



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD 2ª ANUALIDAD 3ª ANUALIDAD FINAL

Nº Expediente: 20111043

Investigador principal: JORGE MANZANARES ROBLES

Otros investigadores:

M^a SALUD GARCÍA GUTIÉRREZ, DOCTORA EN FARMACIA, PROFESOR AYUDANTE DOCTOR, DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y QUÍMICA ORGÁNICA, UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE.

FRANCISCO NAVARRETE RUEDA, DOCTOR EN FARMACIA, INVESTIGADOR CONTRATADO RED DE TRASTORNOS ADICTIVOS (RETICS).

M^a AUXILIADORA ARACIL FERNÁNDEZ, PROFESOR ASOCIADO, DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y QUÍMICA ORGÁNICA, UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE.

Título del Proyecto o subproyecto: "CARACTERIZACIÓN NEUROBIOLÓGICA Y CONDUCTUAL INDUCIDA POR SEPARACIÓN MATERNAL Y VULNERABILIDAD POR EL CONSUMO DE ALCOHOL EN LA PUBERTAD DE ROEDORES"

Título del Proyecto Coordinador en el que se integra (sólo en caso de ser un subproyecto): "EXPERIENCIAS TRAUMÁTICAS INFANTILES COMO FACTOR DE VULNERABILIDAD PARA EL CONSUMO DE ALCOHOL DURANTE LA ADOLESCENCIA"

Organismo: UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Centro: INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS

Departamento: LABORATORIO JORGE MANZANARES

Área temática: ALCOHOL Y MENORES. CONDICIONES DE VIDA Y CONSUMO DE ALCOHOL. VISIÓN INTEGRADA DEL CONSUMO DE ALCOHOL EN MENORES.

Palabras clave: SEPARACIÓN MATERNAL, ROEDORES, ADOLESCENCIA, AUTOADMINISTRACIÓN DE ETANOL, Rt-PCR.

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

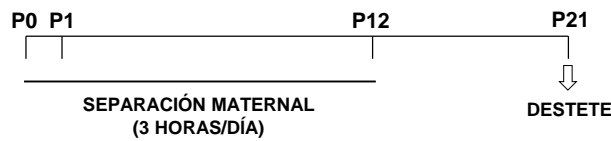
El consumo problemático de alcohol en los adolescentes ha aumentado de manera preocupante en los últimos años. La edad de inicio de consumo de alcohol se encuentra estrechamente relacionada con el desarrollo de problemas de abuso y dependencia de alcohol en la etapa adulta. Los factores relacionados con el inicio del consumo de alcohol en la adolescencia, su abuso y posible dependencia son muy variados, habiéndose propuesto la existencia de multitud de marcadores genéticos y ambientales que podrían representar indicadores de vulnerabilidad por el consumo de alcohol. En este sentido, la exposición a situaciones de maltrato durante la infancia se considera un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos por uso de alcohol durante la adolescencia y la edad adulta. De estos hechos se desprende la necesidad de profundizar en el estudio de las consecuencias conductuales y neurobiológicas del maltrato infantil que subyacen al desarrollo de problemas relacionados con el consumo de alcohol. La caracterización de las características psicofisiológicas (sesgo atencional, impulsividad, reactividad emocional) junto con la posible identificación de alteraciones neurobiológicas asociadas al maltrato infantil pueden proporcionar una herramienta muy valiosa para diseñar estrategias de prevención en el tratamiento del consumo excesivo de alcohol y de la dependencia en edad adolescente.

El presente proyecto traslacional se ha centrado en el estudio de este problema desde una perspectiva clínica y otra básica, imprescindible para averiguar con más detalle qué alteraciones neurobiológicas subyacen a todos los procesos implicados. Durante el periodo de disfrute del presente proyecto, las investigaciones llevadas a cabo por el grupo de investigación básico-experimental dirigido por el Dr. Jorge Manzanares, han ido encaminadas a poder caracterizar las alteraciones conductuales



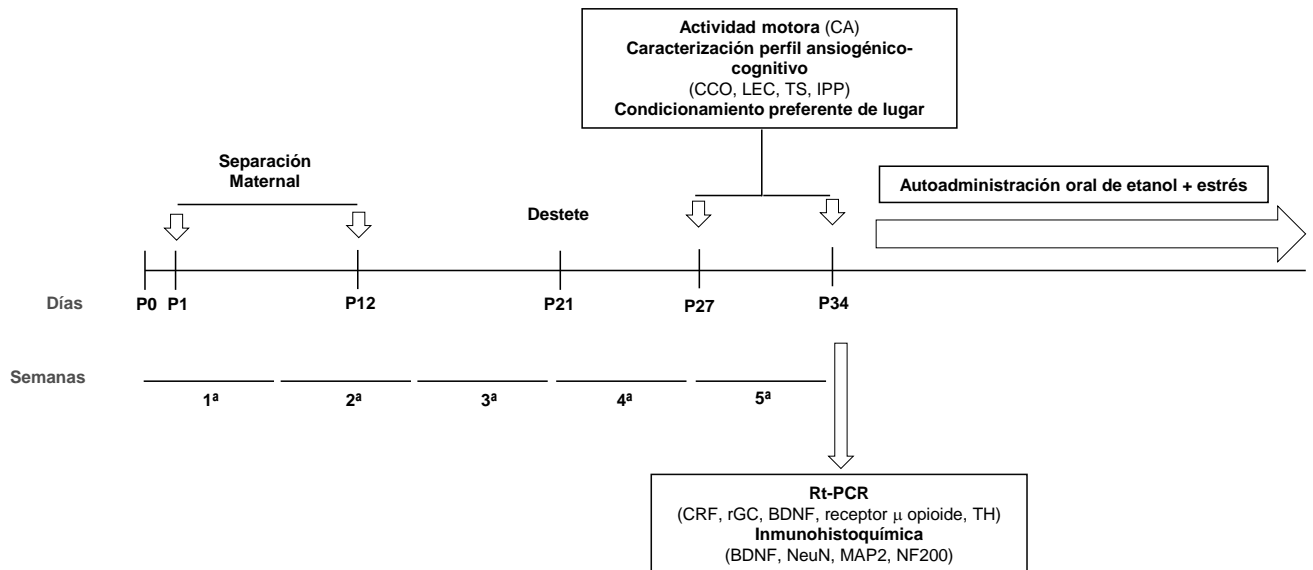
(sesgo atencional, impulsividad, control inhibitorio) y neurobiológicas (dianas implicadas de los sistemas de recompensa, del estrés, factores tróficos) de animales adolescentes expuestos al modelo de separación maternal durante la etapa postnatal, y relacionar dichas características con el patrón de bebida, el refuerzo y la motivación en modelos de experimentación como la autoadministración de etanol.

El modelo de separación maternal se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en la memoria original del proyecto. Las hembras C57BL/6J en la fase final de la gestación fueron monitorizadas dos veces al día para controlar el momento del parto. El día del parto fue considerado el día 0 postnatal (P0). Al día siguiente P1 (día postnatal 1), el número de crías se estandarizó a 10 por jaula, para igualar la n y reducir la variabilidad entre grupos. La mitad de las crías de cada jaula fue separada de la madre 3 horas diarias (de 09:00 a 12:00h) desde el P1 hasta el P14. Durante la separación de la madre, cada camada se alojó en una jaula situada encima de una manta eléctrica que mantendrá la temperatura a 32-34°C para evitar hipotermia en las crías. Pasadas las 3 horas, las crías fueron devueltas al nido junto con sus progenitores (Cruz et al, 2008). Las crías pertenecientes al grupo control sólo fueron manipuladas una vez por semana coincidiendo con la limpieza de la jaula. En el P21 las crías fueron destetadas, distribuyéndose en jaulas de 6 ratones.



Esquema representativo del modelo de separación maternal

A la edad adolescente se realizaron las pertinentes pruebas de conducta, siguiendo el siguiente esquema:



Esquema representativo del cronograma seguido

P: día postnatal. CA: Campo abierto. CCO: Caja clara-oscura. LEC: Laberinto elevado en cruz. TS: test de suspensión por la cola. IPP: prueba de inhibición prepulso. Rt-PCR: PCR a tiempo real. CRF: factor liberador de corticotropina. rGC: receptor de glucocorticoides. TH: tirosina hidroxilasa. BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro. NeuN: proteína del núcleo específica de neuronas. MAP-2: proteína del citoesqueleto específica de neuronas. NF200: neurofilamento NF200.

Para la realización de las diferentes pruebas de conducta se emplearon diferentes camadas de ratones separados maternalmente. Previamente a la realización de la correspondiente prueba de conducta se realizaron diferentes pruebas basales (CCO y/o LEC) para comprobar la reproducibilidad del modelo de separación maternal empleado.

Caracterización del perfil ansiogénico-cognitivo:

Inicialmente se evaluó la actividad motora mediante la prueba del *campo abierto* (García-Gutiérrez and Manzanares, 2011). No se observaron diferencias en ninguno de los parámetros analizados (distancia total (Figura 1A), periférica (Figura 1B) y central (Figura 1C) recorridas) entre los ratones separados maternalmente (MS) y su control no separados maternalmente (NMS). Estos resultados indican que los ratones MS no presentan ninguna alteración en la actividad motora que pudiera enmascarar los resultados que se obtienen en el resto de pruebas realizadas.

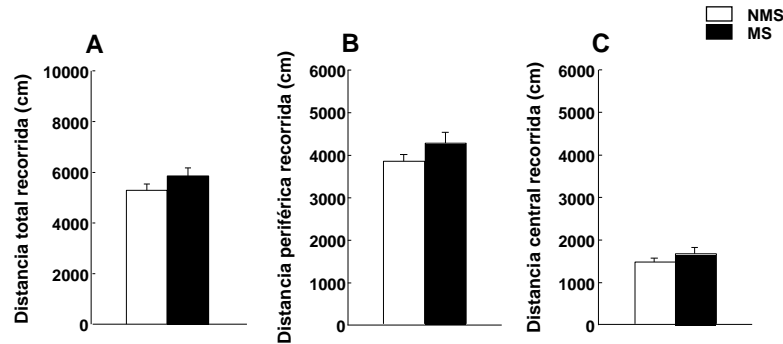


Figura 1: Evaluación de la actividad motora en el campo abierto.

Seguidamente se evaluaron los efectos de la separación maternal sobre el perfil ansiogénico-cognitivo. En primer lugar, se estudió la respuesta de los ratones MS ante estímulos ansiogénicos en la prueba de la *caja clara-oscura* y del *laberinto elevado en cruz*. Los resultados muestran que los ratones MS presentan mayor ansiedad como puede observarse por el menor tiempo de permanencia en la caja clara (Figura 2A) y en los brazos abiertos (Figura 2C) en comparación con sus controles NMS.

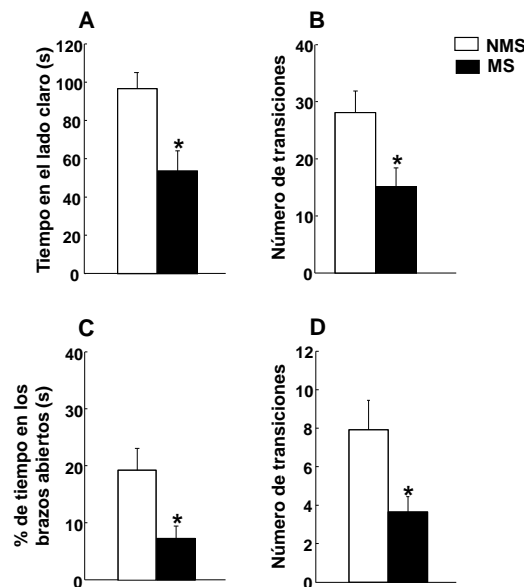


Figura 2. Evaluación de la respuesta en la caja clara-oscura y en el laberinto elevado en cruz. Se evaluó durante 5 minutos el tiempo de permanencia en el lado claro (A) o en los brazos abiertos (C) de los ratones separados maternalmente así como el número de transiciones entre ambos compartimientos o brazos (B y D, respectivamente). NMS: ratones no separados maternalmente. MS: ratones separados maternalmente. (*) Valores estadísticamente significativo del grupo MS en comparación con su control NMS.

Adicionalmente, se evaluó la respuesta de los ratones MS frente a estímulos que promueven un estado depresivo en el test de la suspensión por la cola. Los ratones MS presentan un mayor tiempo de inmovilidad en comparación con sus controles NMS (Figura 3).

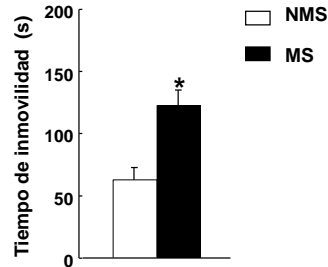


Figura 3. Evaluación de la respuesta en el test de suspensión por la cola.
NMS: ratones no separados maternalmente. MS: ratones separados maternalmente.
(*) Valores estadísticamente significativo del grupo MS en comparación con su control NMS.

De manera complementaria, se realizó una evaluación cognitiva (pre-atención) mediante el empleo de la prueba de inhibición prepulso. Los resultados muestran cómo los ratones MS presentan un menor % de inhibición prepulso en todas las intensidades de prepulso (74, 82 y 90 dB) analizadas. Este resultado es indicativo de un déficit en el proceso de inhibición prepulso en los ratones MS, que se relaciona con déficit pre-atencional.

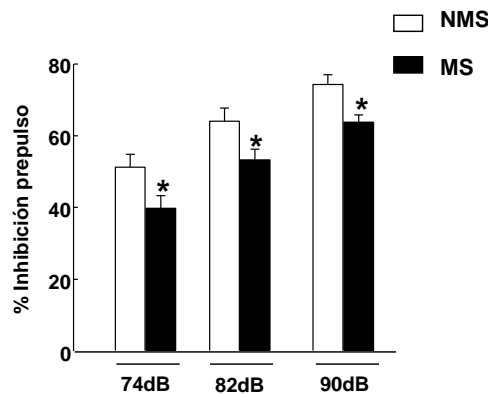


Figura 4. Evaluación cognitiva (pre-atención) en la prueba inhibición prepulso.
NMS: ratones no separados maternalmente. MS: ratones separados maternalmente.
(*) Valores estadísticamente significativo del grupo MS en comparación con su control NMS.

Se evaluó también el condicionamiento de preferencia de lugar por alcohol, sin observarse diferencias entre los ratones MS y sus controles NMS.

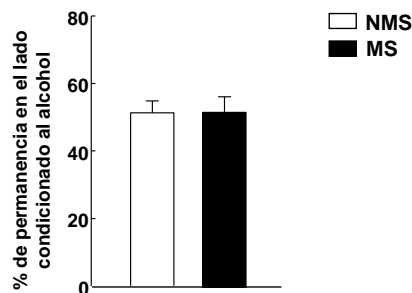


Figura 5. Condicionamiento preferente de lugar.
NMS: ratones no separados maternalmente. MS: ratones separados maternalmente.

Caracterización neuroquímica: estudios cerebrales

Mediante estudios de PCR a tiempo real (Rt-PCR) se evaluó la expresión génica de factores relacionados con la respuesta al estrés (factor liberador de corticotropina (CRF) y receptor de glucocorticoides (rGC)), propiedades reforzantes de etanol (receptor μ -opioide, tirosina hidroxilasa (TH)) y neurogénesis (factor liberador de neurogénesis (BDNF)) en los ratones MS en relación a sus controles NMS.

Los ratones MS presentan un aumento estadísticamente significativo de la expresión génica de CRF en el núcleo paraventricular (Pvn) (Figura 5A), y una reducción de la expresión génica de rGC en el hipocampo (Hip) (Figura 5B) en comparación con sus controles no separados maternalmente. Estos resultados indican que los ratones separados maternalmente presentan una alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, principal sistema implicado en la respuesta al estrés.

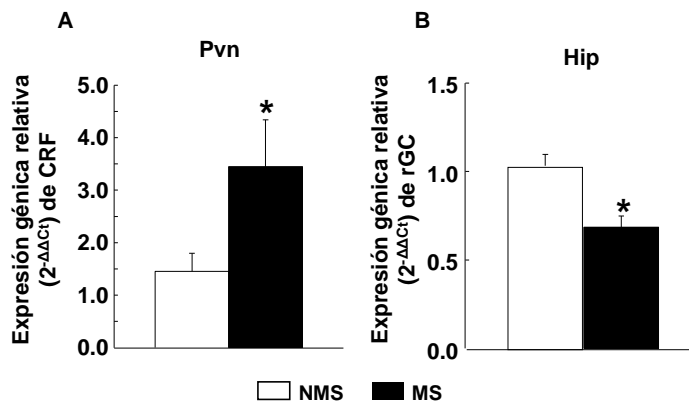


Figura 6. Expresión génica de CRF y rGC en el núcleo paraventricular (Pvn) y en el hipocampo (Hip) de ratones separados maternalmente y sus controles. NMS: ratones no separados maternalmente. MS: ratones separados maternalmente. (*) Valores estadísticamente significativo del grupo MS en comparación con su control NMS.

Asimismo, se observó un incremento significativo de la expresión génica de dos de las principales dianas relacionadas con la adicción al alcohol, el receptor μ -opioide y la TH, en el núcleo accumbens (NAc) y en el área tegmental ventral (VTA) de los ratones que habían sido sometidos a la separación maternal en relación a sus controles no separados maternalmente.

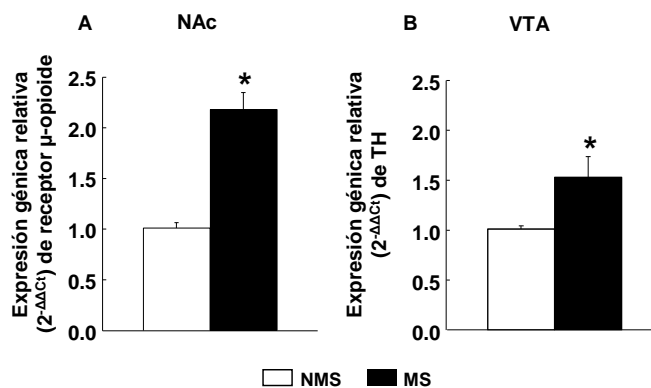


Figura 7. Expresión génica de receptor μ -opioide y de la tirosina hidroxilasa (TH) en el Núcleo Accumbens (NAc) y en el área tegmental ventral (VTA) de ratones separados maternalmente y sus controles. NMS: ratones no separados maternalmente. MS: ratones separados maternalmente. (*) Valores estadísticamente significativo del grupo MS en comparación con su control NMS.

Por último, se observó una reducción de la expresión génica de la neurotrofina BDNF en el HIP de ratones separados maternalmente en comparación con sus controles no separados maternalmente.

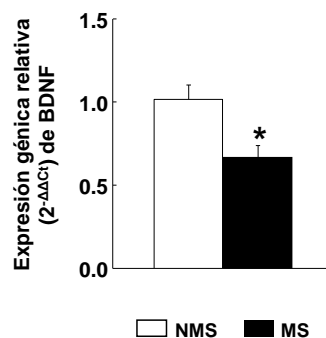


Figura 8. Expresión génica de BDNF en el hipocampo (Hip) de ratones separados maternalmente y sus controles. NMS: ratones no separados maternalmente. MS: ratones separados maternalmente. (*) Valores estadísticamente significativo del grupo MS en comparación con su control NMS.

Conjuntamente, los resultados indican que la separación maternal durante la infancia produce cambios en la adolescencia en genes relacionados con la respuesta al estrés (CRF, rGC), adicciones (receptor μ -opioide, TH) y neurogénesis (BDNF) que podrían explicar, al menos en parte, la mayor vulnerabilidad de los ratones separados maternalmente por el consumo de alcohol.

De manera complementaria se analizó la expresión de marcadores relacionados con neuroplasticidad (BDNF, proteína del citoesqueleto específica de neuronas (MAP-2), neurofilamento NF200 (NF-200) y proteína nuclear específica de neuronas (NeuN)) mediante inmunohistoquímica en el Hip de ratones separados maternalmente. Los resultados muestran un menor marcaje de BDNF, NeuN, MAP2 y NF200 en el HIP de los ratones separados maternalmente en relación a sus controles no separados maternalmente. Conjuntamente estos resultados podrían ser indicativos de alteraciones en la reorganización dendrítica y en las conexiones sinápticas del HIP de los ratones separados maternalmente.

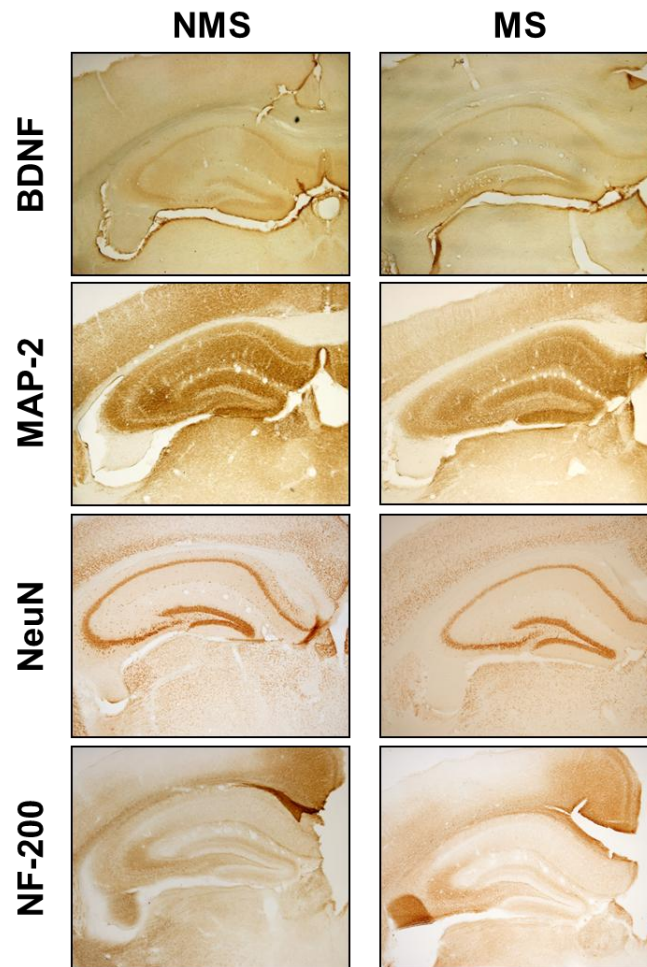
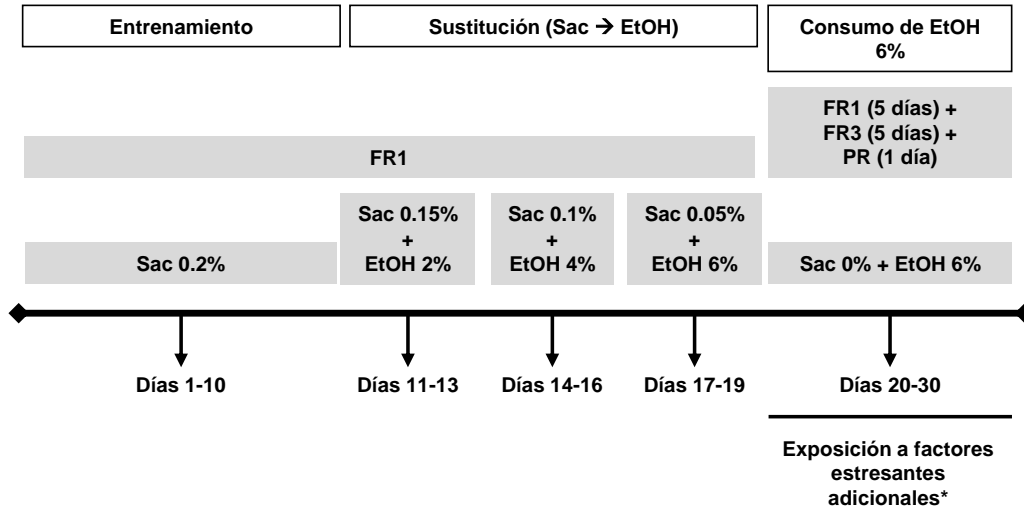


Figura 9. Imágenes representativas de la inmunohistoquímica de BDNF, MAP-2, NeuN y NF-200 en el Hip de ratones separados maternalmente y sus controles. NMS: ratones no separados maternalmente. MS: ratones separados maternalmente. BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro. MAP-2: proteína del citoesqueleto específica de neuronas. NF200: neurofilamento NF200. NeuN: proteína del núcleo específica de neuronas.



Efectos de la separación maternal, solo o en combinación con la exposición a factores estresantes adicionales, sobre la vulnerabilidad por el consumo de etanol durante la adolescencia:

Las situaciones de maltrato infantil se relacionan con alteraciones en la respuesta frente a distintos factores o situaciones de estrés durante la adolescencia, que podría contribuir a la mayor vulnerabilidad que presentan estos adolescentes por el consumo de alcohol. En este sentido, se ha evaluado si la separación maternal ocurrida durante la infancia modifica los efectos de la exposición durante la adolescencia a diferentes factores sobre la vulnerabilidad por el consumo de etanol. Con este objetivo, se evaluaron los efectos de la separación maternal y su combinación con exposición a factores estresantes sobre la vulnerabilidad por el consumo de alcohol en la adolescencia mediante la prueba de autoadministración oral de etanol siguiendo el siguiente esquema:

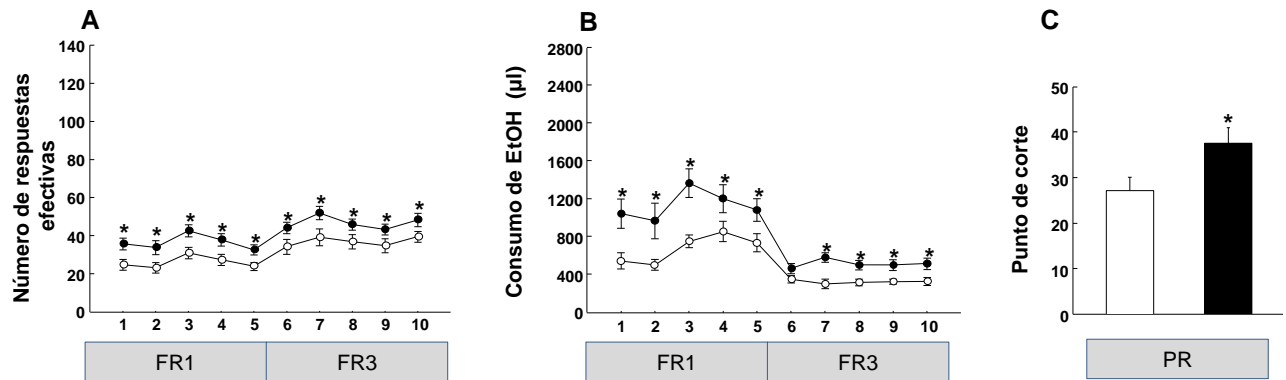


(*) Cronograma de exposición a factores estresantes adicionales:

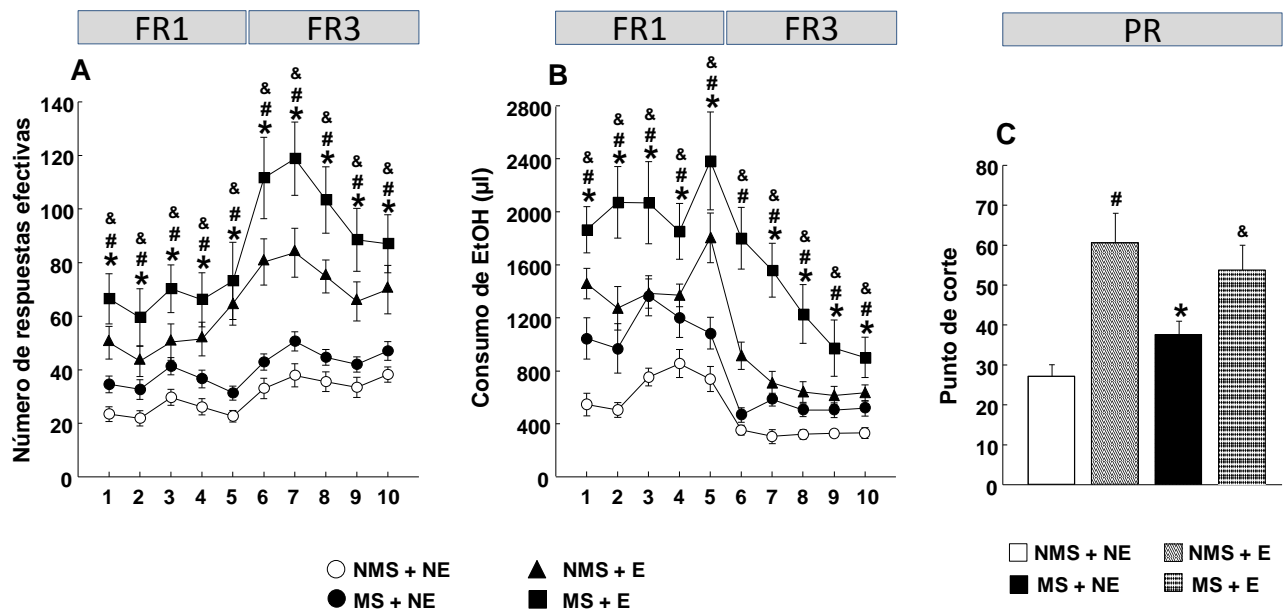
	DÍA POSTNATAL	MAÑANA	TARDE
FR1	PND47	RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO (20 minutos)	JAULA INCLINADA 45° (12horas)
	PND48	JAULA INCLINADA 45° (12 horas)	LUZ ESTROBOSCOPICA (18:00-20:00 pm)
	PND49	LECHO HÚMEDO (20 minutos)	RUIDO (18:00-20:00 pm)
	PND50	PIENSO SUCIO PROCEDENTE DE RATAS (20 minutos)	JAULA INCLINADA 45° (12horas)
	PND51	JAULA INCLINADA 45° (12 horas)	LUZ ESTROBOSCOPICA (18:00-20:00 pm)
FR3	PND52	RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO (20 minutos)	JAULA INCLINADA 45° (12horas)
	PND53	JAULA INCLINADA 45° (12 horas)	LUZ ESTROBOSCOPICA (18:00-20:00 pm)
	PND54	LECHO HÚMEDO (20 minutos)	RUIDO (18:00-20:00 pm)
	PND55	PIENSO SUCIO PROCEDENTE DE RATAS (20 minutos)	JAULA INCLINADA 45° (12 horas)
	PND56	JAULA INCLINADA 45° (12horas)	LUZ ESTROBOSCOPICA (18:00-20:00 pm)
PR	PND57	RESTRICCIÓN DE MOVIMIENTO (20 minutos)	



Los ratones separados maternalmente presentan un mayor número de respuestas efectivas (A) y mayor consumo de etanol (B) en FR1 y FR3 en comparación con sus controles no separados maternalmente. Asimismo, presentan un mayor punto de corte, es decir, son capaces de accionar la palanca mayor número de veces para obtener un refuerzo. Por lo tanto, la separación maternal aumenta el consumo de etanol y la motivación por el consumo de etanol.



La exposición al estrés durante la adolescencia aumenta la vulnerabilidad por el consumo de alcohol tanto en los ratones separados maternalmente como en los ratones no separados maternalmente. Es relevante destacar, que el efecto del estrés es superior en los ratones separados maternalmente como puede observarse en las siguientes gráficas:



NMS+NE: Ratones no separados maternalmente y no estresados; NMS+E: Ratones no separados maternalmente y estresados;
MS+NE: Ratones separados maternalmente y no estresados; MS+E: Ratones separados maternalmente y estresados.

En conclusión, los resultados del presente proyecto indican que la separación maternal ocurrida durante la infancia aumenta la vulnerabilidad por el consumo de etanol en la adolescencia. Esta afirmación viene abalada por 1) el mayor consumo de alcohol y motivación por el consumo de alcohol de los ratones adolescentes separados maternalmente en la prueba de autoadministración oral de etanol, 2) el aumento de los efectos del estrés sobre el consumo de alcohol y la motivación por el alcohol en los ratones adolescentes separados maternalmente en la prueba de autoadministración oral de etanol, 3) mayor ansiedad y déficit atencional en los ratones adolescentes separados maternalmente, y 4) alteraciones en los principales dianas relacionadas con la respuesta al estrés (CRF, rGC), adicción (receptor μ -opioides, TH) y neuroplasticidad (BDNF, NeuN, MAP2 y NF200).



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

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

María S. García-Gutiérrez, Francisco Navarrete, Auxiliadora Aracil, Adrián Bartoll, Isabel Martínez-Gras, José L. Lanciego, Gabriel Rubio and Jorge Manzanares. *Increased vulnerability to ethanol consumption in adolescent maternal separated mice.* **Addiction Biology** (2015) (en prensa) PMID: 25988842

M.J. Alvarez-Alonso, R. Jurado-Barba, N. Martinez-Martin, JC Espin-Jaime, C. Bolaños-Porrero, A. Ordoñez-Franco, J.A. Rodriguez-Lopez, D. Lora-Pablos, J. de la Cruz-Bértolo, M.A. Jimenez-Arriero, J. Manzanares and G. Rubio. *Association between maltreatment and polydrug use among adolescents.* **Child Abuse and Neglect** (2015) (en prensa) PMID: 26318780.

OBJETIVOS

PLANTEADOS: (Transcribir los del proyecto original)

OBJETIVOS GENERALES

- Estudiar el efecto de la separación maternal como método de maltrato infantil sobre la vulnerabilidad por el consumo de alcohol en edad adolescente en el roedor.
- Identificar las alteraciones psicofisiológicas (sesgo atencional, impulsividad cognitiva y motora, reactividad emocional) inducidas por el método de separación maternal en roedores adolescentes.
- Identificar las alteraciones neuroquímicas (sistemas de recompensa, factores tróficos, dianas neuroquímicas de estrés y reguladoras del sistema inmune) inducidas por el método de separación maternal en roedores adolescentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar los efectos de la separación maternal sobre la conducta adolescente: prueba del campo abierto (motor), caja clara y oscura (ansiedad), suspensión de la cola (depresión), tarea de refuerzo demorado (impulsividad cognitiva y motora), inhibición prepulso (sesgo atencional), y condicionamiento de preferencia de lugar por alcohol (refuerzo y atención en las distintas fases de adquisición, extinción y recaída).
- Identificar las alteraciones en neurobiológicas (expresión génica y/o expresión proteica) inducidas por el método de la separación maternal en roedores adolescentes:
 - Alteraciones en los sistemas de recompensa (expresión génica por Rt-PCR): tirosina hidroxilasa en área de tegmento ventral, receptor μ -opioide en núcleo accumbens y caudado-putamen, receptor cannabinoide CB1 y CB2 en núcleo accumbens y amígdala.
 - Alteraciones en el eje de estrés (expresión génica por Rt-PCR): factor liberador de corticotropina en núcleo paraventricular y receptor de glucocorticoides en hipocampo.
 - Alteraciones de factores tróficos: estudio de la expresión proteica (inmunocitoquímica) y expresión génica del "brain derived nerve growth factor" BDNF en hipocampo.
 - Alteraciones en la expresión proteica (Western Blot) de citoquinas proinflamatorias como el "factor de necrosis tumoral alfa" (TNF- α) e interleukina 1β , y otros marcadores de respuesta inflamatoria como el óxido nítrico inducible (NO), óxido nítrico sintasa (NOS-2) y cicloxigenasa (COX-2) en corteza e hipocampo.
- Estudiar la vulnerabilidad por el consumo de etanol inducidas por el método de la separación maternal en roedores adolescentes:
 - Estudio de las modificaciones en el consumo voluntario de etanol (método de las dos botellas)
 - Estudio de las modificaciones en el refuerzo y motivación por etanol (autoadministración oral de etanol) incluyendo fase de adquisición, programas de razón fija, razón progresiva y punto de corte.

ALCANZADOS: (Ordenar de igual forma que los planteados. En el caso de proyectos coordinados, el coordinador deberá describir además el desarrollo de la coordinación entre subproyectos en este año, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto).

OBJETIVOS GENERALES

- Estudiar el efecto de la separación maternal como método de maltrato infantil sobre la vulnerabilidad por el consumo de alcohol en edad adolescente en el roedor.
- Identificar las alteraciones psicofisiológicas (sesgo atencional, reactividad emocional) inducidas por el método de separación maternal en roedores adolescentes.



- ❑ Identificar las alteraciones neuroquímicas (sistemas de recompensa, factores tróficos, dianas neuroquímicas de estrés) inducidas por el método de separación maternal en roedores adolescentes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❑ Estudiar los efectos de la separación maternal sobre la conducta adolescente: prueba del campo abierto (motor), caja clara y oscura (ansiedad), suspensión de la cola (depresión), inhibición prepulso (sesgo atencional), y condicionamiento de preferencia de lugar por alcohol (refuerzo y atención en las distintas fases de adquisición, extinción y recaída).
- ❑ Identificar las alteraciones en neurobiológicas (expresión génica y/o expresión proteica) inducidas por el método de la separación maternal en roedores adolescentes:
 - Alteraciones en los sistemas de recompensa (expresión génica por Rt-PCR): tirosina hidroxilasa en área de tegmento ventral, receptor μ -opioide en núcleo accumbens y caudado-putamen.
 - Alteraciones en el eje de estrés (expresión génica por Rt-PCR): factor liberador de corticotropina en núcleo paraventricular y receptor de glucocorticoides en hipocampo.
 - Alteraciones de factores tróficos: estudio de la expresión proteica (inmunocitoquímica) y expresión génica del "brain derived nerve growth factor" BDNF en hipocampo.
 - En función de los resultados obtenidos se midió de manera adicional las alteraciones en marcadores relacionadas con neuroplasticidad en el hipocampo (NeuN, NF200 y MAP2).
- ❑ Estudiar la vulnerabilidad por el consumo de etanol inducidas por el método de la separación maternal en roedores adolescentes:
 - Estudio de las modificaciones en el refuerzo y motivación por etanol (autoadministración oral de etanol) incluyendo fase de adquisición, programas de razón fija, razón progresiva y punto de corte.
 - En función de los resultados obtenidos se analizó de manera adicional los efectos de la exposición a factores estresantes adicionales durante la adolescencia sobre la motivación y el consumo de alcohol en la prueba de autoadministración oral de etanol en ratones separados maternalmente.

Desarrollo de la coordinación entre subproyectos y los resultados de dicha coordinación

Durante todo el proyecto, las actividades llevadas a cabo en el subproyecto básico experimental se han coordinado con el subproyecto de investigación clínica. El objetivo del proyecto clínico era evaluar el procesamiento emocional de las señales asociadas al uso de alcohol en tres grupos de jóvenes maltratados: con abuso físico, con abuso sexual y con negligencia frente a un grupo control que no habían sufrido maltrato. Se realizó un estudio transversal de casos y de controles de sujetos adolescentes con edades comprendidas entre los 14 y los 18 años (ambas incluidas). La muestra reclutada para este estudio comprendía 655 jóvenes de ambos sexos que acudieron a centros de salud mental y de la red de centros de Madrid-salud por problemas clínicos en los que se constató (mediante cribaje) que el alcohol también constituía un problema clínico. Los datos obtenidos por el equipo clínico apoyan la hipótesis de que las experiencias de maltrato sufridas durante la adolescencia modifican el procesamiento emocional de las señales aversivas y las asociadas al uso de alcohol. Las primeras son menos desagradables y las segundas más apetitivas, lo que podría explicar el mayor riesgo de estos jóvenes para desarrollar dependencia por el alcohol. Tendrían mayor atracción por las señales condicionadas al alcohol y evitarían menos las situaciones de riesgo. Paralelamente, los resultados obtenidos en el proyecto básico-experimental demuestran comportamientos similares a los encontrados en el proyecto clínico. De hecho, los animales sometidos a separación maternal presentan un elevado grado de ansiedad y una mayor vulnerabilidad por el consumo de alcohol. En este proyecto hemos buscado algunas de las claves que podrían explicar esta modificación en el comportamiento adictivo. El análisis de las muestras cerebrales de los ratones separados maternalmente indica una alteración funcional en las estructuras que regulan el eje del estrés y en los elementos neuronales (neurofilamentos, microtúbulos, etc.), en particular en el hipocampo. Estos datos sugieren que este tipo de maltrato hace al cerebro más vulnerable para algunos estímulos externos como la exposición al alcohol. Además, los datos obtenidos revelan alteraciones en la funcionalidad de la tirosina hidroxilasa en el área del tegmento ventral y de receptores μ -opioides en el núcleo accumbens, ambos hechos directamente relacionados con alteraciones en la regulación del sistema de recompensa. Por todo ello, la colaboración entre los dos subproyectos ha sido reveladora y muy fructífera. Los resultados obtenidos en el roedor podrían resultar útiles para explicar algunas de las tendencias adictivas de los adolescentes y diseñar nuevas estrategias de tratamiento en el futuro. Los resultados obtenidos como consecuencia de esta coordinación abren nuevas posibilidades de investigación en la regulación de los procesos de adicción por el alcohol en pacientes con traumas acaecidos durante la adolescencia cuyos efectos se pueden prolongar y mantener en la edad adulta.



METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

PROYECTADO:

FASE TEMPORAL	TAREA
1º SEMESTRE	Cría y mantenimiento de ratones
	Separación maternal
	Estudio del perfil congntivo-ansiogénico de los ratones machos y hembras sometidos a separación maternal
	Extracción de cerebros de los grupos experimentales
	Corte y microdisección de núcleos cerebrales
2º SEMESTRE	Cría y mantenimiento de ratones
	Separación maternal
	Estudio estadístico de los resultados
	Estudio de los efectos metabólicos del etanol
	Histología, inmunocitoquímica
Preparación de memoria anual.	
3º y 4º SEMESTRE	Cría y mantenimiento de ratones
	Consumo voluntario de etanol (sistema de dos botellas)
	Estudio estadístico de los resultados
	Medida de la expresión génica (RtPCR) y proteínas por Western Blot
	Preparación de gráficas, fotografías, memoria anual
5º y 6º SEMESTRE	Cría y mantenimiento de ratones. Separación maternal
	Autoadministración de etanol en cajas operantes
	Estudios de expresión génica (RT-PCR)- Inmunohistoquímica
	Estudio estadístico de los resultados. Preparación de gráficas
	Preparación de la memoria anual y final. Publicaciones

EJECUTADO:

FASE TEMPORAL	TAREA
1º SEMESTRE	Cría y mantenimiento de ratones
	Separación maternal
	Estudio del perfil congntivo-ansiogénico de los ratones machos y hembras* sometidos a separación maternal
	Extracción de cerebros de los grupos experimentales
	Corte y microdisección de núcleos cerebrales
2º SEMESTRE	Cría y mantenimiento de ratones
	Separación maternal
	Estudio estadístico de los resultados
	Histología, inmunocitoquímica
Preparación de memoria anual.	
3º y 4º SEMESTRE	Cría y mantenimiento de ratones
	Estudio estadístico de los resultados
	Medida de la expresión génica (RtPCR) y proteínas por Inmunohistoquímica
	Preparación de gráficas, fotografías, memoria anual
5º y 6º SEMESTRE	Cría y mantenimiento de ratones. Separación maternal
	Autoadministración de etanol en cajas operantes. Efectos del estrés adicional sobre la autoadministración de etanol en cajas operantes.
	Estudios de expresión génica (RT-PCR)- Inmunohistoquímica
Estudio estadístico de los resultados. Preparación de gráficas	



Preparación de la memoria anual y final. Publicaciones

(*) Si bien los primeros análisis incluyeron la evaluación de las hembras separadas maternalmente (ver resultados incluidos en las memorias de la primera y segunda anualidad) en base a los resultados que se consideró oportuno centrarse en el estudio de los efectos de la separación maternal en machos, al presentar resultados más coherentes.

ACTIVIDADES

PROYECTADAS:

EJECUTADAS:

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

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

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

Los datos más relevantes en cuanto a la aplicabilidad y utilidad práctica en salud se resumen en los siguientes puntos:

1. Las experiencias de maltrato sufridas durante la adolescencia modifican el procesamiento emocional de las señales aversivas y las asociadas al uso de alcohol. Las primeras son menos desagradables y las segundas más apetitivas, lo que podría explicar el mayor riesgo de estos jóvenes para desarrollar dependencia por el alcohol.
2. La modelización animal del modelo de maltrato cumple los criterios de validez necesarios por cuanto que la manipulación de la separación maternal produce un elevado grado de ansiedad en los ratones adolescentes con una alta vulnerabilidad por el consumo de alcohol, de manera muy similar a lo que se ha detectado en el estudio clínico.
3. Estas conductas modificadas en los roedores adolescentes se corresponden con alteraciones funcionales en dianas relacionadas con el eje del estrés (receptor de glucocorticoides, factor liberador de corticotropina), neuroplasticidad (neurofilamentos, microtúbulos, número de neuronas y factor neurotrófico derivado del cerebro) y de los sistemas de recompensa (tirosina hidroxilasa en área del tegmento ventral y receptor μ -opioides en núcleo accumbens).
4. En conjunto, la similitud entre los datos conductuales obtenidos tanto en el modelo de roedor como en los pacientes adolescentes (efecto del maltrato sobre la vulnerabilidad por el consumo de alcohol) indica que el maltrato produce una serie de modificaciones funcionales en el cerebro que podría cambiar la percepción de los hechos desagradables como la apetitividad por el alcohol. Los estudios llevados a cabo ayudan a concluir que deben establecerse estrategias nuevas de prevención cuando el adolescente con problemas por uso de sustancias (en particular, alcohol) acude a la consulta. Los cambios que todavía no se han registrado en el cerebro de los pacientes podría también contribuir a diseñar nuevas estrategias farmacológicas más eficaces que eviten la aparición de recaídas.

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

Los resultados obtenidos en el presente proyecto coordinado se han difundido en diferentes foros del ámbito científico y profesional y a la ciudadanía no especializada:

- Conferencias en congresos científicos:
 - Caracterización neurobiológica y conductual inducida por separación maternal y vulnerabilidad por el consumo de alcohol en la pubertad de roedores. XLI Jornadas Nacionales de Socidrogalcohol. 4 de Mayo de 2014. Sevilla
 - Datos clínicos sobre la relación entre experiencias traumáticas infantiles y el abuso de drogas. XLI Jornadas Nacionales de Socidrogalcohol. 4 de Mayo de 2014. Sevilla
- Presentación de poster en congresos científicos:
 - Influencia de las experiencias de maltrato infantil en la modulación afectiva del reflejo de sobresalto de adolescentes que abusan del alcohol. XVI Jornadas Nacionales de Patología Dual. 12-14 de Junio de 2014. Valencia. **2º Mejor Poster en Patología Dual.**
 - Increased ethanol self-administration associated with synaptic plasticity alterations induced by early life stress in mice. Aceptado para su exposición en el próximo 27th ECNP Congress, 18-21 de Octubre de 2014. Berlín.



<p>- <u>Difusión en medios de comunicación:</u></p> <ul style="list-style-type: none">- “Un estudio demuestra que el maltrato infantil influye en el consumo de alcohol en los adolescentes”. Publicado en Comunicación Universidad Miguel Hernández el pasado 12 de Junio de 2014. http://comunicacion.umh.es/2014/06/12/un-estudio-de-la-umh-demuestra-que-el-maltrato-infantil-influye-en-el-consumo-de-alcohol-en-los-adolescentes/- “Un estudio demuestra que el maltrato en la infancia aumenta el consumo de alcohol en la adolescencia”. Publicado en Diario Información el pasado 13 de Junio de 2014.- Video divulgativo http://www.youtube.com/watch?v=wvy292qOxyo. Universidad Miguel Hernández TV. Publicado el 13 de Junio del 2014.
<p>PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL PROYECTO (solo en caso de memoria final)</p>
<p>OTRAS SUBVENCIONES O RECURSOS (INCLUIDOS FONDOS PROPIOS) QUE FINANCIAN ESTE PROYECTO O PENDIENTES DE RESOLUCIÓN (importe, procedencia y aplicación)</p>
<p>SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS (Organismo, convocatoria y cantidad)</p>
<p>OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR</p>

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

En San Juan de Alicante a 20 de Junio de 2014

JORGE MANZANARES ROBLES