



JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

3ª ANUALIDAD

FINAL

Número Expediente: 2010/143

Investigador Principal: Juan Suárez Pérez

Otros Investigadores: Patricia Rivera González (personal contratado), Pedro Fernández-Llebrez del Rey, Eduardo Blanco Calvo, María Jesús Luque Rojas, Leticia Olga Rubio Lamia, Margarita Vida Botella

Título Proyecto o subproyecto:

PAPEL NEUROGÉNICO DE LOS RECEPTORES CANNABINOIDES CB1 Y CB2 EN EL CEREBRO ADICTO A ALCOHOL

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto)

Organismo: Fundación IMABIS

Centro: Hospital Regional Universitario Carlos Haya

Departamento: Laboratorio de Medicina Regenerativa

Comunidad Autónoma: Andalucía

Duración: 3 años

Fecha de inicio: 1 de Enero de 2011

Fecha de finalización: 31 de Diciembre de 2013

Año Convocatoria: 2010

Área Temática:

1. Valoración del daño cerebral producido por consumo de alcohol.
2. Investigaciones sobre alcohol y gestación.

Palabras Clave: Alcohol, daño cerebral, sistema endocannabinoide, desarrollo



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

INTRODUCCIÓN

La alta vulnerabilidad de ciertos circuitos neuronales de recompensa por el consumo de alcohol conlleva neuroadaptaciones persistentes relacionadas con la plasticidad estructural y funcional, lo que se traduce en disfunciones cognitivas y pérdida del control conductual. De este modo, el consumo de alcohol durante el desarrollo altera la neurogénesis y la supervivencia celular. El sistema endocannabinoide ejerce un importante papel modulador en numerosos procesos relacionados con la neurogénesis del sistema nervioso central mediante la activación de los receptores CB1 y CB2. Estudios previos de nuestro grupo sugieren que la actividad del sistema endocannabinoide induce cambios neuroquímicos y funcionales en aquellas regiones cerebrales relacionadas con adicción a alcohol, y con procesos relacionados con la neuroprotección [Galán-Rodríguez et al., 2009, *Neuropharmacology*, 56:653-664]. Aún más, evidencias recientes de nuestro grupo indican que varias enzimas cannabinoides (DAGL, NAPE-PLD, FAAH, MAGL) están presentes en regiones neurogenéticas que son fundamentales en el cerebro adulto, como la zona subventricular de los ventrículos laterales, la zona subgranular del giro dentado y en el hipotálamo [Suárez et al., 2010, *J Comp Neurol*, 518:3065-3085]. Además, hemos descrito que el bloqueo de CB1 mediante el antagonista AM251 induce cambios en la neurogénesis adulta en modelos animales metabólicamente alterados [Rivera et al., 2011, *Eur J Neurosci* 33:1577-1586].

El objetivo principal de este proyecto pretende evaluar el papel funcional de los receptores CB1 y CB2 en estas regiones neurogenéticas (SVZ, hipocampo e hipotálamo) en modelos animales dependientes a alcohol. Para ello pretendemos analizar cambios en la proliferación, mortandad/supervivencia, migración y destino celular en cerebros en desarrollo y adultos en estados de dependencia (inducción, condicionamiento y abstinencia), así como la modulación de estos procesos neuroregenerativos mediante la activación ó bloqueo de los receptores CB1 y CB2. La recuperación funcional de animales alcohólicos mediante esta aproximación experimental podría constituir un salto cualitativo en el conocimiento de esta patología sobre la que sustentar un uso terapéutico de moléculas que modulen dichos receptores cannabinoides.

OBJETIVOS

1. Analizar la presencia y distribución de componentes relevantes del sistema endocannabinoide (NAPE-PLD, DAGL α , DAGL β , FAAH y MAGL y receptores CB1, CB2 y GPR55) en aquellas regiones del cerebro de rata relacionadas principalmente con las respuestas cognitivas (corteza prefrontal, amígdala, cerebelo y hipocampo) y motoras (estriado y sustancia negra) durante el consumo agudo y crónico de alcohol.
2. Estudio de los efectos neurodegenerativos del alcohol en distintos estados de adicción (inducción, expresión y abstinencia) en regiones neurogenéticas del cerebro en desarrollo y adulto de rata.



3. Evaluar los efectos de la dependencia alcohólica sobre las alteraciones en la conducta en animales dependientes a alcohol.
4. Estudio de la modulación/reversión de los efectos neurodegenerativos y de conducta del alcohol mediante la activación o el bloqueo de los receptores CB1 y CB2.

SUJETOS DE ESTUDIO E INSTRUMENTACIÓN

Sujetos: Los sujetos empleados han sido ratas macho tipo Wistar. Los animales han sido tratados de acuerdo a las directrices del Real Decreto 1201/2005 del 21 de Octubre de 2005 (BOE nº252) sobre protección de los animales utilizados para fines experimentales, y en conformidad con las normas de la Comunidad Europea 89/609/EEC del 24 de Noviembre de 1986 sobre la manipulación de animales de experimentación. La estabulación de los roedores se realizó en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga, por convenio con la Fundación IMABIS, y que actualmente cumple toda la normativa vigente en esta materia. La temperatura del bioterio se manteni6 a 22 ± 1 °C, con un ciclo luz-oscuridad constante de 12 horas a lo largo de todos los experimentos. La comida (*lab chow*) y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*.

Modelo de alcohol: Usamos tres dietas diferentes: dieta estandar de animalario, dieta líquida/chocolate (suplementada con vitaminas y minerales) e isocal6rica con sacarosa (20%) y dieta líquida/chocolate alcoh6lica (10% etanol 96 v/v). Para la habituaci6n de las ratas al consumo cr6nico de alcohol, los animales recibieron primero la dieta líquida/chocolate e isocal6rica durante varios d6as, para luego ser eliminada gradualmente y sustituida por la dieta líquida/chocolate y etanol 10%. Todos los d6as se recogieron la cantidad de dieta consumida y se pesaron los animales.

Tratamiento con BrdU: A los distintos grupos animales se les administr6 mediante inyecci6n intraperitoneal 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; 50 mg/kg en soluci6n salina 0.9%) dos veces al d6a durante los 6ltimos cinco d6as de dieta previos al sacrificio.

Tratamiento con cannabinoides: Realizamos un an6lisis farmacol6gico con diferentes moduladores cannabinoides sobre los efectos del alcohol en la neurog6nesis y conducta. Estos primeros estudios se realizaron con el tratamiento con el inhibidor de la enzima de degradaci6n de cannabinoides FAAH, URB597 (0.3 mg/kg), por lo que se espera un aumento generalizado de los niveles de endocannabinoides, y con los endocannabinoides OEA (10 mg/kg), AEA (10 mg/kg), ACEA (3 mg/kg) y JWH133 (0.2 mg/kg).

Evaluaci6n comportamental: Evaluamos la conducta motora mediante el test del campo abierto (Open Field; OF) y la conducta cognitiva mediante el test de reconocimiento de objeto (Object Recognition; OR).

Recolecci6n de tejidos: Tras los distintos experimentos los animales fueron anestesiados con pentobarbital (100 mg/kg) y sacrificados. Se tom6 tejido fresco, como cerebro, h6gado, m6sculo, tejido adiposo y plasma, y se congelaron inmediatamente para su posterior procesamiento y an6lisis de expresi6n g6nica, o bien los animales se perfundieron con el



fijador paraformaldehído 4% y se tomó cerebro y páncreas para su posterior procesamiento histológico e inmunohistoquímico. Los cerebros congelados se microdisecionaron mediante un criostato y se tomó las regiones cerebrales amígdala, corteza prefrontal, hipocampo e hipotálamo.

RESULTADOS

Objetivo 1: 1ª anualidad

Analizar la presencia y distribución de componentes relevantes del sistema endocannabinoide (NAPE-PLD, DAGL α , DAGL β , FAAH y MAGL y receptores CB1, CB2 y GPR55) en aquellas regiones del cerebro de rata relacionadas principalmente con las respuestas cognitivas (corteza prefrontal, amígdala, cerebelo y hipocampo) y motoras (estriado y sustancia negra) durante el consumo agudo y crónico de alcohol.

Estudios preliminares. Presencia y distribución del sistema endocannabinoide. Receptor CB1 y neurogénesis en modelos hipercalóricos.

Hemos analizado la expresión y distribución proteica y ARN mensajero de la principal enzima de síntesis y liberación del endocannabinoide 2-AG, DAGL α , en el cerebro de rata adulta, haciendo especial énfasis en las regiones cerebrales relacionadas con los circuitos de recompensa y sistema límbico. El endocannabinoide 2-AG es el ligando lipídico de los receptores CB1 y CB2 más abundante en el cerebro por lo que representa una molécula de señalización fundamental en la regulación de numerosos procesos y sistemas nerviosos. Conocer la localización regional y celular de DAGL α implica entender mejor en qué procesos interviene el sistema endocannabinoide en el cerebro [Suárez et al., 2010, *J Comp Neurol*, **518:3065-3085**].

Hemos descrito la distribución de DAGL α en el sistema olfatorio, la ruta migratoria rostral, neocorteza, regiones septo-amigdalinas, tálamo e hipotálamo. La localización de la expresión proteica de DAGL α se correlaciona con la localización de su expresión génica. Como ejemplo, podemos decir que hemos encontrado una alta expresión del ARN mensajero de DAGL α en el complejo hipocampal, concretamente en las células piramidales hipocampales y las células granulares del giro dentado. Así mismo, hemos encontrado una intensa expresión inmunohistoquímica de DAGL α en los estratos oriens y radiatum de CA1-3, y principalmente en la capa molecular del giro dentado [Suárez et al., 2011, *J Comp Neurol*, **192:112-31**].

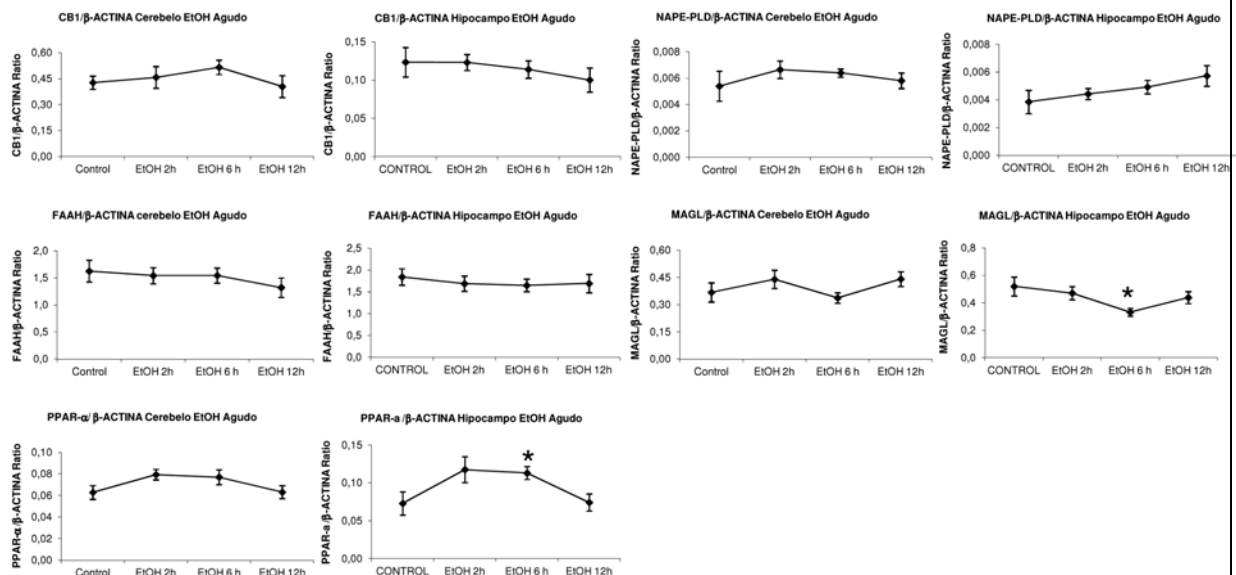
Hemos descrito el efecto de una dieta hipercalórica y el bloqueo del receptor CB1 (AM251, 3 mg/kg) en la proliferación celular de regiones neurogénicas relevantes como son la zona subgranular del giro dentado (SGZ), hipotálamo y zona subventricular de los ventrículos laterales (SVZ) [Rivera et al., 2011, *Eur J Neurosci*, **33:1577-1586**]. Hemos descrito el efecto de una dieta hipercalórica y el bloqueo del receptor CB1 (AM251, 3 mg/kg) en la expresión del sistema endocannabinoide [Rivera et al., 2013, *Eur J Neurosci*, **37:105-117**].



Efecto de la abstinencia del consumo de etanol 10% en dieta líquida administrada de forma continua e intermitente en la expresión génica del sistema endocannabinoide en la amígdala.

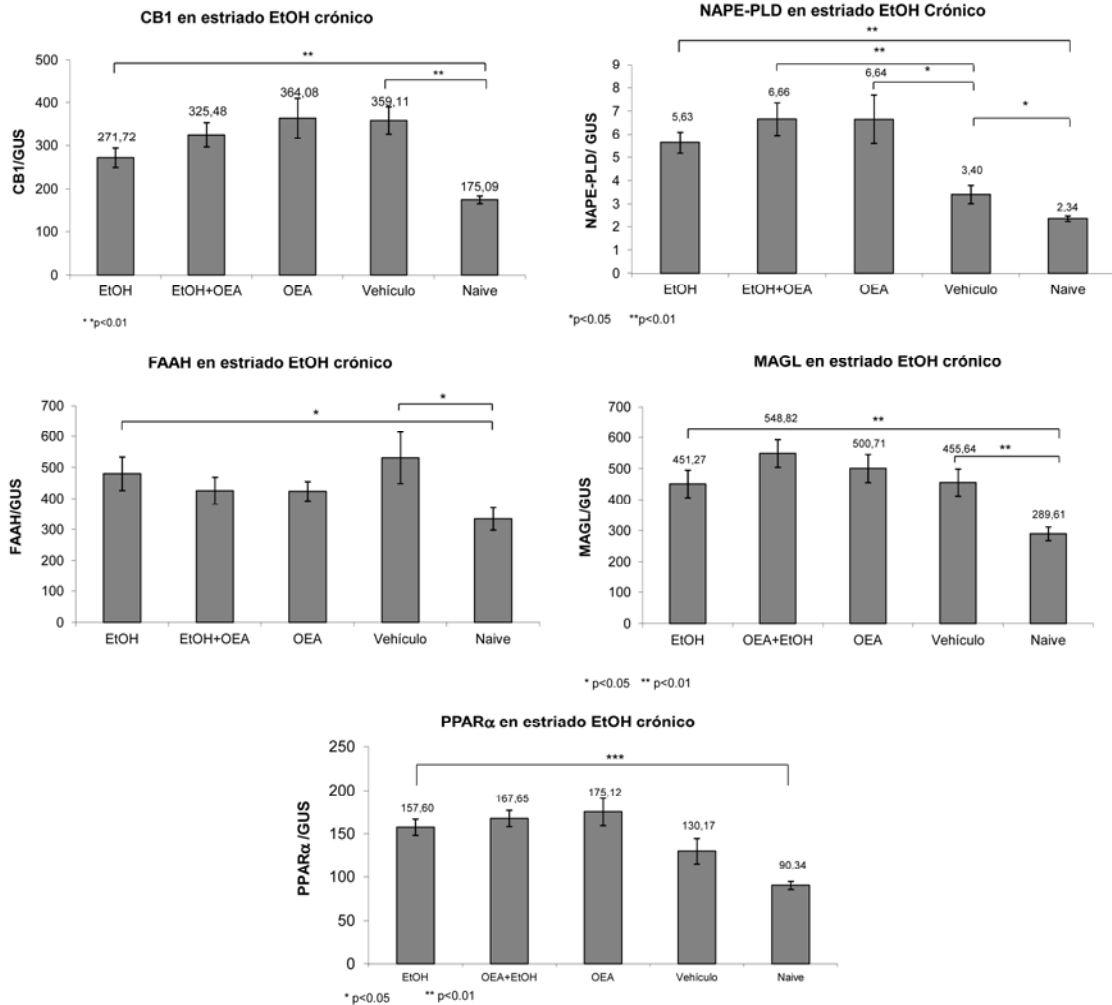
La retirada de la administración de EtOH en la dieta líquida se asoció a cambios significativos en la expresión del ARN mensajero de diversos componentes del sistema cannabinoide endógeno en la amígdala. Se observó una importante reducción en la expresión del ARNm en las rutas principales de degradación para la anandamida y 2-AG (FAAH y MAGL, respectivamente). También se encontró una evidente reducción en la expresión del ARNm para los receptores cannabinoides CB1, CB2 y GPR55. Aunque fueron similares las alteraciones en el ARNm de FAAH tras el consumo de EtOH ya sea mediante exposición continua o intermitente, las alteraciones en el ARNm de los receptores cannabinoides (CB1, CB2 y GPR55) y MAGL fueron más significativas después de la exposición intermitente de EtOH. En general, los mayores déficit de los niveles de ARNm se asociaron a una abstinencia más prolongada en el consumo de EtOH (24 h versus 6 h). Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de las enzimas de síntesis de 2-AG (DAGL α/β). Estos resultados sugieren que la dependencia EtOH y su retirada se asocian con una desregulación del sistema de señalización endocannabinoide en la amígdala [Serrano et al., 2012, Alcohol Clin Exp Res. 36(6):984-94].

Efecto agudo de la administración pasiva de etanol (4 g/kg; tras 2, 6 y 12 horas) en la expresión génica del sistema endocannabinoide en el hipocampo y cerebelo:





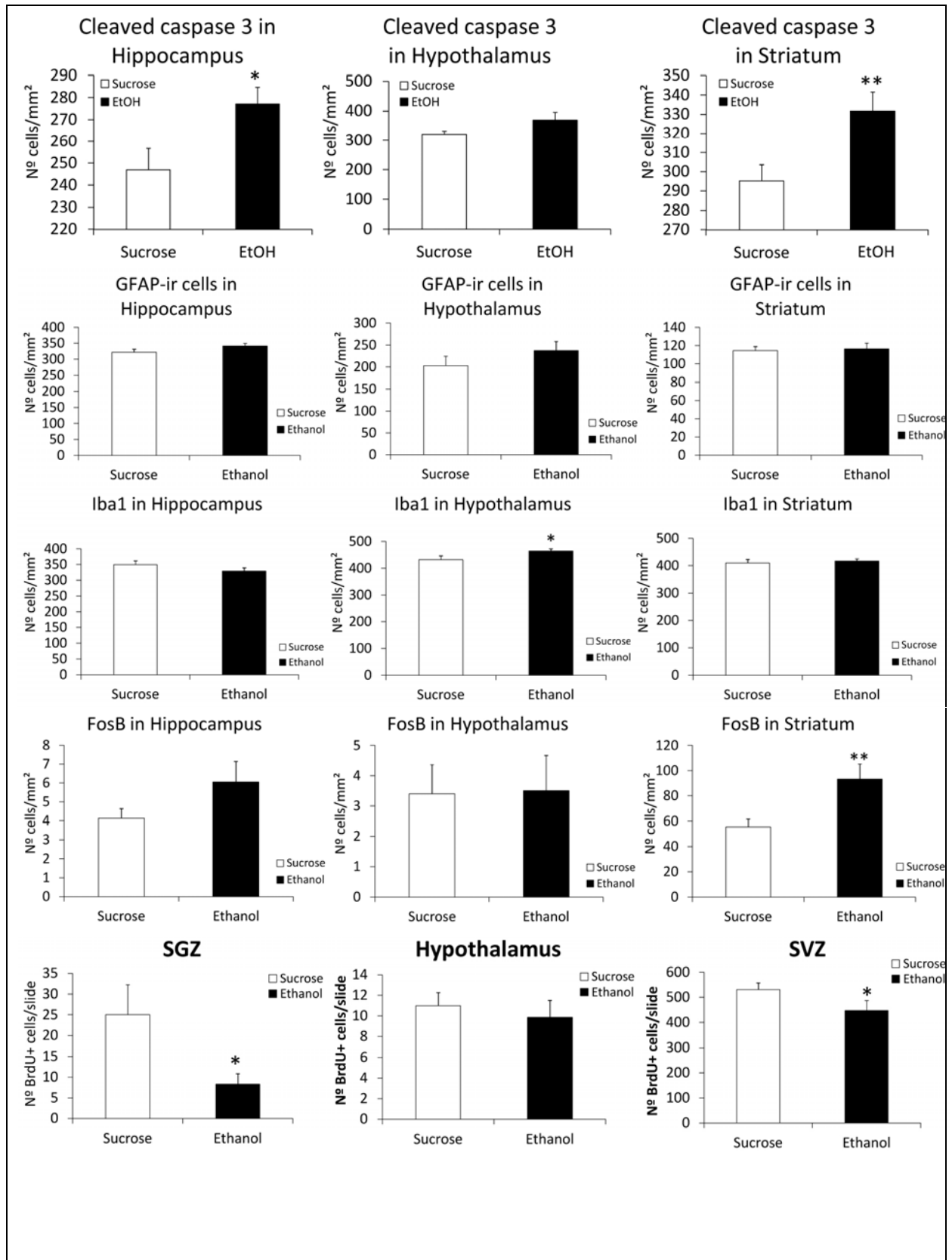
Efecto crónico del etanol 10% en dieta líquida y tras el tratamiento con el cannabinoide OEA (5 mg/kg) en la expresión génica del sistema endocannabinoide en el estriado:



Objetivos 2: 2ª anualidad

Estudio de los efectos neurodegenerativos del alcohol en distintos estados de adicción en regiones neurogénicas del cerebro en desarrollo y adulto de rata.

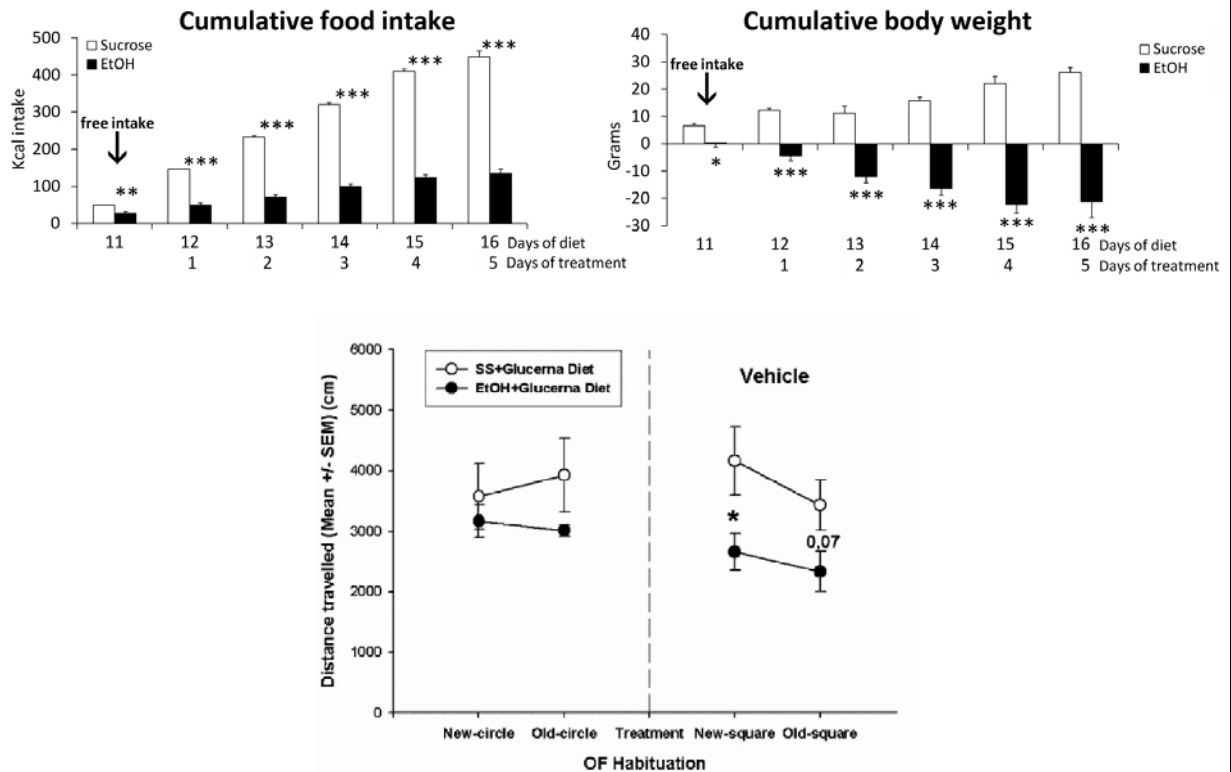
Observamos un efecto neurodegenerativo como consecuencia de un aumento de la apoptosis (cleaved caspase 3), microglía (Iba1) y de susceptibilidad (FosB). Finalmente, observamos una disminución de la proliferación celular (BrdU) en las principales regiones neurogénicas del cerebro.





Objetivos 3: 2ª anualidad

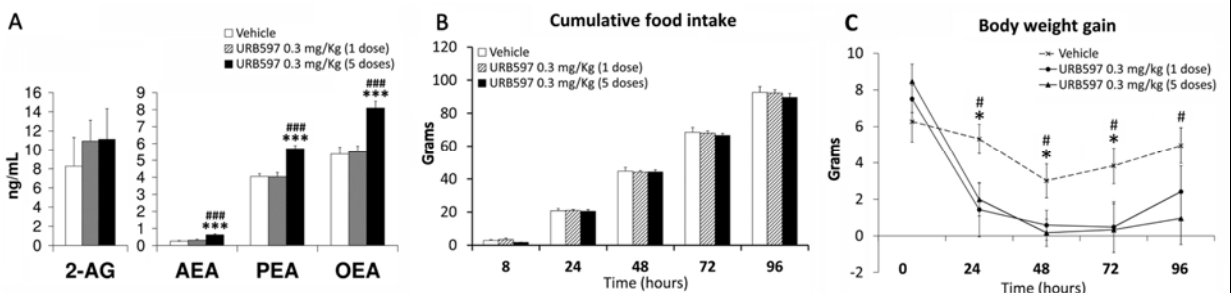
Evaluar los efectos de la dependencia alcohólica sobre las alteraciones en la conducta en animales dependientes a alcohol. Observamos un efecto deletéreo en el metabolismo energético (ingesta y peso) y de la actividad locomotora.



Objetivos 4: 3ª anualidad

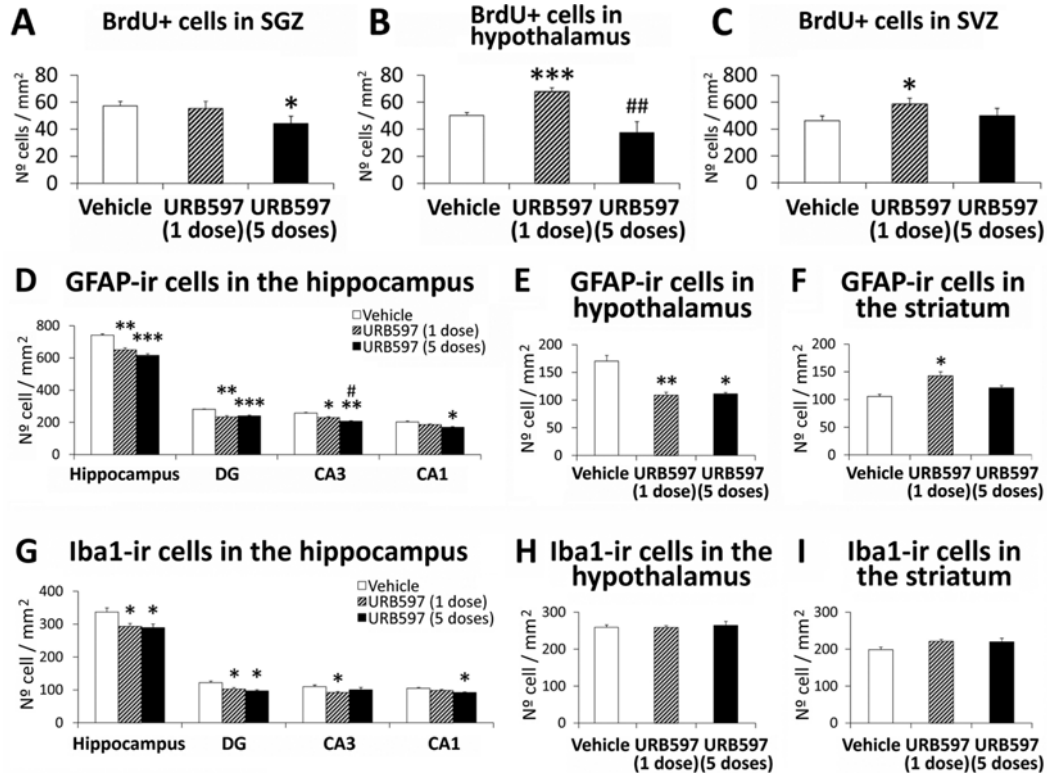
Estudio de la modulación/reversión de los efectos neurodegenerativos y de conducta del alcohol mediante la activación o el bloqueo de los receptores CB1 y CB2.

Efecto agudo (1 dosis) y subcrónico (1 dosis/día durante 5 días) del inhibidor de la enzima de degradación de cannabinoides FAAH, URB597 (0,3 mg/kg): Se observa un aumento de los niveles de endocannabinoides NAEs. Como consecuencia, se observa un efecto en ingesta de comida y peso corporal.

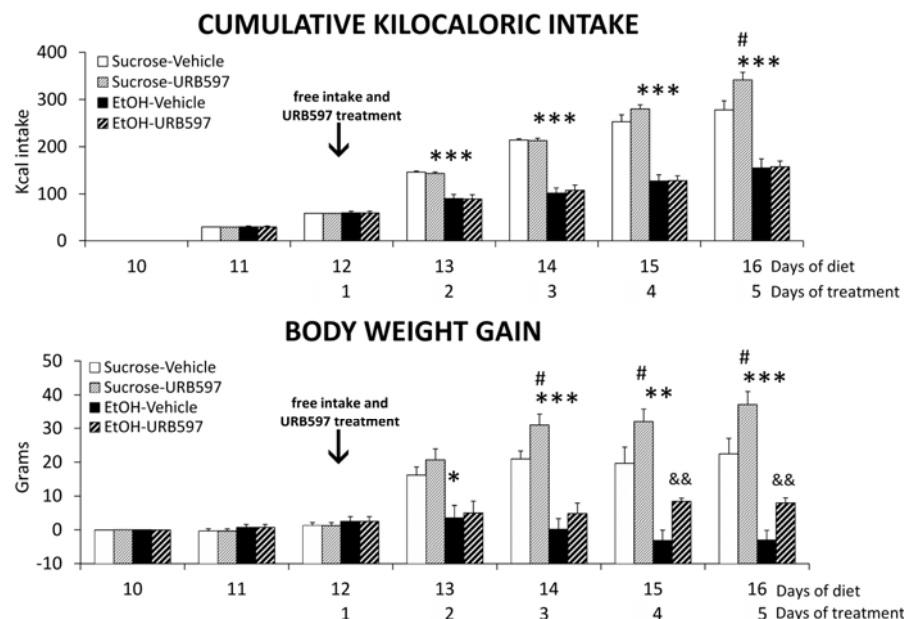




Efecto del URB597 (0,3 mg/kg) en la proliferación celular tras el tratamiento de BrdU (50 mg/kg durante 5 días) y gliosis (astroglía y microglía) en principales regiones neurogénicas en el cerebro adulto de rata:

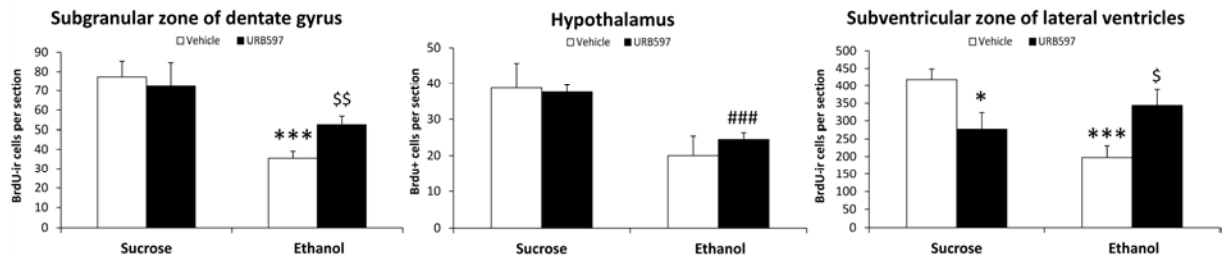


Efecto del EtOH 10% administrada en dieta líquida durante 10 días y tras el tratamiento con URB597 0,3 mg/kg y BrdU 50 mg/kg durante 5 días. Efecto del EtOH y URB597 (0,3 mg/kg) en ingesta de alcohol y peso corporal:

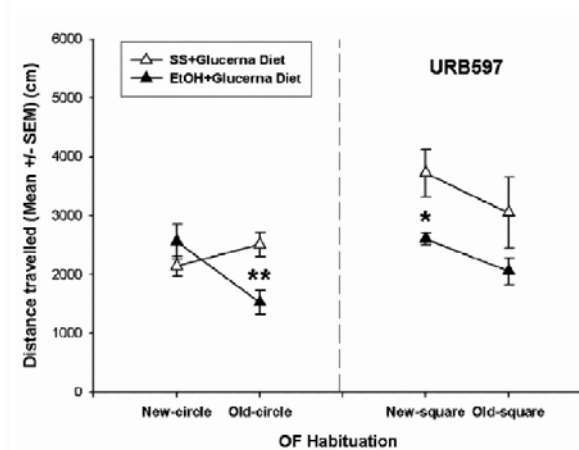




Efecto del EtOH y URB597 (0,3 mg/kg) en la proliferación celular tras el tratamiento de BrdU (50 mg/kg durante 5 días) y gliosis (astroglía y microglía) en principales regiones neurogénicas en el cerebro adulto de rata:

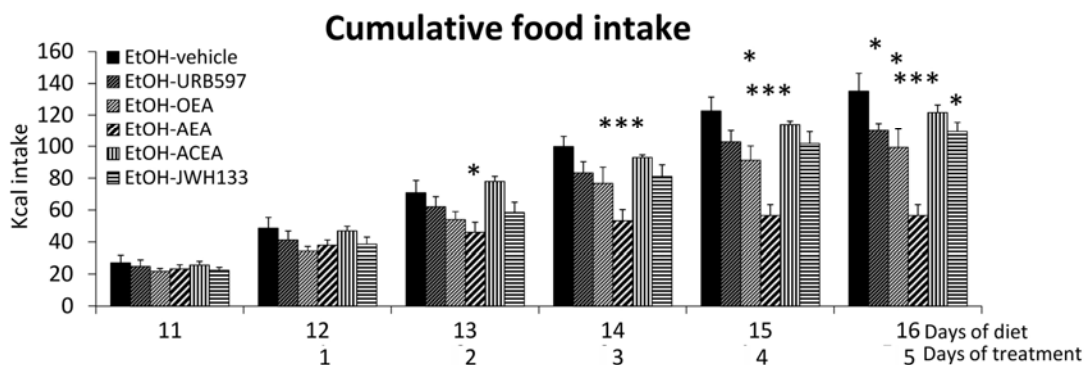
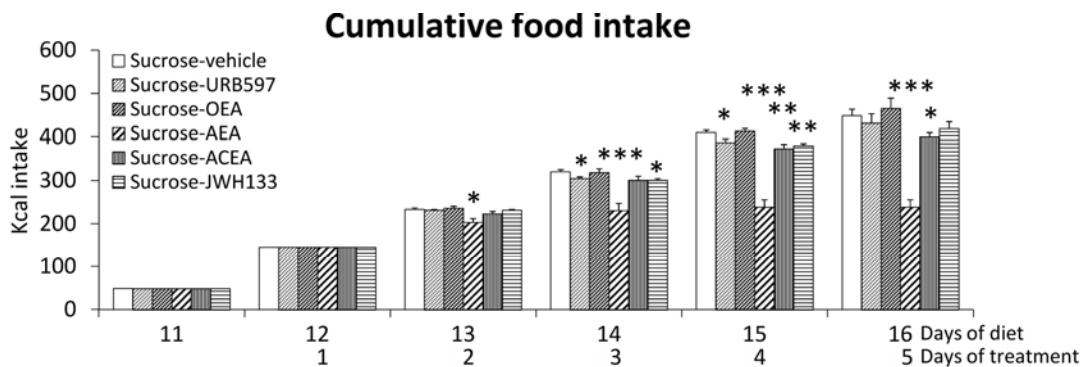
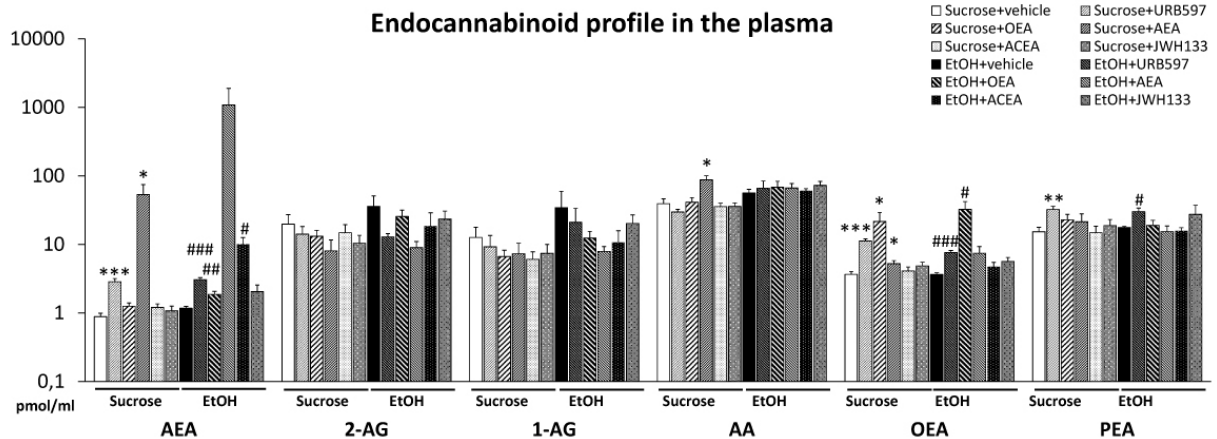


Efecto del EtOH y URB597 (0,3 mg/kg) en la locomoción (OF) antes y después de la habituación:

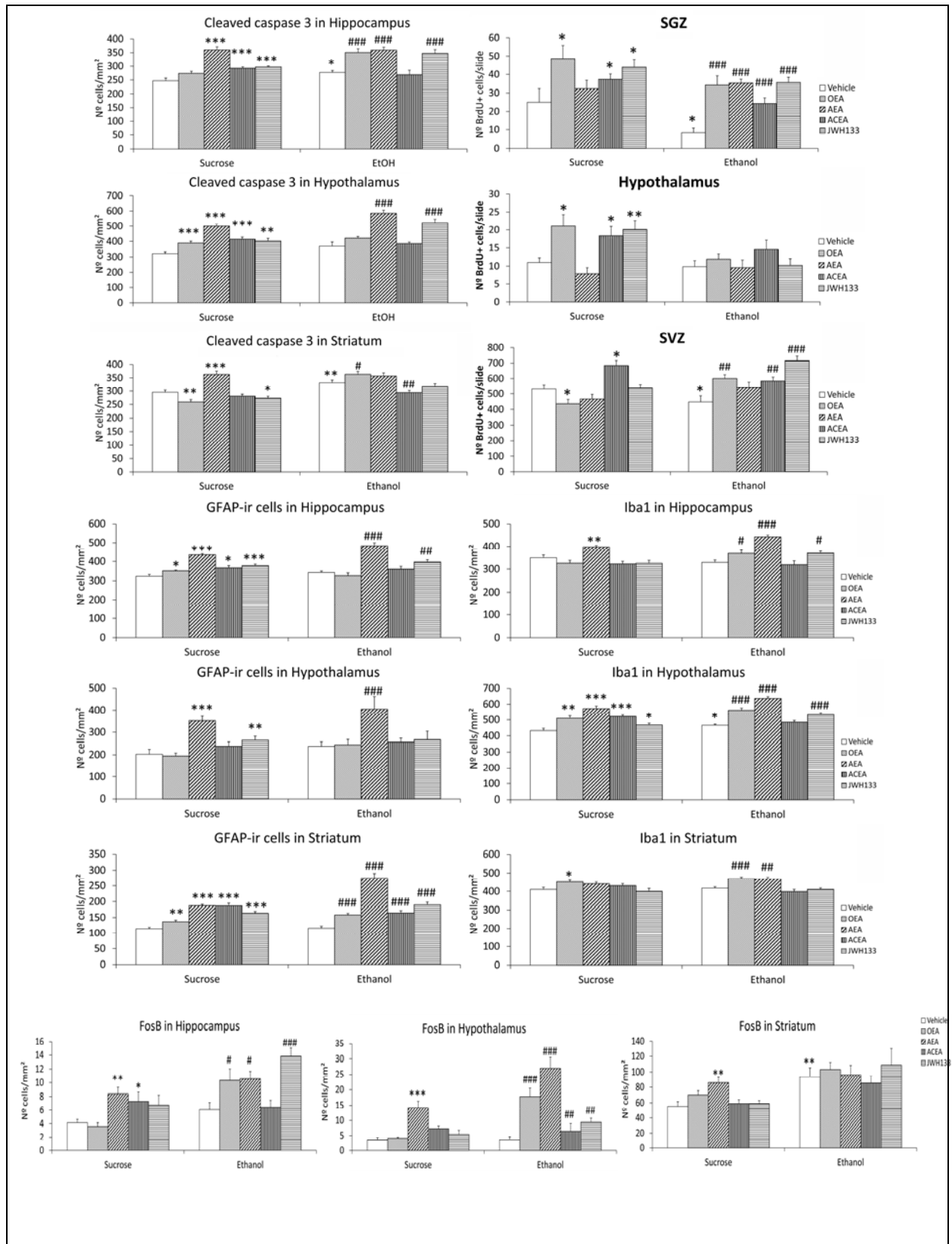




Efecto del EtOH 10% administrada en dieta líquida durante 10 días y tras el tratamiento con OEA 10 mg/kg, AEA 10 mg/kg, ACEA 3 mg/kg, JWH133 0.2 mg/kg y BrdU 50 mg/kg durante 5 días. Efecto en los niveles endocannabinoides en plasma, ingesta de alcohol y peso corporal:



Efecto en la proliferación celular tras el tratamiento de BrdU (50 mg/kg durante 5 días), apoptosis (cleaved caspase 3), gliosis (astroglía, GFAP y microglía, Iba1) y vulnerabilidad (FosB) en principales regiones neurogénicas en el cerebro adulto de rata:





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

AUTORES (por orden de firma): Suárez J*, Ortíz O, Puente N, Bermúdez-Silva FJ, Blanco E, Fernández-Llebrez P, Grandes P, de Fonseca FR, Moratalla R*. *corresponding

TÍTULO: Distribution of diacylglycerol lipase alpha, an endocannabinoid synthesizing enzyme, in the rat forebrain.

REVISTA: Neuroscience, 2011, 192:112-31

AUTORES (por orden de firma): Rivera P, Romero-Zerbo Y, Pavón FJ, Serrano A, López-Ávalos MD, Cifuentes M, Grondona, JM, Bermúdez-Silva FJ, Fernández-Llebrez P, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J*, Pérez-Martín M. *corresponding

TÍTULO: Obesity-dependent cannabinoid modulation of proliferation in adult neurogenic regions.

REVISTA: Eur J Neurosci, 2011, 33:1577-1586.

AUTORES (por orden de firma): Serrano A, Rivera P, Pavón FJ, Decara J, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Parsons LH.

TÍTULO: Differential effects of single versus repeated alcohol withdrawal on the expression of endocannabinoid system-related genes in the rat amygdala.

REVISTA: Alcohol Clin Exp Res, 2012, 36:984-94.

AUTORES (por orden de firma): Luque-Rojas MJ, Galeano P, Suárez J, Araos P, Santín LJ, Rodríguez de Fonseca F, Blanco E.

TÍTULO: Hyperactivity induced by the dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole is attenuated by inhibitors of endocannabinoid degradation in mice.

REVISTA: Int J Neuropsychopharmacol, 2013, 16:661-676.

AUTORES (por orden de firma): Rivera P, Luque-Rojas MJ, Pastor A, Blanco E, Pavón FJ, Serrano A, Crespillo A, Vida M, Grondona JM, Cifuentes M, Bermúdez-Silva FJ, de la Torre R, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J.

TÍTULO: Diet-dependent modulation of hippocampal expression of endocannabinoid signaling-related proteins in cannabinoid antagonist-treated obese rats.

REVISTA: Int J Neuropsychopharmacol, 2013, 37:105-117.

AUTORES (por orden de firma): Rivera P, Bindila L, Pastor A, Pérez-Martín M, Pavón FJ, Serrano A, de la Torre R, Lutz B, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J.

TÍTULO: Inactivation of fatty acid amino hydrolase reduces neurogenic proliferation, gliosis and apoptosis in the rat hippocampus under an improved metabolic context.

REVISTA: Hippocampus, in preparation.

AUTORES (por orden de firma): Rivera P, Bindila L, Pavón FJ, Serrano A, Lutz B, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J.

TÍTULO: Alcohol free intake aggravates the effects of cannabinoid activation on neurogenic proliferation, gliosis and apoptosis in the rat brain.

REVISTA: Addiction Biology, in preparation.



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

No.

OBJETIVOS PLANTEADOS:(Transcribir los del proyecto original)

1. Analizar la presencia y distribución de componentes relevantes del sistema endocannabinoide (NAPE-PLD, DAGL α , DAGL β , FAAH y MAGL y receptores CB1, CB2 y GPR55) en aquellas regiones del cerebro de rata relacionadas principalmente con las respuestas cognitivas (corteza prefrontal, amígdala, cerebelo y hipocampo) y motoras (estriado y sustancia negra) durante el consumo agudo y crónico de alcohol.
2. Estudio de los efectos neurodegenerativos del alcohol en distintos estados de adicción (inducción, expresión y abstinencia) en regiones neurogénicas del cerebro en desarrollo y adulto de rata.
3. Evaluar los efectos de la dependencia alcohólica sobre las alteraciones en la conducta en animales dependientes a alcohol.
4. Estudio de la modulación/reversión de los efectos neurodegenerativos y de conducta del alcohol mediante la activación o el bloqueo de los receptores CB1 y CB2.

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

1. Analizar la presencia y distribución de componentes relevantes del sistema endocannabinoide (NAPE-PLD, DAGL α , DAGL β , FAAH y MAGL y receptores CB1, CB2 y GPR55) en aquellas regiones del cerebro de rata relacionadas principalmente con las respuestas cognitivas (corteza prefrontal, amígdala, cerebelo e hipocampo) y motoras (estriado y sustancia negra) durante el consumo crónico de alcohol.
2. Estudio de los efectos neurodegenerativos del alcohol en distintos estados de adicción (inducción, expresión y abstinencia) en regiones neurogénicas del cerebro en desarrollo y adulto de rata.
3. Evaluar los efectos de la dependencia alcohólica sobre las alteraciones en la conducta en animales dependientes a alcohol.
4. Estudio de la modulación/reversión de los efectos neurodegenerativos y de conducta del alcohol mediante la activación o el bloqueo de los receptores CB1 y CB2.



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

Debido a la alta prevalencia del consumo de alcohol, uno de los retos más importantes es entender las acciones biológicas asociadas al alcoholismo, especialmente en el cerebro. La mayoría de las acciones farmacológicas debidas al alcohol resultan en toxicidad. Se considera el alcohol una droga de abuso porque afecta al sistema de recompensa a través de la transmisión glutamatérgica, GABAérgica, monoaminérgica y neuropeptidérgica. Por tanto, para desarrollar estrategias y terapias que se encaminen en la prevención de los daños debidos al consumo de alcohol, es necesario un mejor conocimiento de la neurobiología y neuropatología del alcohol.

Los resultados obtenidos de este proyecto han permitido evaluar las alteraciones neurobiológicas asociadas al consumo de alcohol en modelos animales. Las alteraciones neurobiológicas en determinados factores relacionados con la muerte celular, inflamación, vulnerabilidad y proliferación nos ha posibilitado identificar marcadores biológicos relacionados con el consumo de alcohol. Por otro lado, hemos profundizado en el papel del sistema endocannabinoide en estos modelos experimentales de abuso de alcohol. Hemos evaluado el papel neuroprotector del sistema endocannabinoide (activación de CB1 mediante AEA y ACEA, CB2 mediante JWH133 o PPAR α mediante OEA) cuyos ligandos podrían ser fármacos potenciales para el tratamiento de la adicción al alcohol.

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

Denominación: Combined therapies based on NAEs-derived compounds for the treatment of metabolic diseases.

Tipo de propiedad industrial: Patente de invención

Inventores/autores/obtenedores: Rodríguez-De Fonseca, Fernando; Rivera-gonzález, Patricia; **JUAN Suárez Pérez**; Juan Ballesteros Nobell; Carlos Diéguez González; Rubén Nogueiras Pozo; Giovanni Marsicano; Uberto Pagotto; Beat Lutz

Entidad titular: FUNDACION INSTITUTO MEDITERRANEO PARA AVANCE DE LA BIOTECNOLOGIA Y LA INVEST. SANITARIA – FIMABIS

Número de solicitud: PCT/ES2012/070276

País de prioridad: España, Andalucía Fecha: 24/10/2012 Comunidad Autónoma/Región: Aquitaine, Francia / Rheinhessen-Pfalz, Alemania / Emilia-Romagna, Italia / Andalucía, España

Empresas: VIVIA BIOTECH SL

Denominación: USO DE DERIVADOS DE SULFAMIDAS COMO NEUROPROTECTORES

Tipo de propiedad industrial: Patente de invención

Inventores/autores/obtenedores: Fernando Rodriguez de Fonseca; **Juan Suárez Pérez**; Miguel Romero Cuevas; Emilio Fernández Espejo; Páez-Prósper, Juan Antonio; Goya-Laza, María Pilar

Entidad titular: FUNDACION INSTITUTO MEDITERRANEO PARA AVANCE DE LA BIOTECNOLOGIA Y LA INVEST. SANITARIA – FIMABIS

Número de solicitud: P201130486

País de prioridad: España, Andalucía Fecha: 30/03/2011 Patente española: No Comunidad Autónoma/Región: Andalucía, España



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

No.

SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS: organismo, convocatoria y cantidad.

No.

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

No.

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

En Málaga a 12 de Febrero de 2014

FIRMA