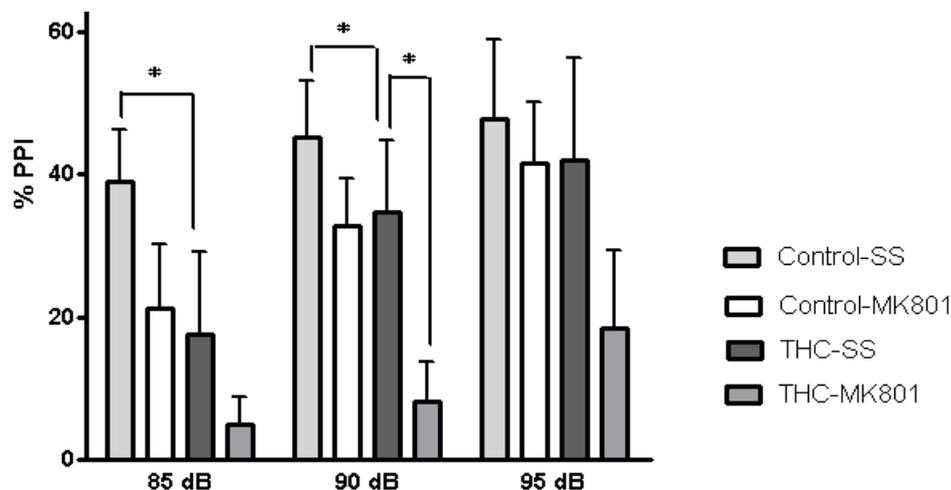


Figura 1. Representación gráfica del porcentaje de inhibición prepulso. Se evaluó el porcentaje de inhibición prepulso (PPI) presentado por los animales control y tratados con THC tras la administración aguda de suero salino i.p. (SS) (Control-SS: n=7; THC-SS: n=7), así como tras la inyección aguda de dizocilpina (MK801) 0,35 mg/kg i.p. (Control-MK801: n=8; THC-MK801: n=6). $*p<0,05$.

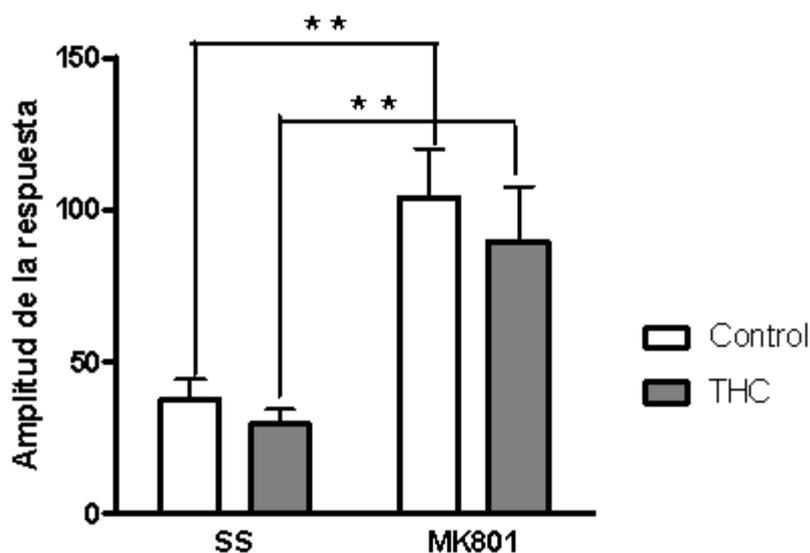


Figura 2. Representación gráfica del nivel de amplitud de la respuesta al pulso (120 dB, 60 ms). Se evaluó el nivel de la respuesta al pulso presentado por los animales control y tratados con THC tras la administración aguda de suero salino (SS) i.p. (Control-SS: n=8; THC-SS: n=8), así como tras la inyección aguda de dizocilpina (MK801) 0,35 mg/kg i.p. (Control-MK801: n=8; THC-MK801: n=7). $**p<0,01$.

4.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA PSICÓTICA TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE (\pm) DOI: RESPUESTA DE *HEAD TWITCH*

Los alucinógenos agonistas no selectivos para ciertos receptores del sistema serotoninérgico, tales como el DOI (feniletilamina 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina) o el LSD (dietilamina del ácido lisérgico), alteran la percepción sensorial, el humor, la cognición y el comportamiento en humanos. Por ello, se ha considerado que estas sustancias alucinógenas podrían ser utilizadas como modelos para el entendimiento de enfermedades mentales, como la esquizofrenia (Hollister, 1964).

Un denominador común de todos estos alucinógenos es su elevada afinidad por los receptores serotoninérgicos de tipo 2, incluyendo 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, que son expresados en regiones del cerebro que regulan la emoción y la memoria, como la corteza prefrontal y estructuras límbicas (López-Giménez *et al.*, 2002; Nichols *et al.*, 2004). Varias líneas de investigación sugieren que el efecto cognitivo y comportamental de los alucinógenos es conducido a través de la activación de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal, ya que la inducción del *head twitch* es revertida por la administración de fármacos antagonistas selectivos de este subtipo de receptores y no de antagonistas de receptores 5-HT_{2C} (Vollenweider *et al.*, 1997; Willins y Meltzer, 1997; González-Maeso *et al.*, 2007). De forma adicional, ratones carentes de este subtipo de receptor serotoninérgico no muestran respuesta de *head twitch* (HTR, *head twitch response*) tras la administración de (\pm)-DOI (González-Maeso *et al.*, 2007). Se considera, por tanto, que la respuesta de *head twitch* en ratón es mediada por receptores 5-HT_{2A}, proporcionando una medida de la función de los mismos y, posiblemente, una aproximación comportamental para evaluar el efecto alucinógeno.

Tras la administración aguda del agonista no selectivo de receptores de serotonina 5-HT_{2A/2C} (\pm)-DOI a una dosis de 1 mg/kg por vía intraperitoneal, los animales tratados con THC no presentaron cambios significativos en el número de movimientos *head twitch* con respecto a sus controles en un periodo de 10 minutos (**Tabla 3**). Del mismo modo, tampoco presentaron cambios significativos en un periodo de 20 minutos (**Tabla 4**).

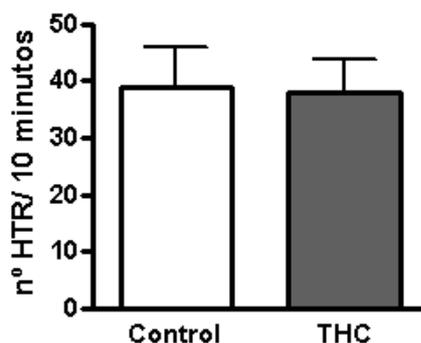


Figura 3. Representación gráfica del número de movimientos *head twitch* cuantificados en un periodo de 10 minutos. Los animales recibieron una administración aguda del agonista no selectivo 5-HT_{2A/2C} (\pm)-DOI 1 mg/kg i.p. en el grupo de animales control y tratados con THC. (Grupo control: n=2; grupo tratado con THC: n=3).

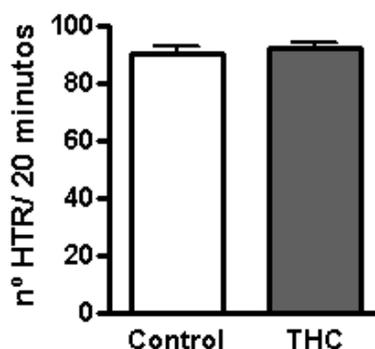


Figura 4. Representación gráfica del número de movimientos *head twitch* cuantificados en un periodo de 20 minutos. Los animales recibieron una administración aguda del agonista no selectivo 5-HT_{2A/2C} (\pm)-DOI 1 mg/kg i.p. en el grupo de animales control y tratados con THC. (Grupo control: n=2; grupo tratado con THC: n=2).

4.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA MEDIANTE LA TÉCNICA DE *WESTERN BLOT*

Para la evaluación de la expresión proteica a nivel cerebral, las muestras que se emplearon para la realización de los experimentos de cuantificación proteica fueron homogeneizado total de corteza cerebral de animales control (n=8) y animales tratados con THC (n=8).

4.3.1. Receptor serotoninérgico 5-HT_{2A}

El grupo de animales tratados con THC presentó una disminución estadísticamente significativa de los niveles de esta proteína con un porcentaje de expresión de $82,5 \pm 15,6\%$ con respecto al $97,8 \pm 8,2\%$ del grupo control ($t=2,38$; $*p < 0,05$).

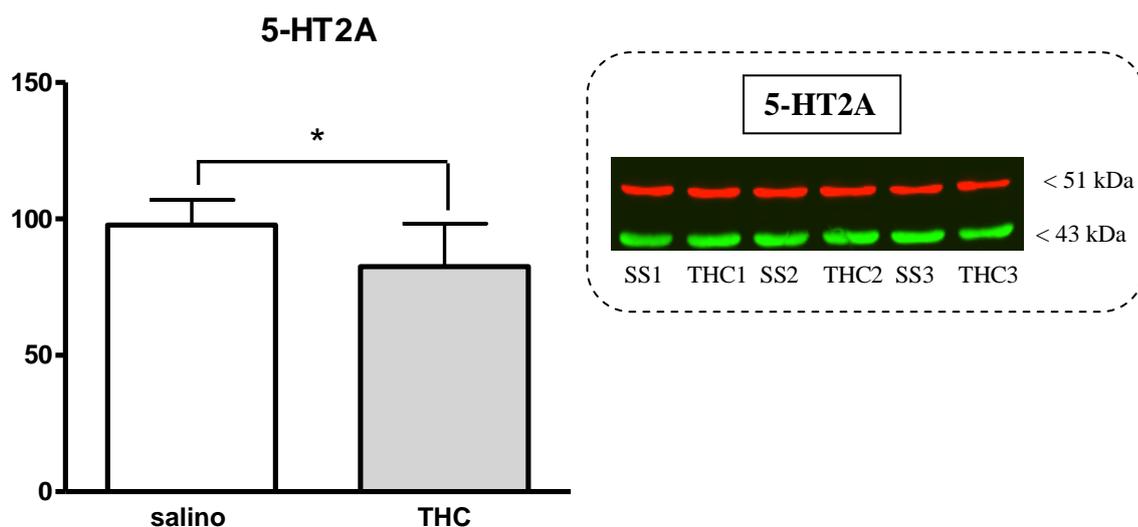


Figura 5. Representación gráfica e imagen representativa de los niveles corticales de inmunodetección del receptor 5-HT_{2A} (rojo) y de la proteína β -actina (verde) en animales control (salino) y tratados con THC (THC). (Grupo control: n=8; grupo tratado con THC: n=8).

4.3.2. Proteína de señalización Akt en su forma fosforilada (Ser473)

El grupo de animales tratados con THC no presentó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de esta proteína con respecto a su grupo control. (129,1 \pm 22,6% con respecto al 100,2 \pm 5,6% del grupo control. $t=1,24$; $p=0,24$).

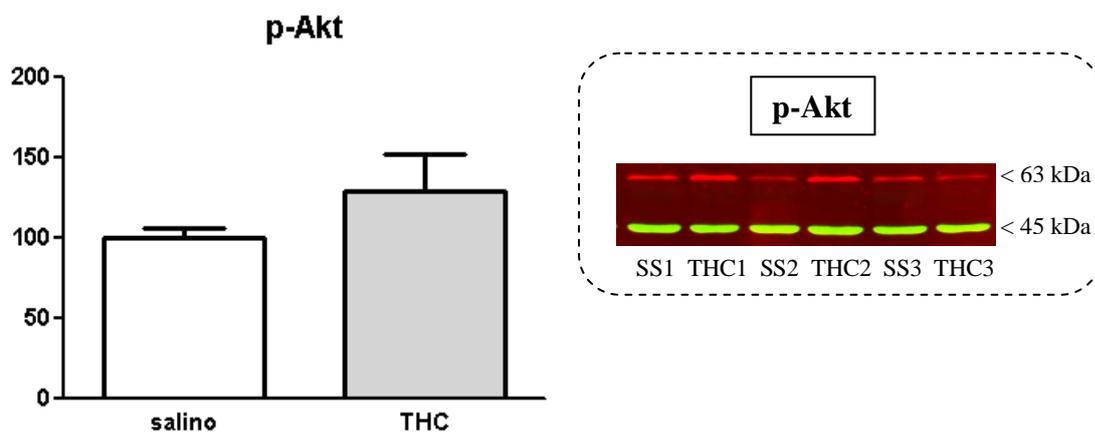


Figura 6. Representación gráfica e imagen representativa de los niveles corticales de inmunodetección de la proteína Akt en su forma fosforilada (rojo) y de la proteína β -actina (verde) en animales control (salino) y tratados con THC (THC). (Grupo control: n=8; grupo tratado con THC: n=8).

4.3.3. Proteína de señalización Akt total

El grupo de animales tratados con THC no presentó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de esta proteína con respecto a su grupo control. El porcentaje de expresión del grupo tratado con THC fue de $97,1 \pm 5,5\%$ con respecto al $100 \pm 5\%$ del grupo control. ($t=0,4$; $p=0,70$).

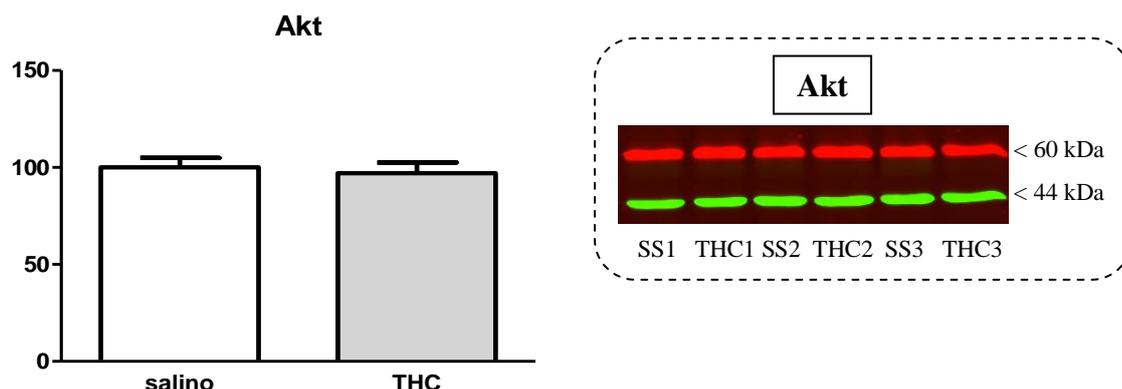


Figura 7. Representación gráfica e imagen representativa de los niveles corticales de inmunodetección de la proteína Akt total (rojo) y de la proteína β -actina (verde) en animales control (salino) y tratados con THC (THC). (Grupo control: n=8; grupo tratado con THC: n=8).

4.3.4. Proteína de señalización GSK3 (isoforma β) en su forma fosforilada (Ser9)

El grupo de animales tratados con THC no presentó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de esta proteína con respecto a su grupo control, siendo el porcentaje de expresión del grupo tratado con THC de $83,7 \pm 9,1\%$ y el del grupo control de $100,9 \pm 16,5\%$. ($t=0,91$; $p=0,38$). Cabe mencionar que se aprecian dos bandas, correspondientes a las isoformas α y β , de 51 y 46 kDa respectivamente.

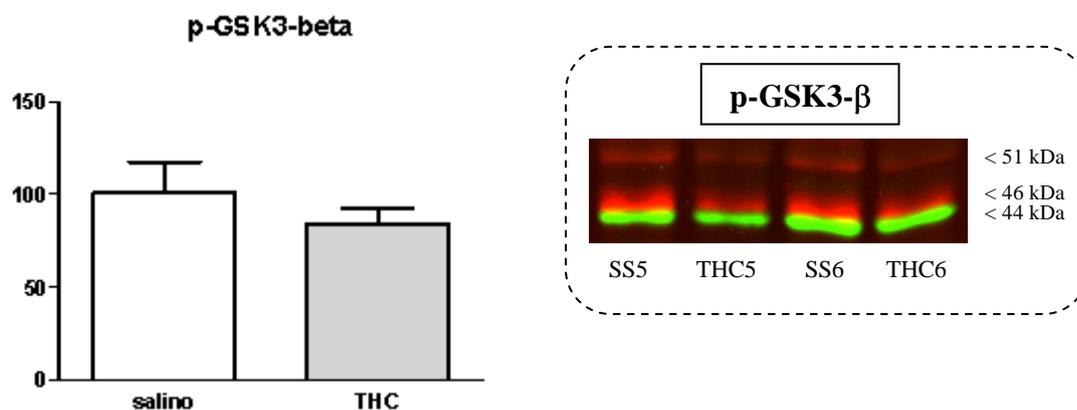


Figura 8. Representación gráfica e imagen representativa de los niveles corticales de inmunodetección de la isoforma β de la proteína GSK3 en su forma fosforilada (rojo) y de la proteína β -actina (verde) en animales control (salino) y tratados con THC (THC). (Grupo control: n=8; grupo tratado con THC: n=8).

4.3.5. Proteína de señalización GSK3 (isoforma β) total

El grupo de animales tratados con THC no presentó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de esta proteína con respecto a su grupo control. ($97,8 \pm 4,2\%$ con respecto al $103 \pm 2,7\%$ del grupo control). ($t=1,03$; $p=0,32$). Con este anticuerpo también se pudo distinguir ambas isoformas, la α y la β , de 50 y 44 kDa respectivamente.

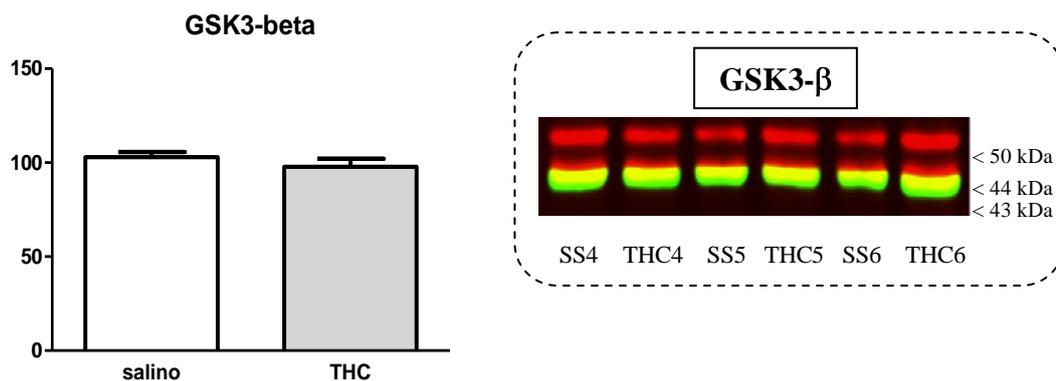


Figura 9. Representación gráfica e imagen representativa de los niveles corticales de inmunodetección de la isoforma β de la proteína GSK3 (rojo) y de la proteína β -actina (verde) en animales control (salino) y tratados con THC (THC). (Grupo control: $n=8$; grupo tratado con THC: $n=8$).

4.3.6. Proteína ribosomal S6 en su forma fosforilada (Ser240-244)

El grupo de animales tratados con THC presentó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de esta proteína con respecto a su grupo control. ($144,2 \pm 19,3\%$ con respecto al $100 \pm 5,3\%$ del grupo control). ($t=2,51$; $*p<0,05$).

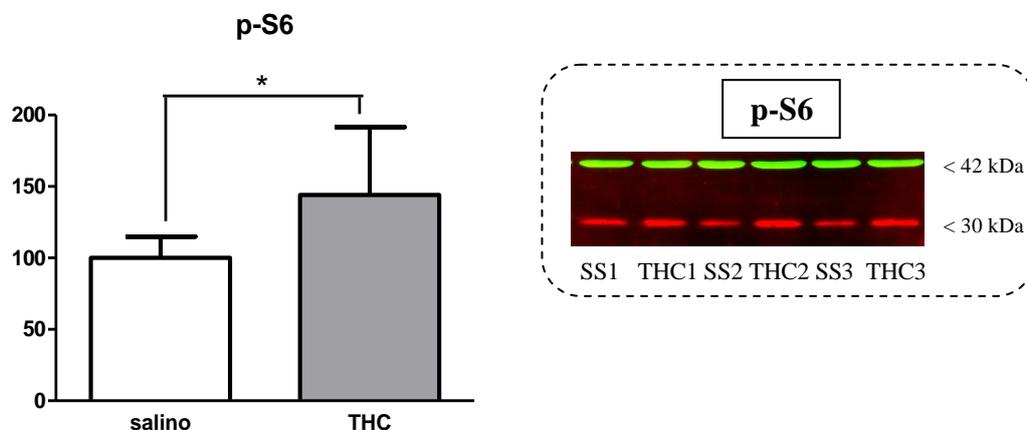


Figura 10. Representación gráfica e imagen representativa de los niveles corticales de inmunodetección de la proteína S6 en su forma fosforilada (rojo) y de la proteína β -actina (verde) en animales control (salino) y tratados con THC (THC). (Grupo control: $n=8$; grupo tratado con THC: $n=6$).

4.3.7. Proteína ribosomal S6 total

El grupo de animales tratados con THC no presentó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de esta proteína con respecto a su grupo control, siendo el porcentaje de expresión del grupo tratado con THC de $106,2 \pm 11,1\%$ y el del grupo control de $101,3 \pm 5,1\%$. ($t=0,4$; $p=0,7$).

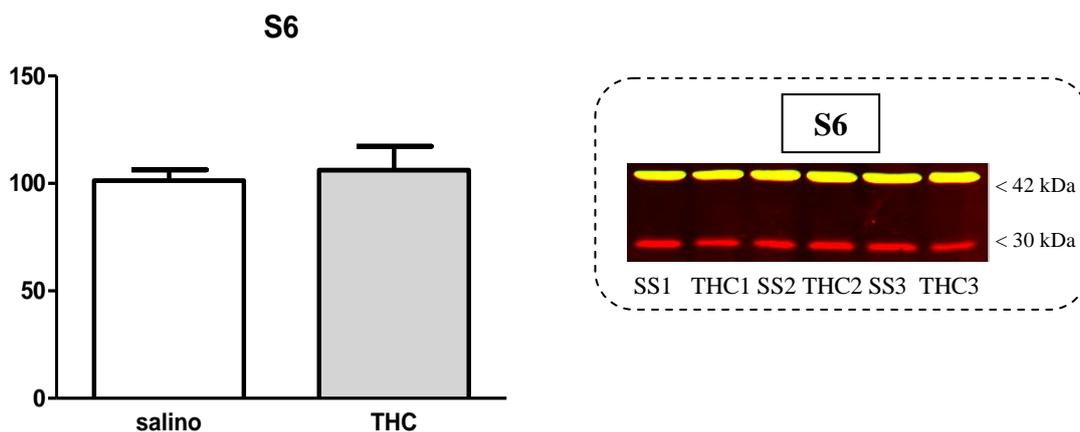


Figura 11. Representación gráfica e imagen representativa de los niveles corticales de inmunodetección de la proteína S6 total (rojo) y de la proteína β-actina (verde) en animales control (salino) y tratados con THC (THC). (Grupo control: n=8; grupo tratado con THC: n=8).

5. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el estado comportamental, así como la modulación de la densidad del receptor 5-HT_{2A} y el estado basal y funcionalidad de la vía Akt/GSK3 β y de la proteína ribosomal S6 en animales tratados de manera crónica con THC en comparación con sujetos control.

El hecho de contar con un grupo control de idéntica edad y en las mismas condiciones que el grupo de estudio nos permitió minimizar los posibles factores de confusión causados por variables ajenas a nuestra variable de estudio.

A continuación se discuten los resultados obtenidos en el presente estudio y se comenta la posible relación entre los resultados obtenidos.

5.1. EVALUACIÓN COMPORTAMENTAL

5.1.1. Inhibición prepulso de la respuesta de sobresalto (*PrePulse Inhibition of Startle Reflex, PPI*)

En lo referente a la evaluación comportamental, el PPI puede considerarse una herramienta robusta, fiable, fácilmente cuantificable y versátil. En humanos, la respuesta de sobresalto se mide mediante el parpadeo reflejo cuantificado a través de la electromiografía del músculo orbicular de los párpados. En el caso de los roedores, se registra la reacción corporal total en respuesta a un estímulo que, en muchas ocasiones, es idéntico al empleado en humanos. La inhibición prepulso está conservada entre vertebrados debido a que los procesos cerebrales que parecen estar implicados en la respuesta de sobresalto presentan una gran similitud entre especies. Este hecho convierte a la inhibición prepulso en una herramienta útil en las investigaciones traslacionales entre especies y en uno de los pocos paradigmas compartidos entre humanos y roedores, convirtiéndose en el ensayo de elección para el estudio de los déficits en el procesamiento de la información sensoriomotora.

Los experimentos de PPI llevados a cabo en este proyecto muestran un déficit en el paradigma de inhibición prepulso de la respuesta al sobresalto en los animales tratados crónicamente con THC (**Figura 1**), evidenciando una alteración en el procesamiento sensoriomotor en comparación con su grupo control. Asimismo, la

ausencia de cambios en la amplitud de la respuesta al estímulo del pulso entre el grupo de animales tratados con THC y su respectivo grupo control (**Figura 2**) contribuye a concluir que el déficit observado no estuvo relacionado con aspectos a nivel sensorial (como puede ser un déficit auditivo). Por otro lado, el hecho de no encontrar una diferencia estadísticamente significativa en los valores correspondientes a los tres prepulsos puede haberse debido a la elección de un protocolo no debidamente optimizado para la cepa de ratón utilizada. Tal y como puede observarse en la representación del % PPI, los prepulsos parecen ser demasiado altos, originando en el animal una inhibición notable en el prepulso más débil, difícilmente superable por los prepulsos sucesivos. Consiguientemente, se produce una saturación de la señal de inhibición y unos errores notables.

La evaluación de la inhibición prepulso se considera una metodología útil para el estudio de la esquizofrenia debido a la gran relevancia que presentan los déficits de filtrado de información sensorial y cognitiva en la fisiopatología de esta enfermedad. Esta utilidad se basa en diversas observaciones clínicas en las que los pacientes esquizofrénicos muestran una incapacidad de filtrar o procesar un estímulo irrelevante y, por tanto, presentan déficits en los valores de PPI respecto a sujetos control (revisado de Braff *et al.*, 2001). Sin embargo, es importante tener en cuenta que el paradigma de inhibición prepulso no tiene carácter diagnóstico, ni predice el curso clínico de la enfermedad, ni de los síntomas específicos, ni la respuesta individual a los diferentes fármacos antipsicóticos (Swerdlow *et al.*, 2008).

Existen evidencias de estudios en humanos y animales de que existe un periodo vulnerable para la administración crónica de cannabinoides durante ciertas fases del desarrollo, en particular durante la pubertad, en la cual la administración crónica de cannabinoides induce alteraciones cerebrales y comportamentales persistentes. Se ha observado en ratas que una exposición crónica de animales inmaduros a Δ^9 -THC causa más efectos residuales irreversibles en distintos comportamientos en comparación con los observados en ratas maduras sometidas a un tratamiento crónico (Stiglick & Kalant, 1985). Además, el estudio comportamental llevado a cabo por Ehrenreich *et al.* (1999) en humanos mostró déficits atencionales en adultos tras el abuso de cannabis en edades tempranas (antes de los 16 años). Gleason *et al.* observaron en 2012 déficits en el PPI en ratones tratados con el agonista del receptor

cannabinoide CB1 WIN 55,212-2 durante la adolescencia. Resulta interesante apuntar que un estudio muy reciente de Tournier y Ginovart (2014) también coincide con los resultados de este proyecto. En este estudio llevado a cabo en ratas, se ha observado un déficit significativo en el % PPI en los animales tratados de modo crónico (durante 21 días, en dosis de 1 mg/kg/día) con $^9\Delta$ -THC, no observándose esta alteración en animales tratados de manera aguda. Todos estos estudios, junto con el presente, coinciden en que el tratamiento con cannabinoides conlleva ciertos comportamientos esquizofrenia-*like* de manera dependiente a la edad de exposición, proveyendo evidencias de que el uso de cannabis durante la adolescencia puede tener un papel contributivo en el desarrollo de esquizofrenia.

Continuando con los resultados obtenidos, la dizocilpina produjo un déficit en el PPI sensiblemente mayor en los animales tratados con THC con respecto a sus correspondientes controles. Existen evidencias que demuestran la capacidad de ciertos fármacos para producir un déficit en el PPI, uno de ellos es el MK-801 a dosis bajas. El MK-801, también conocido como dizocilpina, es un potente y selectivo antagonista de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos excitatorios NMDA. Está descrito en la literatura que este tipo de antagonistas NMDA inducen un síndrome comportamental que parece deberse, en parte, al incremento de la actividad dopaminérgica y serotoninérgica (Carlsson y Carlsson, 1989; Jentsch *et al*, 1998) y se han relacionado con los síntomas positivos de la esquizofrenia (Adams y Moghaddam, 1998). Como consecuencia, el modelo farmacológico de MK-801 es un modelo aceptado como paradigma de psicosis, teniendo un amplio grado de validez de constructo y de contenido. Con todo esto, los resultados obtenidos en el PPI con el MK-801 podrían contribuir a suponer que el consumo crónico de THC interfiere en la maduración del cerebro adolescente, conllevando ciertas alteraciones en los niveles de receptores glutamatérgicos NMDA cerebrales y dando lugar así a una mayor susceptibilidad a la acción de este fármaco pro-psicótico.

5.1.2. Respuesta de *head twitch*

Tras las observaciones derivadas del estudio de la inhibición prepulso, se continuó la evaluación comportamental con el estudio de la respuesta de *head twitch* inducida tras la administración del alucinógeno agonista 5-HT_{2A/2C} (\pm)DOI. Los ratones

tratados con THC no mostraron diferencias significativas en la respuesta tras la administración del alucinógeno en comparación con su respectivo grupo control (**Figuras 3 y 4**).

Los alucinógenos agonistas serotoninérgicos como el (\pm)-DOI, presentan elevada afinidad por los receptores de 5-HT tipo 2, incluyendo 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, que se expresan en regiones cerebrales que regulan las emociones y la memoria, como la corteza prefrontal y estructuras límbicas. Estas sustancias alteran la percepción, el humor, la cognición y el comportamiento en humanos. Estos efectos dan lugar a la idea de que los alucinógenos podrían ser utilizados para el entendimiento de enfermedades mentales como la esquizofrenia (Cohen, 1953; Hollister, 1964), ya que inducen en individuos sanos síntomas comparables a aquellos observados en sujetos diagnosticados de esta enfermedad (Colpaert, 2003; Gouzoulis-Mayfrank *et al.*, 2005). Los efectos comportamentales inducidos por estos alucinógenos parecen mediados a través de la activación de los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}. Entre estos efectos se encuentra la respuesta de *head-twitch* cuantificable en roedores y que no es inducida por agonistas 5-HT_{2A} no alucinógenos. Existen evidencias que apoyan que esta respuesta de *head-twitch* proporciona una medida de la funcionalidad de este subtipo de receptor y es una representación válida de comportamiento para evaluar el efecto alucinógeno, así como para evaluar la sintomatología positiva asociada con la psicosis en roedores (González-Maeso *et al.*, 2003, 2007, 2008). De forma clásica, la región cerebral implicada en la respuesta de *head-twitch* inducida tras la administración de (\pm)-DOI es la corteza prefrontal (Willins y Meltzer, 1997). En humanos, la administración de fármacos antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} es capaz de disminuir los efectos psicoactivos de los alucinógenos (Freedman, 1986). Además, los cambios en la funcionalidad de estos receptores 5-HT_{2A} parecen ser importantes en las alteraciones que se producen a nivel comportamental y en diferentes trastornos neuropsiquiátricos (Hamada *et al.*, 1998).

No existen muchos estudios que relacionen esta prueba comportamental con el sistema cannabinoide, no obstante, los resultados son coincidentes con los observados en este proyecto. Darmani (2001) ha observado que cannabinoides de distintas estructuras (Delta(9) THC, delta(8) THC, HU-210, CP55, 940 y WIN55,212-2), administrados de manera aguda antes de la prueba, son capaces de

inhibir la frecuencia de *head-twitch* inducida por (\pm)-DOI de manera dependiente de dosis. De modo análogo, se ha demostrado que el endocannabinoide anandamida inhibe la respuesta *head-twitch* inducida por (\pm)-DOI en ratones (Egashira *et al.* 2004). Parece plausible suponer que el hecho de no encontrar diferencias en la respuesta de *head twitch* tras la administración de (\pm)-DOI en ambos grupos, puede deberse al mayor periodo de tiempo transcurrido entre la última dosis de THC en nuestro estudio (varios días frente a minutos). Durante este tiempo, los animales metabolizan el THC del organismo y su acción sobre los receptores CB₁ disminuye, disminuyendo también su capacidad inhibitoria de *head-twitch*. Por otro lado, los estudios previos no presentan un tratamiento crónico, hecho que seguramente afecte de distinta manera al sistema endocannabinoide, así como al sistema glutamatérgico de los animales en esta prueba comportamental. En relación con estos resultados, experimentos posteriores mostraron una disminución significativa en la expresión proteica de este receptor (**Figura 5**). Estos resultados llevaron a sugerir que esta respuesta *head-twitch* no alterada podría ser debida a un aumento de la funcionalidad de 5-HT_{2A} y no de su densidad. De este modo, los animales tratados con THC habrían podido desarrollar una mayor funcionalidad de los receptores 5-HT_{2A} como consecuencia de una disminución en la densidad de estos, manteniendo de esta manera la funcionalidad de este tipo de receptores en su conjunto. Existen en la literatura diversos estudios en roedores en los que la administración de bloqueantes de este receptor modifica la funcionalidad 5-HT_{2A} sin alterar la densidad de este receptor (Meyer *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2006). No obstante, el bajo número de animales disponibles para realizar esta prueba comportamental pueden contribuir a que los resultados no sean del todo representativos.

5.2. EVALUACIÓN NEUROQUÍMICA *IN VITRO*

Tras la evaluación comportamental, se continuó con una evaluación neuroquímica mediante técnicas *in vitro*.

Los ratones tratados con THC presentaron una disminución significativa en la expresión proteica cortical del receptor 5-HT_{2A} con respecto al grupo control. En este contexto, existen diversos estudios en humanos que indican que los agonistas cannabinoideos regulan la actividad 5-HT_{2A} (Darmani, 2001; Mato *et al.*, 2007; Hill *et*

al., 2006; Franklin *et al.*, 2012). Además, se ha observado una desregulación de los receptores 5-HT_{2A} en roedores tras la administración de agonistas cannabinoides sintéticos, como el HU-210 (Hill *et al.*, 2006). Estos estudios, junto con el presente, contribuyen a sugerir la posibilidad de que la exposición crónica a cannabinoides pueda inducir la regulación de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal, variando su número y/o funcionalidad. En relación con la esquizofrenia, existen resultados contradictorios en lo que al receptor 5-HT_{2A} se refiere. Estudios de fijación de radioligandos han observado un aumento en la densidad de receptores 5-HT_{2A} a nivel cortical en cerebro humano *postmortem* de sujetos esquizofrénicos libres de tratamiento en comparación con individuos control (González-Maeso *et al.*, 2008). Sin embargo, existen numerosos estudios que concluyen que existe una disminución significativa de los receptores 5-HT_{2A} corticales en pacientes con esquizofrenia (Matsumoto *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2009; revisado en Dean, 2003). No obstante, es conveniente considerar la idea de que el tratamiento con THC no tiene por qué haber mimetizado los efectos de esta enfermedad en lo que al sistema serotoninérgico se refiere; ya que, como se ha comentado anteriormente, el consumo de cannabis no es un hecho causal directo de la enfermedad, sino un factor de riesgo más. Por otro lado, esta observación concordaría con los resultados comentados con anterioridad referentes a la respuesta *head-twitch*, en la cual no se observaron diferencias significativas.

Siguiendo con la cuantificación proteica, los animales tratados con THC presentaron un aumento no significativo en la expresión proteica de la proteína Akt1 en su forma forforilada. Por otro lado, no se observaron diferencias en la expresión proteica total de esta kinasa. Tal y como planteaba la hipótesis de este proyecto, uno de los posibles mecanismos implicados en esta regulación serotoninérgica podría estar relacionado con la funcionalidad de la kinasa Akt1, de manera que el cannabis podría regular los receptores 5-HT_{2A} en parte a través de esta vía. Existe diversidad de estudios que han relacionado el gen de esta proteína con la esquizofrenia, habiéndose confirmado en poblaciones europea, japonesa, china, irlandesa y británica, entre otras. (Schwab *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007; Thiselton *et al.*, 2008; Mathur *et al.*, 2010). Por otro lado, variaciones en el gen *Akt1* se han asociado al desarrollo de esquizofrenia en individuos consumidores de cannabis (Di Forti *et al.*

2012; van Winkel, 2011; van Winkel *et al.*, 2011). El gen *AKT1* codifica para una proteína kinasa que forma una parte integral de la cascada de señalización del receptor dopaminérgico en el estriado (Bozzi *et al.*, 2011). Se trata de una serina/treonina kinasa que se activa mediante fosforilación y cuya función es, entre muchas otras, la fosforilación de las dos subunidades (α y β) de la proteína GSK-3, causando su inactivación. Se ha observado que en ratones incapaces de fosforilar Akt1, existe un incremento significativo en la unión al receptor 5-HT_{2A} cortical (Saunders *et al.*, 2013). Estos datos sugieren que la fosforilación de Akt puede influir en la expresión cortical y la señalización del receptor 5-HT_{2A}. La regulación de esta kinasa se ha relacionado con diversas patologías mentales, como la esquizofrenia (Thiselton *et al.*, 2008). Se ha observado una reducción de Akt1 cortical en cerebros *postmortem* de pacientes esquizofrénicos en comparación con sujetos control (Emamian *et al.*, 2014). Por el contrario, estudios de *microarrays* no han encontrado cambios en los niveles de mRNA de Akt1 en tejido cerebral de sujetos esquizofrénicos (Horváth *et al.*, 2011). Asimismo, está descrito que los cannabinoides son capaces de activar *in vitro* la vía Akt actuando en los receptores CB₁ y CB₂ (Sánchez *et al.*, 2003). Además, la administración aguda de THC en ratones activa AKT1 *in vivo* en varias regiones cerebrales (Ozaita *et al.*, 2007). Estos estudios coincidirían con los resultados de este proyecto, en los que los animales tratados con THC se observa un aumento, aunque no significativo, de los niveles proteicos de Akt fosforilada/activada. Resultaría por tanto interesante aumentar el número de muestras con el fin de clarificar los resultados y sacar conclusiones estadísticamente significativas.

Durante los últimos años muchos estudios han mostrado evidencias de la participación de distintas vías de señalización en la esquizofrenia. En este trabajo nos hemos centrado en la vía Akt/GSK3. En relación con esta vía y con la kinasa de la que se ha hablado anteriormente, los animales tratados con THC mostraron una disminución no significativa en los niveles de expresión proteica de la proteína GSK3 β fosforilada en comparación con el grupo control. Los niveles de GSK3 β total fueron similares en ambos grupos. Ya existen varios estudios en los que se han observado cambios en la proteína y actividad de GSK3 β en diferentes tejidos de individuos esquizofrénicos (Koros y Dorner-Clossek, 2007). Asimismo, en la

literatura podemos encontrar varios análisis de cerebros *postmortem* de pacientes con esquizofrenia en los que se confirman unos niveles de fosforilación disminuidos de GSK3 β en la corteza frontal, así como niveles de mRNA en la corteza prefrontal dorsolateral (Emamian *et al.*, 2004; Kozlovsky *et al.*, 2004; Koros y Dorner-Clossek, 2007). Además, estudios farmacológicos han demostrado que la administración crónica de antipsicóticos fosforilan GSK3 β e inhiben su actividad (Emamian *et al.*, 2004; Koros y Dorner-Clossek, 2007). Del mismo modo, la administración aguda con antipsicóticos atípicos puede incrementar la fosforilación de GSK3 β en cerebro de ratón, tal y como evidencian el trabajo de Li *et al.* en 2007.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos en la cuantificación proteica de las formas total y fosforiladas de Akt1 y GSK3 β en corteza de ratón, podemos encontrar una ligera contradicción. Por un lado, la mayor activación de Akt en el grupo de ratones tratados con THC puede ser debida a la activación del receptor CB₁, ya que este es capaz de activar esta vía. Sin embargo, este hecho nos hace suponer que, de la misma manera, deberíamos encontrar unos niveles mayores de GSK3 β fosforilada, debido precisamente a la activación de esta vía. En nuestros resultados, no obstante, observamos una disminución de los niveles de GSK3 β fosforilada. Por otro lado, la mayoría de los estudios de la vía Akt/GSK en individuos esquizofrénicos muestran una menor activación de esta vía, presentando menor contenido y menor actividad de Akt, con una consecuente activación de GSK3 β por encontrarse esta última en estado desfosforilado. A pesar de los resultados algo discordantes entre los distintos estudios y el proyecto propio, es necesario apuntar que las diferencias en los niveles proteicos de estas dos proteínas no han sido significativas, por lo que parece interesante proseguir con más experimentos para clarificar los resultados. Para finalizar, también se considera importante destacar el hecho de que el tratamiento con THC no es un motivo único causante de esquizofrenia, por lo que las diferencias observadas en pacientes enfermos no tienen por qué replicarse en los ratones sometidos al tratamiento.

De modo adicional, se decidió estudiar los niveles de expresión proteica de la proteína ribosomal S6 en su forma total y fosforilada. Se observó así un aumento significativo en los niveles de expresión proteica de esta proteína en los ratones tratados con THC con respecto a su grupo control. Los niveles de expresión de

proteína total no se vieron afectados. Tal y como se ha comentado anteriormente, la proteína Akt es capaz de fosforilar GSK3 e inhibir su actividad. No obstante, Akt interviene en multitud de vías más. Una de ellas es la vía mTOR/p70S6K. El receptor de rapamicina de mamíferos (mTOR) es una serina/treonina kinasa que regula multitud de procesos intracelulares. La cascada de señalización de la que esta proteína forma parte, está relacionada con la regulación intracelular de la síntesis proteica, concretamente en la síntesis de proteínas relacionadas con el control de la morfología neuronal y la plasticidad sináptica. Esta proteína regula la supervivencia, diferenciación y el desarrollo de las neuronas. El crecimiento axónico, la arborización dendrítica y la sinaptogénesis dependen de una correcta actividad de mTOR. Varios estudios revelan que la actividad de la cascada mTOR está influenciada por multitud de factores extracelulares y ambientales implicados en la esquizofrenia. Por ello, existen razones para hipotetizar que una de las consecuencias de la disfunción de estos factores en la esquizofrenia es la alteración de la señalización mTOR y consecuente alteración en la síntesis proteica. La proteína mTOR se activa por fosforilación en respuesta a la activación de Akt, mediando así la fosforilación de kinasas de la proteína ribosomal S6, entre las que encontramos a p70S6K. Las evidencias que demuestran la participación de la señalización mTOR en la neuropatología de la esquizofrenia se basan en una serie de estudios que muestran que una disfunción de diversos activadores “aguas arriba” y agentes de estrés ambientales, previamente implicados con la esquizofrenia, pueden provocar una sobreactivación o una inhibición de la ruta de señalización. En relación con el cannabis, se ha demostrado que la activación del receptor cannabinoide CB₁ modula de modo transitorio la vía de señalización mTOR/p70S6K y la maquinaria de síntesis proteica en el hipocampo de ratón, mimetizando así las propiedades amnésicas del THC. Además, se ha observado una disminución de la fosforilación de p70S6K en ratones GABA-CB₁R KO y mediante el bloqueo NMDA (Puighermanal *et al.*, 2009). La kinasa p70S6 se encuentra formando parte, tal y como se ha comentado, de la ruta de señalización que incluye mTOR. mTOR puede activarse de distintas formas, activando así p70S6K. Esta proteína se encuentra en una ruta junto a la kinasa Akt. Por consiguiente, la activación de Akt activa mTOR, activando consecuentemente p70S6K. Es esta última kinasa la que tiene como sustrato la proteína ribosomal S6

cuyos niveles se han estudiado en este proyecto. Los resultados por tanto, evidencian una activación de esta vía en los animales tratados con THC. En relación con estos resultados, el estudio llevado a cabo por Meffre *et al.* en 2012 mostró un aumento de la actividad de la vía mTOR en la corteza de dos modelos animales de esquizofrenia. Asimismo, la rapamicina, fármaco al que mTOR es sensible, fue capaz de revertir los déficits cognitivos observados. Se concluye por tanto que el tratamiento con THC mimetiza los efectos observados en individuos esquizofrénicos en lo que a la vía mTOR se refiere.

6. CONCLUSIONES

1. Los ratones tratados de manera crónica con THC presentan un déficit en la inhibición prepulso de respuesta al sobresalto (PPI), mostrando así una alteración en el mecanismo de filtrado sensorimotor. Este déficit se acentúa mediante la administración aguda del fármaco propsicótico MK-801.
2. El fármaco propsicótico MK-801 provoca en los ratones una hipersensibilidad a nivel auditivo, independientemente de la presencia o ausencia del tratamiento con THC.
3. No se han hallado cambios estadísticamente significativos en la respuesta *head-twitch* tras la administración del fármaco alucinógeno agonista de los receptores 5-HT_{2A/2C} (\pm) DOI.
4. Los ratones tratados de manera crónica con THC presentan una menor expresión proteica del receptor 5-HT_{2A} en corteza en comparación con su respectivo grupo control.
5. No se han hallado cambios estadísticamente significativos en la expresión proteica cortical de la kinasa Akt total ni fosforilada. La forma fosforilada, no obstante, presenta una expresión proteica incrementada en la corteza de los ratones tratados con THC en comparación con su grupo control.
6. No se han hallado cambios estadísticamente significativos en la expresión proteica cortical de la isoforma β de la kinasa GSK3 total ni fosforilada. Asimismo, existe una disminución en la expresión cortical de GSK3- β en su forma fosforilada de los ratones tratados con THC en comparación con su grupo control.
7. No se han hallado cambios estadísticamente significativos en la expresión proteica de la proteína ribosomal S6 total en corteza de ratones tratados con THC. Sin embargo, los ratones tratados con THC presentan un aumento estadísticamente significativo en la expresión proteica cortical de la proteína en su forma fosforilada.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alimohamad, H., Rajakumar, N., Seah, YH. *et al.* **2005**. Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum. *Biol Psychiatry*. **57**(5): 533-542.

Andlin-Sobocki, P., Rössler, W. **2005**. Cost of psychotic disorders in Europe. *Eur J Neurol*. **12**(1): 74-77.

Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R. *et al.* **2002**. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ*. **325**(7374): 1212-1213.

Arseneault, L., Cannon, M., Witton, J. *et al.* **2004**. Causal association between cannabis and psychosis: examination of the evidence. *Br J Psychiatry*. **184**: 110-117.

Bajestan, SN., Sabouri, AH., Nakamura, M. *et al.* **2006**. Association of AKT1 haplotype with the risk of schizophrenia in Iranian population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. **141B**(4): 383-386.

Beaulieu, JM., Sotnikova, TD., Yao, WD. *et al.* **2004**. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviours mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**(14): 5099-5104.

Beaulieu, JM., Gainetdinov, RR., Caron, MG. **2007**. The Akt-GSK-3 signaling cascade in the actions of dopamine. *Trends Pharmacol Sci*. **28**(4): 166-172.

Beique, J.C., Imad, M., Mladenovic, L. *et al.* **2007**. Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **104**(23): 9870-9875.

Bhattacharyya, S., Morrison, PD., Fusar-Poli, P. *et al.* **2010**. Opposite effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on human brain function and psychopathology. *Neuropsychopharmacology*. **35**(3): 764-774.

Braff, DL., Geyer, MA., Swerdlow, NR. **2001**. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology* (Berl); **(156)**: 234-258.

Celada, P., Puig, M.V., Diaz-Mataix, L. *et al.* **2008**. The hallucinogen DOI reduces low-frequency oscillations in rat prefrontal cortex: reversal by antipsychotic drugs. *Biol Psychiatry*. **64**(5): 392-400.

Cohen, S. **1953**. The toxic psychoses and allied states. *Am J Med.* (15): 813-828.

Darmani, NA. **2001**. Cannabinoids of diverse structure inhibit two DOI-induced 5-HT(2A) receptor-mediated behaviors in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* **68**(2): 311-317.

Davis, M., Wagner, AR. **1969**. Habituation of startle response under incremental sequence of stimulus intensities. *J Comp Physiol Psychol.* (67): 486-492.

Di Forti, M., Morgan, C., Dazzan, P. *et al.* **2009**. High-potency cannabis and the risk of psychosis. *Br J Psychiatry.* **195**(6): 13.

Di Forti, M., Iyegbe, C., Sallis, H. *et al.* **2012**. Confirmation that the AKT1 (rs2494732) genotype influences the risk of psychosis in cannabis users. *Biol Psychiatry.* **15**(72(10)): 6.

Egashira, N., Mishima, K., Uchida, T. *et al.* **2004**. Anandamide inhibits the DOI-induced head-twitch response in mice. *Psychopharmacology* (Berl). **171**(4):382-9.

Eggan, SM., Hashimoto, T., Lewis, DA. **2008**. Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* **65**(7): 772-784.

Ehrenreich, H., Rinn, T., Kunert, HJ. *et al.* **1999**. Specific attentional dysfunction in adults following early start of cannabis use. *Psychopharmacology* (Berl). **142**(3):295-301.

Emamian, ES., Hall, D., Birnbaum, MJ. *et al.* **2004**. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet.* **36**(2): 131-137.

Emamian, ES. **2012**. AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia. *Front Mol Neurosci.* **15**: 5:33.

EMASS Collaborative Group. European Multicentre Association Study of Schizophrenia. *Lancet.* **349**(9060): 1221.

Emrich, H.M., Leweke, F.M., Schneider, U. **1997**. Towards a cannabinoid hypothesis of schizophrenia: cognitive impairments due to dysregulation of the endogenous cannabinoid system. *Pharmacol Biochem Behav.* **56**(4): 803-807.

Fernandez-Ruiz, J., Gomez, M., Hernandez, M. *et al.* **2004**. Cannabinoids and gene expression during brain development. *Neurotox Res.* **6**(5): 389-401.

Frame, S., Cohen, P. **2001**. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J.* **359**(Pt 1): 1-16.

Franklin, JM., Carrasco, GA. **2012**. Cannabinoid-induced enhanced interaction and protein levels of serotoninine 5-HT(2A) and dopamine D₂ receptors in rat prefrontal cortex. *J Psychopharmacol.* **26**(10): 1333-1347.

Geyer, M.A., Vollenweider, F.X. **2008**. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends Pharmacol Sci.* **29**(9): 445-453.

Tournier, BB., Ginovart, N. **2014**. Repeated but not acute treatment with Δ (9)-tetrahydrocannabinol disrupts prepulse inhibition of the acoustic startle: Reversal by

the dopamine D2/3 receptor antagonist haloperidol. *Eur Neuropsychopharmacol.* 24(8):1415-23.

Gonzalez-Maeso, J., Weisstaub, N.V., Zhou, M. *et al.* **2007**. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron.* **53**(3): 439-452.

Gonzalez-Maeso, J., Ang, R.L., Yuen, T. *et al.* **2008**. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature.* **452**(7183): 93-97.

Green, AI., Drake, RE., Brunette, MF. *et al.* **2007**. Schizophrenia and co-occurring substance use disorder. *Am J Psychiatry.* **164**(3): 402-408.

Grimes, CA., Jope, RS. **2001**. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* **65**(4): 391-426.

Gururajan, A., van den Buuse, M. **2014**. Is the mTOR- cascade signalling disturbed in schizophrenia? *J Neurochem.* **129**(3):377-87.

Harkany, T., Keimpema, E., Barabas, K. *et al.* **2008**. Endocannabinoids functions controlling neuronal specification during brain development. *Mol Cell Endocrinol.* **286**(1-2 Suppl 1): S84-90.

Henquet, C., Krabbendam, L., Spauwen, J. *et al.* **2005**. Prospective cohort study of cannabis use, predisposition for psychosis, and psychotic symptoms in young people. *BMJ.* **330**(7481): 11.

Hill, MN., Sun, JC., Tse, MT. *et al.* **2006**. Altered responsiveness of serotonin receptor subtypes following long-term cannabinoid treatment. *Int J Neuropsychopharmacol.* **9**(3): 277-286.

Hollister, LE. **1964**. Chemical psychoses. *Annu Rev Med.* (15): 203-214.

Ikeda, M., Iwata, N., Suzuki, T. *et al.* **2004**. Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population. *Biol Psychiatry*. **56**(9): 698-700.

Inayama, Y., Yoneda, H., Sakai, T. *et al.* **1996**. Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet*. **67**(1): 103-105.

Jernigan, CS., Goswami, DB., Austin, MC. *et al.* **2011**. The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **35**(7): 1774-9.

Kang, UG., Seo, MS., Roh, MS. *et al.* **2004**. The effects of clozapine on the GSK-3-mediated signalling pathway. *FEBS Lett*. **560**(1-3): 115-119.

Kitagishi, Y., Kobayashi, M., Kikuta, K. *et al.* **2012**. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signalling of Mental Illnesses. *Depress Res Treat*. **2012**: 752563.

Konings, M., Henquet, C., Maharajh, HD. *et al.* **2008**. Early exposure to cannabis and risk for psychosis in young adolescents in Trinidad. *Acta Psychiatr Scand*. **118**(3): 209-213.

Kozlovsky, N., Amar, S., Belmaker, RH. *et al.* **2006**. Psychotropic drugs affect Ser9-phosphorylated GSK-3 beta protein levels in rodent frontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol*. **9**(3): 337-342.

Marek, G.J., Wright, R.A., Gewirtz, J.C. *et al.* **2001**. A major role for thalamocortical afferents in serotonergic hallucinogen receptor function in the rat neocortex. *Neuroscience*. **105**(2): 379-392.

Meffre, J., Chaumont-Dubel, S., Mannoury la Cour, C. *et al.* **2012**. 5-HT(6) receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol Med*. **4**(10): 1043-56.

Meyer, JH., Kapur, S., Eisfeld, B. *et al.* **2001**. The effect of paroxetine on 5-HT_{2A} receptors in depression: an [¹⁸F]setoperone PET imaging study. *Am J Psychiatry* (158): 78-85.

Lai, WS., Xu, B., Westphal, KG. *et al.* **2006**. Akt deficiency affects neuronal morphology and predisposes to abnormalities in prefrontal cortex functioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**(45): 16906-16911.

Lei, G., Xia, Y., Johnson, KM. **2008**. The role of Akt-GSK-3 β signalling and synaptic strength in phencyclidine-induced neurodegeneration. *Neuropsychopharmacology*. **33**(6): 1343-1353.

Mathers, D.C., Ghodse, A.H. **1992**. Cannabis and psychotic illness. *Br J Psychiatry*. **161**: 648-653.

Mathur, A., Law, MH., Megson, IL. *et al.* **2010**. Genetic association of the AKT1 gene with schizophrenia in a British population. *Psychiatr Genet*. **20**(3): 118-122.

Mato, S., Aso, E., Castro, E. *et al.* **2007**. CB1 knockout mice display impaired functionality of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/C} receptors. *J Neurochem*. **103**(5): 2111-2120.

Meltzer, H.Y. **2002**. Suicidality in schizophrenia: a review of the evidence for risk factors and treatment options. *Psychiatry Rep*. **4**(4): 279-283.

Moore, TH., Zammit, S., Lingford-Hughes, A. *et al.* **2007**. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet*. **370**(9584): 319-328.

Muguruza, C., Moreno, J.L., Umali, A. *et al.* **2013**. Dysregulated 5-HT_{2A} receptor binding in postmortem frontal cortex of schizophrenic subjects. *Eur Neuropsychopharmacol*. **56**(4): 803-807.

van Os, J., Bak, M., Hanssen, M. *et al.* **2002**. Cannabis use and psychosis: a longitudinal population-based study. *Am J Epidemiol.* **15**(156(4)): 28.

Palmer, B.A., Pankratz, V.S., Bostwick, J.M. **2005**. The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. *Arch Gen Psychiatry.* **62**(3): 247-253.

Pietilainen, OP., Paunio, T., Loukola, A. *et al.* **2009**. Association of AKT1 with verbal learning, verbal memory, and regional cortical gray matter density in twins. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* **150B**(5): 683-692.

Puig, M.V., Celada, P., Diaz-Mataix, L. *et al.* **2003**. In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex.* **13**(8): 870-882.

Rubino, T., Parolaro, D. **2008**. Long lasting consequences of cannabis exposure in adolescence. *Mol Cell Endocrinol.* **286**(1-2 Suppl 1): S108-113.

Salles, MJ., Hervé, D., Rivet, JM. *et al.* **2013**. Transient and rapid activation of Akt/GSK-3 β and mTORC1 signaling by D3 dopamine receptor stimulation in dorsal striatum and nucleus accumbens. *J Neurochem.* **125**(4): 532-44.

Schwab, SG., Hoefgen, B., Hanses, C. *et al.* **2005**. Further evidence for association of variants in the AKT1 gene with schizophrenia in a sample of European sib-pair families. *Biol Psychiatry.* **58**(6): 446-450.

Semple, DM., McIntosh, AM., Lawrie, SM. **2005**. Cannabis as a risk factor: systematic review. *J Psychopharmacol.* **19**(2): 187-194.

Sistema Nacional de salud. *Inf Ter Sist Nac Salud* **2010**; 34:4.

Smit, F., Bolier, L., Cuijpers, P. **2004**. Cannabis use and the risk of later schizophrenia: a review. *Addiction.* **99**(4):425-430.

Stefanis, NC., Delespaul, P., Henquet, C. *et al.* **2004**. Early adolescent cannabis exposure and positive and negative dimensions of psychosis. *Addiction*. **99**(10): 1333-1341.

Stiglick, A., Kalant, H. **1985**. Residual effects of chronic cannabis treatment on behavior in mature rats. *Psychopharmacology (Berl)*:**85**(4): 436-9.

Swerdlow, NR., Weber, M., Qu, Y. *et al.* **2008**. Realistic expectations of prepulse inhibition in translational models for schizophrenia research. *Psychopharmacology (Berl)*: (199):331-388.

Thiselton, DL., Vladimirov, VI., Kuo, PH. *et al.* **2008**. AKT1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families. *Biol Psychiatry*. **63**(5): 449-457.

Thornicroft, G. **1990**. Cannabis and psychosis. *Br J Psychiatry*. **157**: 25-33.

Urigüen, L., Garcia-Fuster, MJ., Callado, LF. *et al.* **2009**. Immunodensity and mRNA expression of A2A adenosine, D2 dopamine, and CB1 cannabinoid receptors in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: effect of antipsychotic treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. **206**(2): 313-324.

Urigüen, L., Gil-Pisa, I., Munarriz-Cuevza, E. *et al.* **2013**. Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia. *Transl Psychiatry*. **3**(1): e221.

Vollenweider, F.X., Vollenweider-Scherpenhuyzen, M.F., Babler, A. *et al.* **1998**. Psilocybin induces schizophrenia-like psychosis in humans via a serotonin-2 agonist action. *Neuroreport*. **9**(17): 3897-3902.

Williams, J., McGuffin, P., Nothen, M. *et al.* **1997**. Meta-analysis of association between the 5-HT2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia.

van Winkel, R. **2011**. Family-based analysis of genetic variation underlying psychosis-inducing effects of cannabis:sibling analysis and proband follow-up. *Arch Gen Psychiatry*. **68**(2): 148-157.

van Winkel, R., van Beveren, N.J., Simons, C. **2011**. AKT1 moderation of cannabis-induced cognitive alterations in psychotic disorder. *Neuropsychopharmacology*. **36**(12): 2529-2537.

World Health Organization. **2001**.

Xu, M.Q., Xing, Q.H., Zheng, Y.L. *et al.* **2007**. Association of AKT1 polymorphisms with risk of schizophrenia and with response to antipsychotics in the Chinese population. *J Clin Psychiatry*. **68**(9): 1358-1367.

Yamauchi, M., Miyara, T., Matsushima, T. *et al.* **2006**. Desensitization of 5-HT_{2A} receptor function by chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res* (1067):164-169.

Zammit, S., Allebeck, P., Andreasson, S. *et al.* **2002**. Self reported cannabis use as a risk factor for schizophrenia in Swedish conscripts of 1969: historical cohort study. *SBMJ*. **325**(7374): 1199.

Zhao, Z., Ksiezak-Reding, H., Riggio, S. *et al.* **2006**. Insulin receptor deficits in schizophrenia and in cellular and animal models of insulin receptor dysfunction. *Schizophr Res*. **84**(1): 1-14.