



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

3ª ANUALIDAD

Nº Expediente: 2012I057

Investigador principal: Emilio Ambrosio Flores

Otros investigadores:

Antonio Luis Crego Navazo  
Miguel Miguéns Vázquez  
Alejandro Higuera Matas  
Amparo Assís Duart  
Gonzalo López Montoya  
Santiago Morales Coria  
David Roura Martínez  
Marcos Ucha Tortuero  
Abraham Selvas Gómez  
Raquel Santos Toscano

Título del Proyecto: *Efectos del consumo conjunto de alcohol y cocaína en la adolescencia sobre las concentraciones plasmáticas de aminoácidos y sobre el sistema inmunitario*

Organismo: Universidad Nacional de Educación a Distancia

Centro: Facultad de Psicología

Departamento: Psicobiología

Área temática: Número 4 de la Convocatoria: " Comorbilidad y complicaciones derivadas del consumo de cocaína y alcohol"

Palabras clave: Aminoácidos transmisores; Alcohol; Cocaína; Adolescencia, Sistema inmunitario; Dependencia, Comorbilidad.

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

1. En esta tercera anualidad nos hemos centrado en completar objetivos que faltaban o estaban parcialmente acabados, como el **Objetivo 5**. Así, tal y como se indicaba en la Memoria científica del Proyecto, otra de las determinaciones que debíamos de hacer, y que complementaba el objetivo número 5, era la medición de los niveles de cocaína (sola y en presencia de alcohol) y de sus metabolitos cocaetileno, benzoilecgonina, ecgonina metil-éster y norcocaína en el plasma de los animales. Para ello, empleamos la metodología de la metabolómica de la que es un experto el Dr. Antonio L. Crego de la Universidad de Alcalá de Henares y miembro del presente equipo investigador. Como sabemos, mediante un análisis metabolómico se pueden asociar perfiles metabólicos a distintas situaciones fisiológicas que, con la ayuda de herramientas bioinformáticas nos permiten encontrar explicación a posibles alteraciones patológicas. Dentro de los distintos tipos de estrategias para llevar a cabo un estudio metabólico, los análisis metabolómicos no-dirigidos (que es el que hemos hecho en este trabajo) se centran en el estudio de todos los metabolitos que puedan ser detectados por la técnica analítica empleada, en lugar de estar enfocados a la determinación de un grupo concreto de moléculas. Hemos pretendido, de esta forma, obtener una visión lo más amplia posible del efecto de la administración conjunta de alcohol y cocaína. Los resultados se citan a continuación:

**1. Metabolitos propios de la cocaína.** Se detectaron los siguientes:



- **Cocaína**..... Detección válida (Comparte pico con norcoacetileno)
- **Ecgonina-metil-éster**.....Detección válida
- **Benzoilecgonina**.....Detección válida (Comparte pico con norcocaína)
- **Norcocaína**.....Detección válida (Comparte pico con benzoilecgonina)
- **Benzoilnorecgonina**....Detección válida (Comparte pico con norcocaína)
- **Anhidro-ecgonina-metil-éster**..... Detección válida
- **Anhidroecgonina**..... Detección válida
- **Cocaine N-oxido m-phidroxicoaína**..... Detección válida

**2. Metabolitos propios de la presencia conjunta de cocaína y alcohol.** Se detectaron los siguientes:

- **Cocaetileno**..... Detección válida
- **Norcoacetileno**..... Detección válida (Comparte pico con cocaína)

A la vista de estos resultados podemos decir que:

1. La suma de benzoilecgonina junto con norcocaína (Fig. 1) aparece significativamente elevada en los sujetos que han recibido cocaína respecto a los que han recibido cocaína más alcohol. Esto es lo esperado y concuerda con la literatura, puesto que el alcohol modifica la biotransformación de la cocaína (Pan y Hedaya, 1999). Se conoce que hay una inhibición de la vía hidrolítica con una menor generación de benzoilecgonina, que en parte es transformada en cocaetileno (Dean et al., 1991). Aunque también hay una potenciación de la vía oxidativa, con una mayor generación de norcocaína, esta no compensaría a la anterior y por tanto el resultado esperado es que la suma de estos metabolitos esté reducida en los sujetos del grupo cocaína+alcohol. A este respecto, podemos decir que Bojack-Mackey et al (2000) observaron que las concentraciones de benzoilecgonina son más bajas cuando está presente el cocaetileno, por lo que sugirieron que sería la misma enzima la responsable de la formación de ambos metabolitos.
2. Aparece claramente el metabolito cocaetileno en los sujetos que han recibido alcohol junto con la cocaína (Fig. 2). Este metabolito no aparece en los otros grupos. No tenemos aún hecho el estudio estadístico que nos permitirá establecer si existe alguna correlación entre los valores del cocaetileno con respecto a los valores de la concentración plasmática de aminoácidos o de otros metabolitos analizados.
3. No se aprecian diferencias significativas entre los grupos cocaína y cocaína+alcohol para el metabolito Ecgonina metilester.
4. Aparecen los metabolitos anhidroecgonina (ecgonidina), con un valor significativamente más elevado en el grupo cocaína, y anhidroecgonina metilester (ecgonidina metil ester), aunque este último no muestra diferencias entre grupos (Fig. 3). Estos dos metabolitos hasta ahora siempre se han relacionado con la cocaína fumada (Tamborelli García et al., 2012). Por tanto, su presencia nos hace realizarnos preguntas sobre otras posibles razones, bien experimentales o bien a través de vías metabólicas alternativas, que expliquen la aparición de estos metabolitos en el plasma de nuestros animales.

**Fig. 1.**

Masa teórica: 289.1314  
Masa experimental: 289.1326  
Error de masa: 4.2 ppm

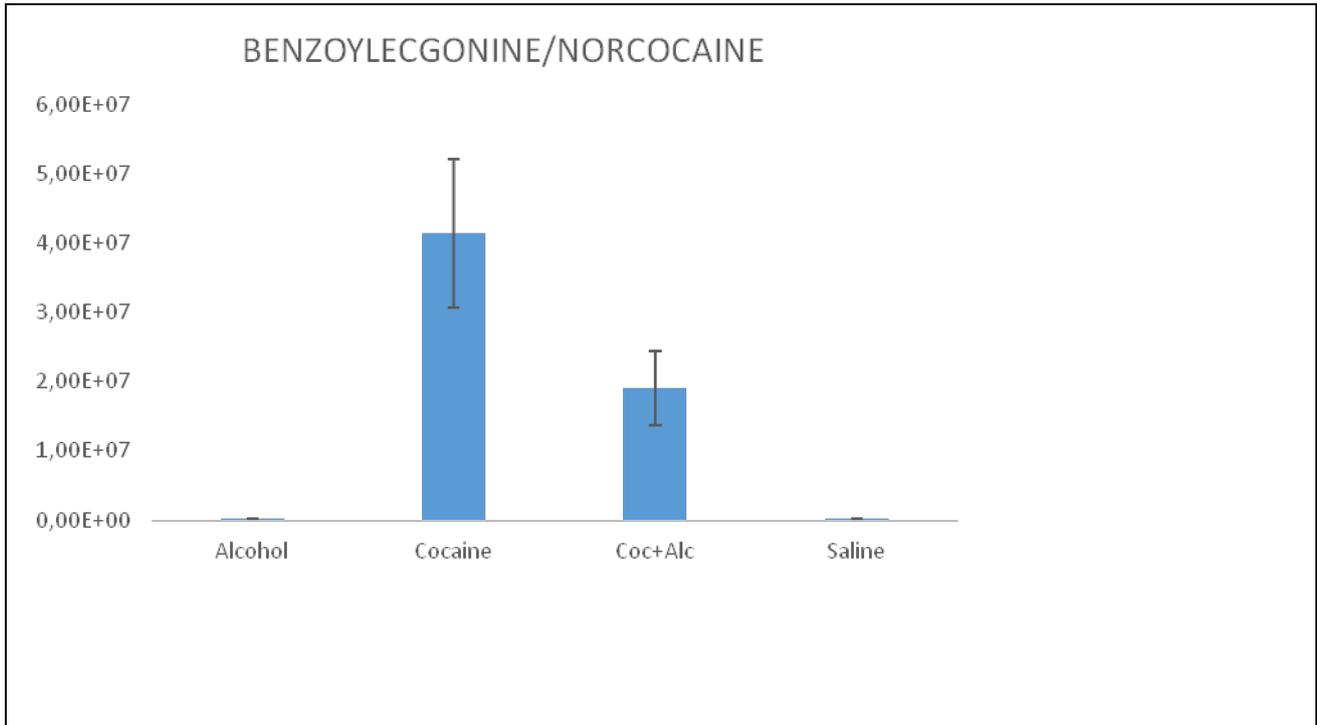


Fig. 2.

Masa teórica: 317.1627  
Masa experimental: 317.1638  
Error de masa: 3.5 ppm

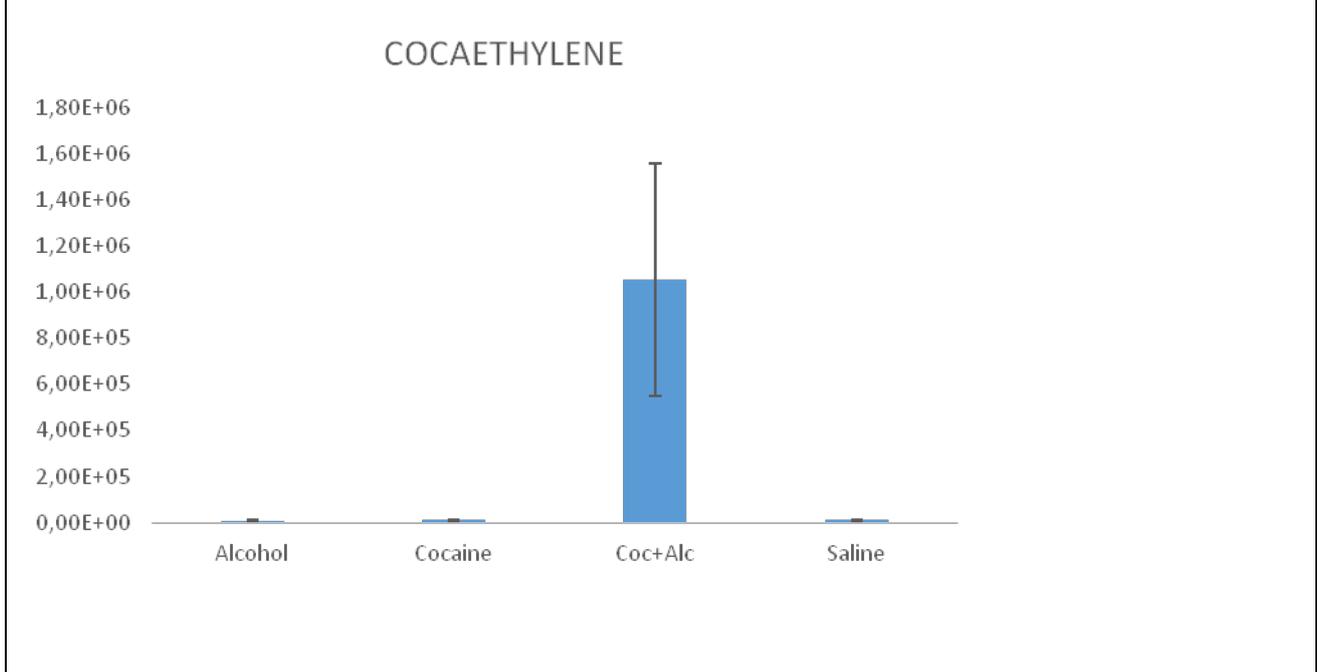
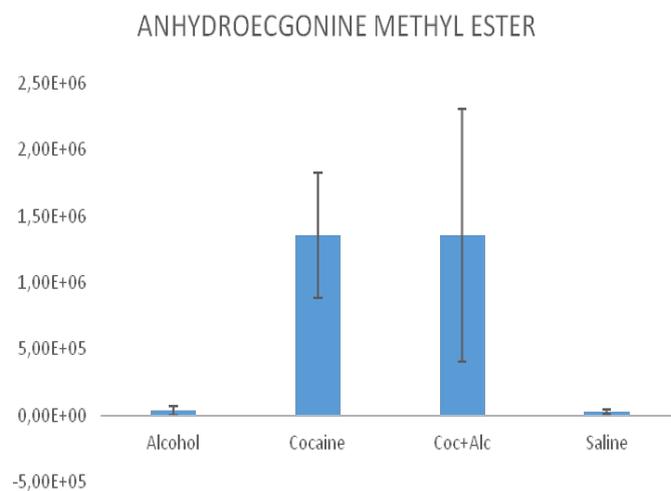
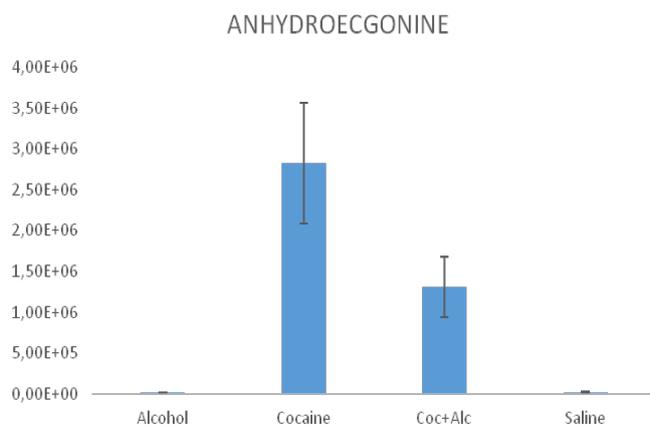


Fig. 3.



Masa teórica: 167.0946  
Masa experimental: 167.0945  
Error de masa: 0.6 ppm

Masa teórica: 181.1103  
Masa experimental: 181.1096  
Error de masa: 3.9 ppm



Por otro lado, también fuimos capaces de identificar distintos metabolitos que pueden discernir entre los cuatro grupos de muestras experimentales y se ubicaron en sus correspondientes rutas metabólicas, las cuales generalmente corresponden a rutas relacionadas con el metabolismo de varios aminoácidos, como es el caso de la arginina, la prolina, el triptófano, la glicina, la serina y la treonina. Estos resultados nos parecen del mayor interés.

Adicionalmente, como también se indica en el Objetivo 5, hemos ampliado el estudio de las concentraciones desde los siete iniciales a once en total, como se apreciará en la Tabla I, que se adjuntará completa como un archivo aparte a este formulario, ya que al pegarla en estas páginas aparece siempre cortada.

Igualmente, se adjuntará un Resumen de los hallazgos de esa Tabla I en archivo de Word porque también al pegarlo aparecía cortado. No obstante, presentamos los resultados significativos que hemos encontrado en la medición de las concentraciones plasmáticas de aminoácidos y las interacciones que se dan entre ellos. Los aminoácidos que se citan a continuación han mostrado cambios significativos en los distintos grupos:



1. En el grupo de Cocaína sola: **L-Iso, L-Leu, L-Glu, L-Ser**
2. En el grupo de Alcohol solo: **L-Ala, L-Gln, L-Ornitina, L-Ser**
3. Según el Sexo del animal: **L-Iso, L-Leu, L-Gln, L-ornitina, Gly**
4. Según la Edad del animal ( adolescente o adulto): **L-Iso,, L-Leu, L-Gln**
5. En el grupo de administración conjunta de Cocaína \* Alcohol: **L-Iso, L-Gln, L-Ornitina y L-Ser**
6. En el grupo de cocaína sola cuando se analiza la interacción con el sexo del animal (Cocaína \* Sexo): **L-Pro, L-Leu**
7. En el grupo de alcohol solo, cuando se analiza la interacción con el sexo del animal (Alcohol \* Sexo): **L-Iso, L-Gln**
8. En la interacción entre los grupos de Cocaína \* Alcohol \* Sexo \* Edad: **L-Iso, L-Leu**

Respecto a estos resultados es preciso indicar que: 1) en primer lugar, se ha conseguido estudiar cinco aminoácidos más de los siete previstos inicialmente ( ya dijimos en la segunda anualidad que el GABA dejábamos de estudiarlo por salir en un pico pegado a otro y no estamos seguros que sea sólo GABA) . Dichos nuevos aminoácidos son: Prolina (L-Pro); Isoleucina (L-Iso); Leucina (L-Leu); Treonina (L-Thr); y Ornitina (L-Orn.); y 2 ) en segundo lugar, se ha añadido un grupo de animales adultos, además del de adolescentes de edad 50-70 días postnatales, indicado ya en la Memoria científica. Este grupo de animales adultos inició su exposición al alcohol los 95 días de edad, mientras que los animales adolescentes lo iniciaron a los 51 días de edad (la exposición a la droga duró tres semanas). Aunque no estaba previsto en la Memoria científica ese grupo de animales adultos, nos pareció adecuado incorporarlo, para así tener también datos de la etapa adulta. En un principio no se incluyó porque no sabíamos si podríamos completarlo en la duración máxima del proyecto de tres años. Sin embargo, sí hemos podido hacerlo.

2. También en esta tercera anualidad hemos realizado experimentos de autoadministración conjunta de cocaína y alcohol, tal y como se indicaba en el **Objetivo 6**. Así, se realizó una sesión diaria de autoadministración durante tres semanas en animales adultos de 95 días de edad, como se ha descrito en el punto anterior. Estas sesiones se acababan si se llegaba a completar la duración máxima de 180 minutos o los animales se autoadministraban 15 inyecciones. De obtenerse las 15 infusiones por un animal, éste era retirado enseguida de la caja de autoadministración, independientemente del tiempo que quedara por transcurrir en la sesión para llegar al final. La razón de no extender el acceso más allá de 180 minutos y de limitar el número de inyecciones a un máximo de 15 es porque el estudio se hizo con animales adultos y se les pudo subir la dosis de cocaína a 0,75 mg/kg por inyección (inicialmente pensamos 0,5 mg/kg, como se dice en la Memoria científica de solicitud del proyecto), que facilita la conducta de autoadministración ( un buen número de animales no se autoadministraban la dosis de 0,5 mg/kg, por ser probablemente menos reforzadora para ellos. A la dosis de 0,75 mg/kg, sin embargo, los animales se autoadministran mucho más consistentemente). Con esa dosis más alta, los niveles de cocaína plasmáticos aumentaron y, como se explica en la Memoria científica de solicitud del proyecto, está comprobado que la presencia conjunta de alcohol y cocaína hace que el metabolismo de esta última se entelezca lo que, unido a la generación del metabolito cocaetileno, podría traducirse en una mayor toxicidad hepática y en mayores niveles de dopamina cerebrales. Por otro lado, basándonos en nuestra experiencia previa, con la dosis de 1 mg/Kg la mayoría de los animales alcanzaban con facilidad las 15 inyecciones de autoadministración en sesiones de, incluso, 60 minutos para un cierto porcentaje de animales. Por ello, se limitó el número máximo de infusiones a 15 en sesiones de acceso extendido de tres veces más tiempo 180 minutos con el fin de hacer homogénea en la mayoría de los animales la misma dosis de cocaína en sangre (0,75 x 15 inyecciones: 11,25 mg/kg) y, a ser posible, de alcohol porque no sabíamos en qué grado podía afectar a la autoadministración la presencia del alcohol en la dosis final de 1,25 g/Kg. Dándoles tres veces más tiempo en acceso extendido esperábamos que los animales toleraran progresivamente la presencia de alcohol junto con la de cocaína y mantuvieran su tasa de autoadministración de 15 infusiones diarias a la dosis de 0,75 mg/Kg de cocaína. Para ello, como se explica en la siguiente sección de Metodología y Plan de Trabajo, se fue incrementando progresivamente la dosis de alcohol, partiendo de 0,2 g/Kg. En la Figura 4 puede verse la curva de autoadministración de cada uno de los siete animales que se estudiaron (cada color de la gráfica representa a un animal distinto). Esa Figura nos indica que el nivel de alcohol final en plasma, el cual se alcanzaba cuando los animales llegaban a autoadministrarse las 15 inyecciones permitidas, fue inferior a la dosis máxima buscada de 1,25 g/kg. Puede comprobarse que sólo en el caso de un animal (el de color marrón en la gráfica) se llegó a niveles de 1,25 e incluso de 1,4 g/Kg. En el resto, el máximo valor que se alcanzó fue de 0,8 g/Kg. Estos datos sugieren que se puede aumentar la dosis diaria de incorporación progresiva de alcohol, dado que los animales se siguen autoadministrando con facilidad 0,75 mg/kg de cocaína y la incorporación de dosis crecientes de alcohol no afecta a la autoadministración intravenosa de ambas drogas. Muy probablemente puede lograrse la autoadministración conjunta de 0,75 mg/kg de cocaína y de 1,25 g/kg de alcohol en tres sesiones de acceso extendido (con incrementos progresivos de una dosis de 0,4 g/kg por día) y mantener ese régimen de autoadministración tres semanas más. Es preciso decir que ser capaz de conseguir esa autoadministración conjunta en un tiempo máximo de tres semanas es importante porque por nuestra experiencia, a partir de las cuatro semanas, aumenta mucho la pérdida de animales por problemas derivados de la oclusión del catéter implantado intravenosamente. Cuando se dan esas oclusiones, se da al traste a menudo con la N de animales en los grupos y, en nuestro caso, al tener que estudiar 4 grupos de animales simultáneamente dificulta mucho la consecución de resultados en un tiempo razonable.

Por ello, estamos satisfechos con estos resultados, dado que vemos posible que es posible hacer este procedimiento.

Al no poder conseguir, no obstante, la dosis final (1,25 g/kg) de alcohol prevista no se ha podido hacer en consecuencia la medición de los niveles plasmáticos de aminoácidos que se tenía proyectada.

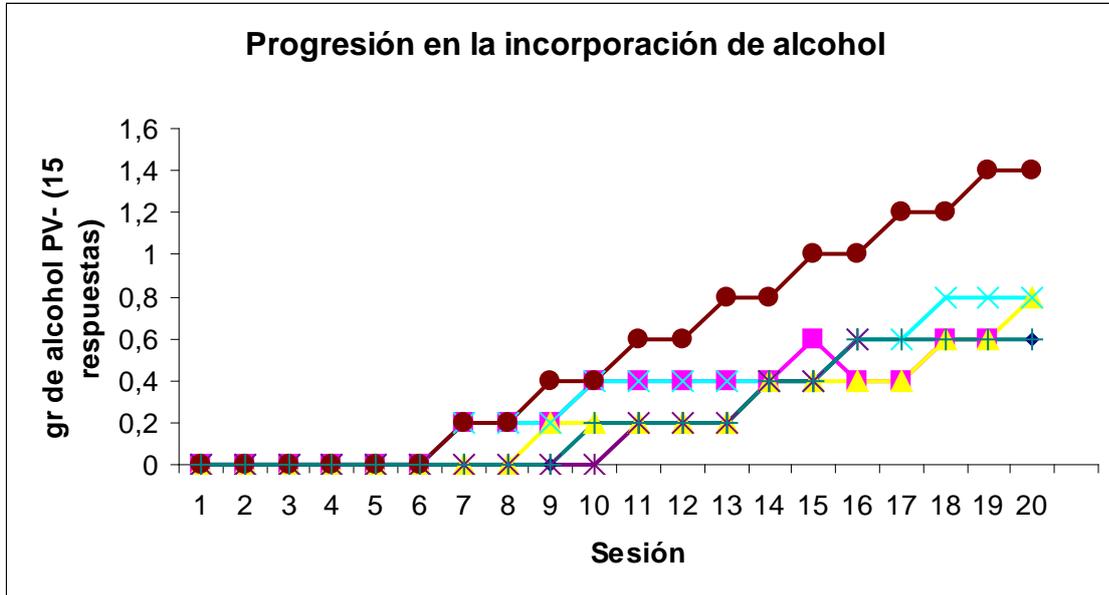


Fig 4. Evolución de los siete sujetos en el ritmo de incorporación de alcohol. El eje de las Y indica el porcentaje de alcohol incorporado en gr/kg PV en el caso de alcanzar las 15 respuestas límite de cada sesión.

3. Finalmente, en lo que se refiere a los objetivos 2 y 4, nos hemos retrasado en su consecución hasta la tercera anualidad debido a problemas derivados de la no obtención adecuada de señal en los geles. Aunque en estudios anteriores a los de este presente proyecto no hemos tenido problemas en detectar la expresión de esos receptores, sí los hemos tenido ahora. Después de descartar problemas con el agua y de múltiples pruebas y de mal gastar más de seis meses de trabajos, amén de mucho dinero, comprobamos que: 1) los geles que nos vendían comercialmente estaban mal; y 2) había fallos muy sutiles en el equipo de electroforesis que usábamos. En consecuencia, desde mediados del mes de diciembre del año pasado comenzamos a quejarnos de lo ocurrido a la casa comercial (BIO-RAD) En unos archivos adjuntos a esta Memoria Técnica pueden verse toda la serie de correos que hemos tenido con la citada casa comercial, que no nos dio ninguna solución y que, finalmente, nos abocó a la compra de un equipo nuevo de electroforesis en gel.

Una vez que pudimos realizar los experimentos programados, se hicieron metodológicamente como se explica más adelante, mostrándose los resultados obtenidos en las Figuras 5-6. Puede apreciarse que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de tratamiento.

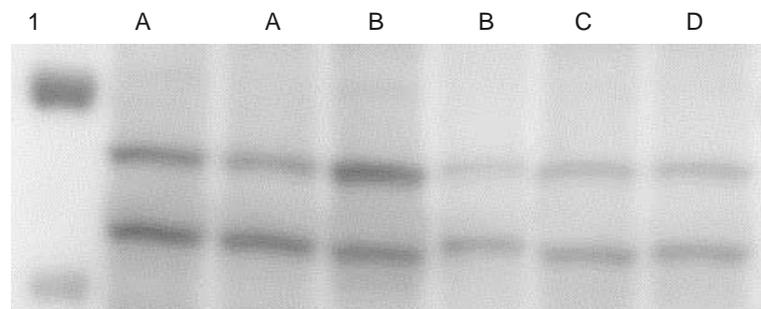
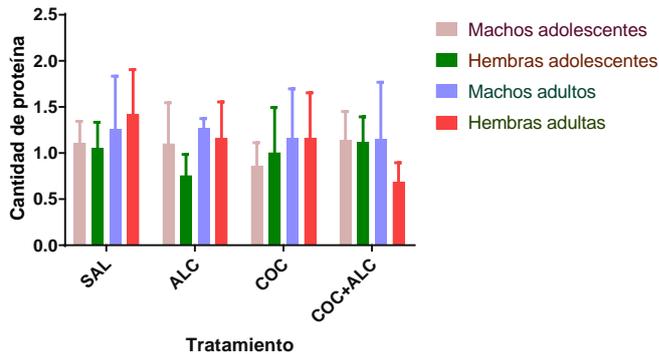


Figura 5. Fotografía de la membrana en la que se puede ver la especificidad del anticuerpo D<sub>5</sub> con los receptores de dopamina D<sub>5</sub>. Todas las muestras son de ratas adolescentes. A: Tratamiento salino macho/ hembra, B: tratamiento alcohol macho/ hembra, C: tratamiento cocaína macho/ hembra, D: tratamiento alcohol+cocaína macho/ hembra. En la columna señalada con el número 1 se muestra que el receptor D<sub>5</sub> se encuentra entre 50 kDa ( kilodaltons), que es valor que da la mancha más gruesa de arriba y entre 25 kDa, que es el valor que da la mancha más clara de abajo del todo de esa columna.



**Figura 6. Media de todos los grupos experimentales. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.**

Al no haberse encontrado diferencias significativas, podría decirse que parece que no existe relación alguna entre los receptores de dopamina expresados en bazo y los diferentes tratamientos de este estudio. No obstante, pensamos que sí puede haberlas, por lo que vamos a seguir estudiando estas muestras con otra técnica diferente, que suple las limitaciones que tiene la técnica del Western Blot. Nos referimos a la técnica es la citometría de flujo. La diferencia principal entre ésta y la utilizada en el presente trabajo es el hecho de poder discriminar entre las distintas poblaciones celulares que hay en una muestra. El principio básico de esta técnica consiste en una luz láser que incide sobre la suspensión celular. Esta luz láser está programada de forma que sólo ilumina una partícula cada vez. Así, las señales de dispersión de la luz y de fluorescencia (en el caso de que haya unido un fluorocromo a la partícula) son detectadas para cada partícula individualmente. Estas señales son recogidas por unos detectores que dan información acerca del tamaño, complejidad e inmunotipo de la muestra y permiten, por tanto, realizar una clasificación y separación de los tipos celulares según estos parámetros medidos. Ello posibilita realizar una clasificación celular, de modo que, suspensiones celulares heterogéneas pueden ser purificadas en fracciones formadas por un único tipo celular. En nuestro caso, ello nos permitiría estudiar las diferentes poblaciones celulares presentes en el bazo de los animales y seleccionar aquellas en las que se expresa el receptor D<sub>5</sub> (como los linfocitos T y B). Para ello, se utilizarían anticuerpos específicos para estas proteínas marcados con fluorocromos. Las células inmunitarias serían seleccionadas sobre la base de sus características de dispersión de luz y corroboradas por análisis morfológico mediante la tinción de May-Grünwald-Giemsa. Aunque no disponemos de ese equipamiento en nuestra Universidad, si podemos encargar valoraciones por citometría de flujo a un Centro de Apoyo a la Investigación (CAI) de la Universidad Complutense de Madrid. Dados estos resultados negativos con el receptor D<sub>5</sub> debidos, pensamos, a las limitaciones técnicas citadas, consideramos que lo mejor era no iniciar el estudio de los receptores CB2 mediante Western Blot y sí estudiarlos mediante citometría de flujo. Por otro lado, ya se comunicó en la primera anualidad que el anticuerpo para el receptor Mu-opoide fue retirado por la propia empresa que los producía, por lo que ese estudio no se pudo realizar.

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

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

Artículos en revistas científicas que se derivan directamente de los objetivos planteados en el presente Proyecto

1. Sánchez-López, E., Marcos, A., Ambrosio, E., Mayboroda, O.E., Marina, M.L., Crego, A.L. (2016). Investigation on the combined effect of cocaine and ethanol administration through a Liquid Chromatography-Mass spectrometry metabolomics approach ( enviado a la revista Journal of Chromatography A. Estamos a la espera de la contestación de los revisores. Se adjunta el manuscrito enviado al Plan Nacional sobre Drogas, para su conocimiento).
2. Sánchez-López, E., Marcos, A., Ambrosio, E., Marina, M.L., Crego, A.L. (2016). Enantioseparation of the constituents involved in the Phenylalanine-Tyrosine metabolic pathway by Capillary Electrophoresis tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A, pii: S0021-9673(16)30829-9. doi: 10.1016/j.chroma.2016.06.053.
3. Marcos, A., Orihuel, J., Roura Martinez, D., Ucha, M., Higuera- Matas, A., Ambrosio, E., Anadon, A (2016). Effect of



chronic cocaine and/or alcohol on plasma amino acids pattern in rats. *Toxicology Letters* 258S (2016) S62-S324.

Artículos en revistas científicas ya publicados:

Los resultados publicados en estos tres artículos no se derivan directamente de los objetivos planteados en el presente Proyecto del PNSD, pero para la obtención de los mismos se han empleado materiales de uso general como reactivos de laboratorio, productos para cirugía, anestesia y sanidad de los animales, pienso y comida de los animales, etc., por lo que en todos ellos figura el agradecimiento al PNSD por su financiación.

3. Coria, S.M., Roura-Martínez, D., Ucha-Tortuero, M., Assis, M.A., Miguéns, M., García-Lecumberri, C., Higuera-Matas, A., Ambrosio, E. (2014). Strain differences in the expression of cannabinoid genes and in cannabinoid receptor binding in the brain of Lewis and Fischer 344 rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 53, 15-22.. doi: 10.1016/j.pnpbp.2014.02.012.

4. Selvas, A., Coria, S.M., Kastanauskaite, A., Fernaud-Espinosa, I., DeFelipe, J., Ambrosio, E., Miguéns, M. (2015). Rat-strain dependent changes of dendritic and spine morphology in the hippocampus after cocaine self-administration. *Addict Biol*. doi: 10.1111/adb.12294.

5. Simon, M.J. Higuera-Matas, A., Roura-Martínez, D., Ucha-Tortuero, M., Santos-Toscano, R., Ambrosio, E., Puerto, A. (2016). Changes in D but not D2 dopamine or mu-opioid receptor expression in limbic and motor structures after lateral hypothalamus electrical self-stimulation: a quantitative autoradiographic study. *Neurobiology of Learning and Memory*, 127, 17-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2015.11.007>.

Artículos aún publicados en revistas científicas pero que están siendo evaluados para su publicación:

Los resultados presentados en los artículos que siguen tampoco no se derivan directamente de los objetivos planteados en el presente Proyecto del PNSD pero, como se ha indicado anteriormente, para la obtención de los mismos se han empleado materiales de uso general como reactivos de laboratorio, productos para cirugía, anestesia y sanidad de los animales, pienso y comida de los animales, etc., por lo que en todos ellos figura el agradecimiento al PNSD por su financiación.

6. Gonçalves, J., Leitão, R. A., Higuera-Matas, A., Assis, M.A. Coria, S.M., Fontes-Ribeiro, C., Ambrosio, E., Silva, A.P. (2016). Blood-brain barrier dysfunction following methamphetamine self-administration: focus on intercellular junctions, glial cells and matrix metalloproteinase 9. *Neurobiology of Disease* ( enviado a la revista *Neuropharmacology*).

7. Fernández-Cabrera, M. R., Selvas, A., Miguéns, M., Higuera-Matas, A., Vale-Martínez, A., Ambrosio, E., Martí-Nicolovius, M., Guillazo-Blanch, G. (2016). Deep brain stimulation of the parafascicular thalamic nucleus decreases GluN1 NMDA subunit gene expression in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (enviado a la revista *Physiology and Behavior*)

8. Fole, A., Miguéns, M., Morales, L., González-Martín, C., Ambrosio, E., del Olmo, N. (2016). Lewis and Fischer 344 rats as a model of inability to learn: cocaine effects. (enviado a la revista *Journal of Psychopharmacology* ). Todos estos manuscritos enviados están a disposición del PNSD.

## OBJETIVOS

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

1. Examinar en ratas machos y hembras adolescentes, en el período postnatal del día 28 al 49, el efecto de la administración pasiva, conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre las concentraciones plasmáticas de aminoácidos implicados en funciones transmisoras (l-glutamato, l-aspartato, taurina, glicina, l-alanina, l-serina, GABA y l-arginina) y compararlo con el que tendrían animales similares expuestos a alcohol solo, a cocaína sola y a suero salino (como grupo control).
2. Estudiar en ratas machos y hembras adolescentes, en el período postnatal del día 28 al 49, el efecto de la administración pasiva, conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre la expresión de receptores dopaminérgicos (D<sub>5</sub> y D<sub>3</sub>), opioidérgico (Mu) y endocannabinoide (CB<sub>2</sub>) en células inmunitarias (linfocitos T y B y macrófagos/monocitos) y compararlo con el que tendrían animales similares expuestos a alcohol solo, a cocaína sola y a suero salino.
3. Investigar en ratas machos y hembras adolescentes-jóvenes, en el período postnatal del día 50 al 70, el efecto de la autoadministración conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre las concentraciones plasmáticas de aminoácidos implicados en funciones transmisoras (l-glutamato, l-aspartato, taurina, glicina, l-alanina, l-



serina, GABA y l-arginina) y compararlo con el que tendrían animales similares que se autoadministrarían alcohol solo, cocaína sola o suero salino.

4. Analizar en ratas machos y hembras adolescentes-jóvenes, en el período postnatal del día 50 al 70, el efecto de la autoadministración conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre la expresión de receptores dopaminérgicos ( $D_5$  y  $D_3$ ), opioidérgico ( $\mu$ ) y endocannabinoide ( $CB_2$ ) en células inmunitarias (linfocitos T y B y macrófagos/monocitos) y compararlo con el que tendrían animales similares que se autoadministrarían alcohol solo, cocaína sola o suero salino.
5. Ampliar el estudio de las concentraciones plasmáticas de aminoácidos indicadas en los puntos 1 y 3 anteriores al máximo posible de aminoácidos que puedan ser detectados y separados y, particularmente, al triptófano y a la tirosina por su importancia como precursores de neurotransmisores.
6. Extender el estudio de los puntos 3, 4 y 5 anteriores mediante el procedimiento de autoadministración con acceso extendido, en el caso de que un miembro del equipo investigador pudiera irse a formar al laboratorio del Dr. Koob en EE.UU.

**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).

Como se ha explicado anteriormente, en esta tercera anualidad hemos completado las tareas previstas para cumplir con los objetivos 5 y 6. En el caso de los 2 y 4, se han alcanzado sólo parcialmente debido al mal funcionamiento del sistema de electroforesis en gel, como se ha indicado más arriba. Esperamos acabarlos en unos seis meses y se mandará al PNSD un Anexo de esta Memoria Técnica dando cuenta de los resultados obtenidos.

## METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

### PROYECTADO:

#### En relación con el Objetivo 5:

Tal y como se ha indicado anteriormente y como estaba previsto en la Memoria científica del proyecto, para el estudio de los metabolitos que resultan de la administración conjunta de cocaína y alcohol hemos empleado la técnica de la Cromatografía de Líquidos con detección por Espectrometría de Masas (LC-MS) porque es, sin duda, la técnica más empleada dada su elevada robustez, reproducibilidad y sensibilidad. Hicimos, por tanto, el análisis de muestras de plasma de ratas adolescentes tratadas con alcohol y/o cocaína, mediante la técnica de LC-MS empleando un sistema de masas de alta resolución, un equipo híbrido de Cuadrupolo (Q) y Tiempo de Vuelo (TOF). Debido a la gran cantidad de datos derivados de este tipo de estudios, se empleó análisis estadístico multivariante para poder manejar y tratar estos resultados a fin de correlacionar las diferencias existentes entre los distintos grupos estudiados. En primer lugar, se utilizó Análisis de Componentes Principales (PCA) como análisis multivariante no supervisado para evaluar de forma global las tendencias que siguen los datos obtenidos. Debido a que en el PCA se encontró una ligera separación entre los cuatro grupos estudiados (cocaína, alcohol, cocaína y alcohol y el grupo control), se procedió a aplicar Análisis Discriminante con Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA) como análisis multivariante supervisado, con objeto de simplificar la interpretación y maximizar las diferencias existentes en los distintos grupos.

Para la obtención de las muestras de plasma, el último día de cada experimento (esto es, a los 21 días desde el inicio), 15 min después de finalizar la última infusión de drogas, se procedió al sacrificio mediante decapitación y para obtener la sangre troncal en tubos eppendorf de 1 ml previamente heparinizados. Con esta sangre, el plasma se obtuvo tras la centrifugación de las muestras a 1.500 x g durante 15 min a 4°C y el recogido del sobrenadante, que era el plasma en este caso y se mantuvo a -70°C hasta la realización del estudio de metabolómica.

#### En relación con el Objetivo 6:

Los animales, adultos de 95 días al inicio de los experimentos, se entrenaron autoadministraron intravenosamente ambas drogas en cajas de condicionamiento operante. La duración máxima de la sesión de acceso extendido fue de 180 minutos y si antes de que se cumpliera ese tiempo el animal se autoadministraba 15 inyecciones finalizaba también la sesión. Al obtenerse las 15 infusiones, el animal se retiraba enseguida de la caja de autoadministración, independientemente del tiempo que quedara por transcurrir del tiempo de la sesión. Otras condiciones de nuestro estudio fueron:

- 100 microlitros de volumen infundido medio por cada respuesta operante. En ese volumen el animal recibía 0,75 mg/Kg de cocaína más alcohol en dosis crecientes de 0,2 g/kg. El volumen que recibía particularmente cada animal se calculaba según el peso del mismo. El peso medio de los sujetos estuvo en torno a 300 gramos.
- Las incorporaciones de alcohol de forma gradual fueron de 0.2 gr/kg (Peso Volumen; PV) en las 15 infusiones que



permitía el programa del ordenador que regula las cajas de autoadministración. A partir de la sexta sesión, se aplicó un criterio de incorporación progresiva de alcohol basado en el comportamiento de autoadministración: se añadieron 0,2 mg/kg PV de alcohol a la solución final si durante dos sesiones consecutivas:

- el *Porcentaje de Incremento* era positivo
- el *Coefficiente de variación* era menor del 75%

Se define el **% de Incremento** como las Respuestas del último día – promedio 3 últimos días) / (promedio 3 últimos días).

Se define el **coeficiente de variación** como la Desviación estándar de las 3 últimas sesiones / promedio de tres últimas sesiones.

Los resultados obtenidos con este procedimiento se presentaron y explicaron en el apartado anterior.

#### En relación con los Objetivos 2 y 4

Al tiempo que se sacrificaron los animales y se obtenía el plasma, también se extrajo el bazo en fresco como fuente principal de células inmunes periféricas maduras (linfocitos T y B y monocitos, principalmente). Las muestras de bazo de congelaron a -70 grados hasta la realización de los análisis, algo que se hizo más tarde de lo previsto y una vez solucionados los numerosos problemas habidos con los geles, como se acaba de decir. El aislamiento de esas células se realizó por disgregación del tejido en buffer RIPA (SIGMA; 150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0), al que previamente se le habían añadido inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP EASYpack, Roche) y proteasas (Complete EDTA-free, Roche). Tras la centrifugación de 15 minutos, a 4°C y a 10 000 g, obtuvimos el sobrenadante ya que es donde se encuentran los componentes de las células lisadas (excepto los núcleos). Posteriormente, se cuantificó la concentración de proteína en placas de ELISA de 96 pozos (Falcon, Microtest 96) mediante el método colorimétrico de Bradford. Primero se diluyeron las muestras 1:40 (5µl muestra + 195 µl agua destilada) y, después, a un volumen conocido de muestra (5 µL) se añadieron 250 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Protein Assay Dye Reagent Concentrate) diluido 1:5 en agua. Para interpolar los valores de proteína en µg/µL se ensayó en paralelo una recta de calibrado de BSA (Sigma-Aldrich; desde 0,1 hasta 1 µg/µL, además del blanco). La medida que se utilizó es la ratio de absorbancias 595 nm/450 nm (lector de placas Asys Hitech DigiScan). Para analizar la expresión del receptor de dopamina D<sub>5</sub>, se utilizó la técnica de Western Blot. Se cargaron 10 µl de 2 µg/µl de proteína en 5 geles comerciales (Criterion TGX Precast Gels 10%, Bio-Rad). En cada gel se cargaron muestras de cada uno de los grupos para asegurarnos de que había aleatoriedad de muestras.

La electroforesis se llevó a cabo en tampón de electroforesis, a 200 V, aproximadamente durante 50 min, a temperatura ambiente, mediante el sistema Criterion (Bio-Rad) y geles midi. Se cargaron, además, en cada gel, 4 alícuotas de marcador de peso molecular (Bio-Rad, Precision Plus Protein All Blue Standards). Las membranas de PVDF (Thermo Scientific, PVDF transfer membrane 0.45 µm) fueron equilibradas en tampón de transferencia por 15-20 min (previamente activadas 10 s en metanol y 10 s en H<sub>2</sub>O destilada). Los geles fueron equilibrados 15 min en tampón de transferencia. Para realizar la transferencia semi-seca se aplicaron 25 V durante 45 min en el sistema Trans-Blot Turbo Transfer system (TBST; Bio-Rad) entre papel Whatman (GE Healthcare, Gel Blotting Paper). Para el bloqueo se utilizó suero fetal bovino 5 % p/v (TBST) 1 h a RT en agitación. Después, las membranas se lavaron en TBST durante 5 min a RT. Para la incubación del anticuerpo 1º se utilizó el anticuerpo policlonal contra la secuencia de aminoácidos 23-35 del receptor dopaminérgico D<sub>5</sub> (Abcam, ab40656). Este se encuentra a una concentración 1:5.000 en TBST. La incubación se llevó a cabo en agitación O/N a 4 °C. Al finalizar, se realizaron 3 lavados de 15 min en TBST en agitación a temperatura ambiente. A su vez, para la incubación del anticuerpo 2º se utilizó el correspondiente anticuerpo secundario unido a HRP (Abcam, ab6721). En este caso se trata de un anticuerpo desarrollado en cabra contra conejo. La concentración de este anticuerpo fue, de nuevo, 1:5.000 en TBST. En este caso, la incubación se produjo en agitación 1h. Se realizaron 3 lavados de 15 min en TBST en agitación. Tanto la incubación como los lavados se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó el reactivo Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific). Tras preparar la mezcla, las membranas fueron sumergidas en el reactivo durante 5 min a temperatura ambiente. Después se expuso la membrana en el detector de quimioluminiscencia (Amersham Imager 600). Finalmente, se incubaron las membranas en tampón de *stripping* (precalentado a 50 °C) 45 min a 50 °C en agitación moderada. Se realizaron 3 lavados de 10 min en TBST a temperatura ambiente. Las membranas se utilizaron el mismo día, comenzando de nuevo el protocolo desde el bloqueo.

Para el análisis estadístico se analizaron las imágenes mediante el programa *ImageJ*. Seguidamente se normalizó el valor de cada banda con respecto a la media de todas las de su gel y luego con respecto a su correspondiente β-actina (las bandas de β-actina también habían sido normalizadas previamente siguiendo el mismo procedimiento). Para la realización del análisis estadístico se utilizó el paquete SPSS 24 (IBM). El nivel de significación fue de 0,05 en todos los casos. Se estableció una variable dependiente, receptor D<sub>5</sub>, y tres variables independientes que son "TRATAMIENTO" con cuatro niveles (Salino, Alcohol, Cocaína, Alcohol+Cocaína), "SEXO" con dos niveles (Macho, Hembra) y "EDAD" con dos niveles (Adolescente, Adulto). Para llevar a cabo el análisis de varianza ANOVA e intentar detectar diferencias significativas, primero deben cumplirse una serie de supuestos. Estos supuestos son normalidad y homogeneidad de varianzas. Los datos deben seguir una distribución normal y debe haber homocedasticidad de varianzas. Para comprobar la normalidad de la distribución ejecutamos los tests Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, los cuales comparan los valores de la muestra con unos valores que siguen la distribución normal y con los que comparten media y desviación estándar. Si el valor de significación es mayor que 0,05 ( $p > 0,05$ ), la distribución de nuestros datos no es significativamente diferente a una distribución normal. Sin embargo, si  $p < 0,05$ , la distribución de nuestros datos no es normal. En nuestro análisis, los valores  $D_5$  para el tratamiento *cocaína*,  $D(23) = 0.908$ ,  $p < 0.05$ , y para el tratamiento



*alcohol+cocaína*,  $D(21) = 0.895$ ,  $p < 0.05$ , no siguieron una distribución normal. En el caso de la variable "edad", la distribución de los valores de  $D_5$  en *adolescente*,  $D(50) = 0.952$ ,  $p < 0.05$ , y en *adulto*,  $D(40) = 0.917$ ,  $p < 0.05$ , tampoco fue normal. Finalmente, en cuanto a la variable "sexo", los valores de  $D_5$  en *macho*,  $D(45) = 0.844$ ,  $p < 0.05$ , tampoco siguieron este tipo de distribución. Como podemos ver, en la mayoría de los casos no hubo normalidad. Nos fijamos en el test Shapiro-Wilk debido a que los grupos tienen una  $n < 50$ . Llegados a este punto, al no cumplirse uno de los supuestos, se transformó la variable dependiente. Antes de proceder a ello, se analizó también la homocedasticidad de varianza (aunque no fuera necesario). El test de Levene es el que permite saber si este segundo supuesto se cumple o no. En este caso, para la expresión del receptor  $D_5$ , las varianzas fueron significativamente diferentes para los sujetos adultos y para los adolescentes,  $F(1,88) = 4.515$ ,  $p < 0.05$ .

Por lo tanto, la variable dependiente no cumplió los supuestos requeridos para realizar el ANOVA. Una posible solución fue realizar una transformación que, en este caso, se trató de la raíz cuadrada. A pesar de la transformación no se cumplieron los supuestos por lo que se realizaron análisis estadísticos no paramétricos. En concreto, se utilizó el test H de Kruskal-Wallis. Este test compara varias condiciones cuando diferentes sujetos se someten a cada condición. Tras obtener los resultados del test, pudimos afirmar que no existen diferencias significativas entre los grupos,  $H(15) = 24.210$ ,  $p > 0.05$ , y que por lo tanto ninguna de estas variables afecta a la expresión del receptor  $D_5$ .

Para poder asegurarnos de este resultado, repetimos los análisis teniendo en cuenta solo dos de las tres variables independientes con las que contamos, es decir, en un caso consideramos solo las variables independientes *tratamiento* y *edad*, sin tener en cuenta si se trataba de machos o hembras, y posteriormente solo consideramos las variables *tratamiento* y *sexo*, sin tener en cuenta si se trataba de adolescentes o adultos. Así pudimos comparar los grupos de tratamiento según la edad y según el sexo. Sin embargo, de esta manera tuvimos que llevar a cabo también análisis no paramétricos, aunque tampoco obtuvimos ninguna diferencia significativa, como ya se ha mostrado anteriormente en la sección de Resultados.

#### EJECUTADO:

Tal y como se ha explicado en páginas anteriores, consideramos que se han ejecutado como estaba previsto los procedimientos experimentales y planes de trabajo destinados a cubrir los objetivos 2 y 4 y los 5 y 6 de la Memoria científica aprobada en su día por el PNSD.

#### ACTIVIDADES

##### PROYECTADAS:

No estaban previstas en la Memoria del Proyecto hacer otras actividades distintas a las de los experimentos en el laboratorio.

##### EJECUTADAS:

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

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

Todo lo relativo a la estancia avalada por el NIDA del miembro del Equipo Investigador del presente Proyecto, Marcos Ucha Tortuero, se ha indicado ya en la Memoria de la primera anualidad.

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

Al ser este Proyecto de investigación básica, su posible aplicabilidad hay que verla a medio y largo plazo por si se pudieran elaborar fármacos que mejoraran las actuales herramientas farmacológicas disponibles. No obstante, sí hay una aplicabilidad a corto plazo en formación especializada para los profesionales del ámbito de las drogodependencias y todas aquellas otras personas que tengan interés en este campo. A este respecto, durante 2015 se han impartido cursos en los diferentes Colegios Profesionales sanitarios ( Médicos, Farmacéuticos, Psicólogos, Enfermería y Trabajo Social) y se va a continuar durante 2016.

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

Las principales acciones llevadas a cabo han sido: 1) programas de radio a través de Radio Nacional 3, e n virtud de los espacios radiofónicos reservados para la UNED; 2) charlas en Colegios de Enseñanza Secundaria; 3) entrevistas en revistas como Muy Interesante y El País Semanal.

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

No disponemos de patentes u otros resultados explotables comercialmente.



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

No tenemos otras subvenciones o recursos que hayan financiado este proyecto.

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

Sólo hemos solicitado subvención para este proyecto al PNSD y ninguna más a otras instituciones.

**OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR**

1. Se adjuntan en archivos aparte los correos electrónicos enviados a la casa comercial "Bio-Rad" en relación con los problemas hallados en la adquisición de los geles que necesitábamos para el estudio en el sistema inmunitario.
2. Se adjuntan en archivos aparte las gráficas y el análisis estadístico correspondientes a los valores de la Tabla I de este Informe de la 3ª anualidad debido a que al apegarlos aparecen parcialmente cortados en el formato en recuadros que tiene este formulario de Memoria Científica.

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

En Madrid a 15 de Septiembre de 2016

**NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL**

Emilio Ambrosio Flores.