



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

FINAL

Número Expediente: 2009/049

Investigador Principal: FERNANDO RODRIGUEZ DE FONSECA

Otros Investigadores: MIGUEL LUCENA, MIGUEL ROMERO, RAFAEL CAMPOS, LAURA ORIO, ISOLDE GORNEMANN. Becario predoctoral: PEDRO ARAOS GÓMEZ

Título Proyecto o subproyecto *PROTEÓMICA DE LA ADICCIÓN A COCAINA: MARCADORES CENTRALES Y PERIFERICOS DE ADICCIÓN*

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

Organismo: FUNDACION IMABIS DE MALAGA

Centro: HOSPITAL CARLOS HAYA DE MALAGA

Departamento: LABORATORIO DE MEDICINA REGENERATIVA, UNIDAD DE NEUROPSICOFARMACOLOGIA

Comunidad Autónoma: ANDALUCIA

Duración: 3 AÑOS

Fecha de inicio: OCTUBRE 2009

Fecha de finalización: OCTUBRE 2012

Año Convocatoria: 2009

Área Temática: ADICCIÓN A COCAINA

Palabras Clave: COCAINA, ADICCION, HUMANOS, PROTEOMICA, BIOMARCADORES

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

La adicción a cocaína es un problema de salud muy importante en las sociedades europeas, con una alta penetración en edades tempranas y un fuerte impacto social y sanitario. EN la actualidad se carece de tratamientos efectivos para la misma así como de biomarcadores de adicción, es decir, de métodos de fenotipaje biológico específico de severidad de la pérdida del control sobre el uso de esta droga. El presente proyecto pretende explorar, mediante técnicas de proteómica, la expresión diferencial de proteínas en modelos animales de adicción a cocaína y en humanos adictos que acuden a centros de tratamiento por su dependencia. Los estudios están destinados a identificar a) Proteínas en el cerebro de animales adictos que puedan servir para el desarrollo de nuevas terapias. B) Proteínas presentes en el plasma y células sanguíneas de animales adictos que puedan servir de biomarcadores de adicción, y c) proteínas presentes en el plasma y células sanguíneas de animales adictos que puedan servir de biomarcadores de severidad en el consumo. EL fin último del proyecto es la mejora en el diagnóstico y atención a la población adicta a cocaína de nuestro entorno social.



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

ARTICULOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD

1. Rivera P, Miguens M, Coria S, Rubio L, Higuera-Matas A, Bermudez-Silva F, Rodriguez de Fonseca F, Suarez J, Ambrosio E. Cocaine self-administration differentially modulates the expression of endogenous cannabinoid system-related proteins in the hippocampus of Lewis versus Fischer F344 rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*. (En prensa, 2012).
2. Bilbao A, Blanco E, Luque-Rojas M, Suarez J, Palomino A, Vida-Botella M, Araos P, Bermudez-Silva F, Fernandez-Espejo E, Spanagel R, Rodriguez de Fonseca F. Oleoylethanolamide dose-dependently attenuates cocaine-induced behaviours through a PPARalpha receptor-independent mechanism. *Addiction Biology* (En prensa, 2012)
3. Echeverry-Alzate V, Tuda-Arízcan M, Bühler KM, Santos A, Giné E, Olmos P, Gorriti MÁ, Huertas E, Rodríguez de Fonseca F, López-Moreno JA. Cocaine reverses the naltrexone-induced reduction in operant ethanol self-administration: The effects on immediate-early gene expression in the rat prefrontal cortex. *Neuropharmacology*. 2012 Nov;63(6):927-35. Epub 2012 Jun 28. PubMed PMID: 22749946.
4. Luque-Rojas MJ, Galeano P, Suárez J, Araos P, Santín LJ, de Fonseca FR, Calvo EB. Hyperactivity induced by the dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole is attenuated by inhibitors of endocannabinoid degradation in mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2012 May 30:1-16. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22647577.
5. Blanco E, Bilbao A, Luque-Rojas MJ, Palomino A, Bermúdez-Silva FJ, Suárez J, Santín LJ, Estivill-Torrús G, Gutiérrez A, Campos-Sandoval JA, Alonso-Carrión FJ, Márquez J, de Fonseca FR. Attenuation of cocaine-induced conditioned locomotion is associated with altered expression of hippocampal glutamate receptors in mice lacking LPA1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Mar;220(1):27-42. Epub 2011 Sep 2. PubMed PMID: 21887497.
6. Blanco E, Campos-Sandoval JA, Palomino A, Luque-Rojas MJ, Bilbao A, Suárez J, Márquez J, de Fonseca FR. Cocaine modulates both glutaminase gene expression and glutaminase Activity in the brain of cocaine-sensitized mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2012 Feb;219(4):933-44. Epub 2011 Aug 2. PubMed PMID: 21809009.
7. Viveros MP, Llorente R, Suarez J, Llorente-Berzal A, López-Gallardo M, de Fonseca FR. The endocannabinoid system in critical neurodevelopmental periods: sex differences and neuropsychiatric implications. *J Psychopharmacol*. 2012 Jan;26(1):164-76. Epub 2011 Jun 13. Review. PubMed PMID: 21669929.

ARTICULOS INDIRECTAMENTE RELACIONADOS CON LA ACTIVIDAD

1. Serrano A, Rivera P, Pavon FJ, Decara J, Suárez J, Rodriguez de Fonseca F, Parsons LH. Differential effects of single versus repeated alcohol withdrawal on the expression of endocannabinoid system-related genes in the rat amygdala. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012 Jun;36(6):984-94. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01686.x. Epub 2011 Dec 5. PubMed PMID: 22141465; PubMed Central PMCID: PMC3297719.
2. Cippitelli A, Astarita G, Duranti A, Caprioli G, Ubaldi M, Stopponi S, Kallupi M, Sagratini G, Rodríguez de Fonseca F, Piomelli D, Ciccocioppo R. Endocannabinoid regulation of acute and protracted nicotine withdrawal: effect of FAAH inhibition. *PLoS One*. 2011;6(11):e28142. Epub 2011 Nov 30. PubMed PMID: 22140525; PubMed Central PMCID: PMC3227620



ARTICULOS EN PREPARACION

1. P. Araos, F.J. Pavón; A. Pastor, R. De La Torre, R. Campos, J.J. Ruiz, E. Vergara, M. Calado, M. Torrens, F. Rodriguez De Fonseca. Analysis of acylethanolamides in plasma of cocaine addicts with a long history of dependence. PLOS MEDICINE.
2. P. Araos, M. Lucena, F.J. Pavón; A. Pastor, R. De La Torre, R. Campos, J.J. Ruiz, E. Vergara, M. Calado, G F Koob, M. Torrens, F. Rodriguez De Fonseca. Plasma cytokine profile in cocaine addicts with a long history of dependence. Biological Psychiatry.
3. F.J. Pavón; L. Orio, P. Araos, A. Pastor, R. De La Torre, R. Campos, J.J. Ruiz, E. Vergara, M. Calado, M. Torrens, G.F. Koob, F. Rodriguez De Fonseca. Proteomic analysis of reward-related brain areas of cocaine scalating rats. Neurosychopharmacology.

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

No ha habido cambios metodológicos con respecto a la propuesta inicial ni con respecto a la última anualidad. Si se han añadido como objetivos adicionales la medición de aciletanolamidas en plasma de los pacientes adictos a cocaína. La investigación desarrollada en el modelo animal (Ver Bilbao et al., Addiction Biology; Rivera et al, Int J Neuropsychopharmacology y Luque-Rojas et al., Int J Neuropsychopharmacology) demostró que la expresión y la función de proteínas responsables de la formación y degradación de estos lípidos bioactivos variaba en función de la exposición a cocaína, el desarrollo de dependencia y el genotipo del animal. Este hecho tenía, además, repercusiones funcionales en la sensibilidad a cocaína. En base a estos hallazgos se decidió medir estos lípidos bioactivos en casos y controles de pacientes adictos a cocaína (Araos et al., Neurosychopharmacology en preparación).

OBJETIVOS PLANTEADOS :(Transcribir los del proyecto original)

OBJETIVO 1 Obtener muestras de cerebro, plasma y linfocitos de animales sometidos a un proceso de escalamiento en la autoadministración de cocaína mediante protocolos de acceso prolongado. Obtener como controles, muestras de animales que rechazan la autoadministración o con las de animales sometidos a protocolos de acceso restringido.

OBJETIVO 2 Obtener muestras de plasma y linfocitos de pacientes con distintos fenotipos de consumo de cocaína bien fenotipados (larga y corta duración, con o sin escalado, con diferente puntuación de craving, con o sin patología comorbida) y sometidos a seguimiento en las unidades de atención a pacientes adictos de la provincia de Málaga. Utilizar como controles voluntarios sanos reclutados en la provincia de Málaga con misma distribución de edades y sexos.

OBJETIVO 3 Realizar un análisis proteómico de expresión diferencial en fracciones citosólica y de membrana de áreas cerebrales de los animales del Objetivo 1. Realizar el mismo análisis en fracciones citosólica y de membrana de linfocitos, así como en fracción de plasma.

OBJETIVO 4 Realizar un análisis en fracciones citosólica y de membrana de linfocitos, así como en fracción de plasma de pacientes y controles del Objetivo 2.



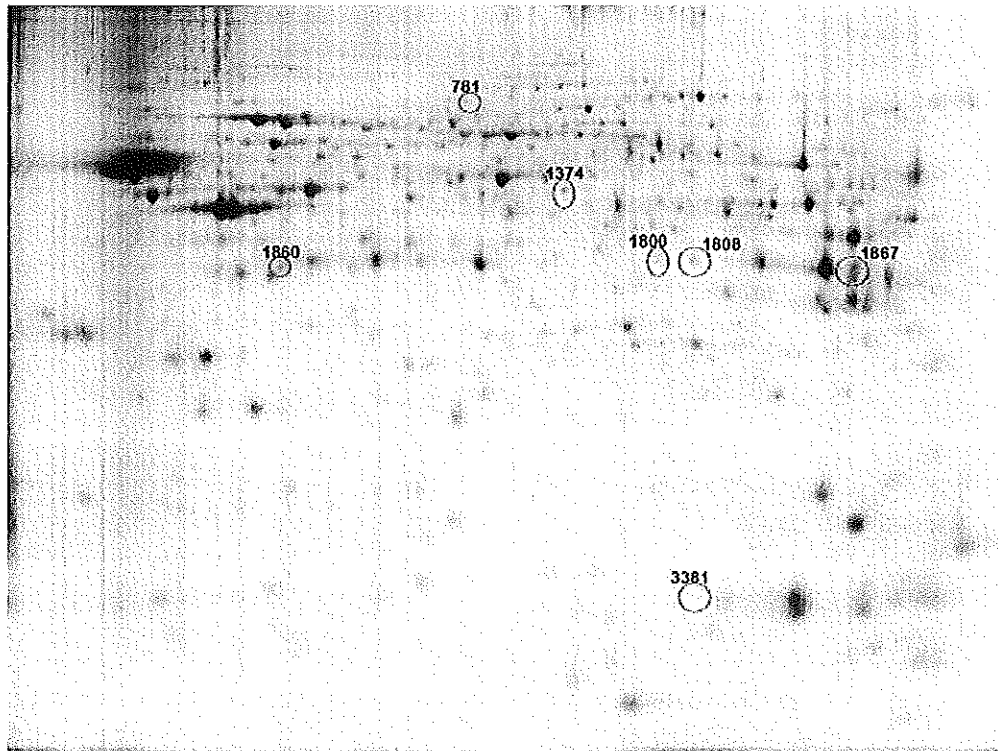
OBJETIVO 5 Realizar un análisis comparativo de proteínas candidato de linfocitos y plasma entre las dos especies y entre fenotipos. Establecer candidatos a biomarcadores diagnósticos de adicción y a dianas terapéuticas de adicción a cocaína.

OBJETIVOS CONCRETOS ALCANZADOS:

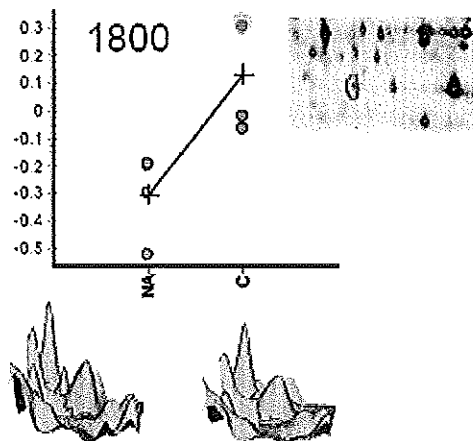
OBJETIVO 1. Se ha finalizado la recogida de muestras de animales que desarrollaron escalada en la autoadministración de drogas, y de animales que rechazaron la misma. Se han diseccionado los cerebros para los análisis proteómicos en corteza prefrontal, nucleo accumbens, estriado e hipocampo. Se han generado los geles 2-D para análisis diferencial de ambos fenotipos utilizando la técnica 2D-DiGE (Electroforesis bidimensional diferencial en gel). Esta técnica de proteómica se realiza de la siguiente manera:

Los extractos de proteína de las diferentes áreas cerebrales son obtenidos tras homogeneizar con tampón de lisis y DDT. Dichos extractos son purificados (usando el kit *BioRad Cleanup ReadyPrep 2D*) y cuantificados (por Bradford). Una vez ajustados el pH de los extractos, estos son marcados con diferentes fluoróforos, de modo que esta técnica permite correr en un mismo gel hasta tres muestras diferentes usando controles internos iguales para todo gel a partir de la mezcla de todas las muestras marcadas (Para el marcaje se utilizará *Refraction-2D Labeling Kit de NH DyeAGNOSTICS*). Los extractos una vez marcados, pueden ser separados por 2D-PAGE (electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida) a través 2 etapas: 1) Tiras de IPG (gradiente de pH inmovilizado), previamente rehidratadas en un Sistema de Isoelectroenfoque de BioRad (tampón de rehidratación *DeStreak Rehydration Solution* y biolitos), sumergidas en aceite mineral. 2) Geles comerciales para separar en un segundo paso por su peso molecular. Una vez diferenciadas bidimensionalmente las muestras, los geles se escanean por láser y las imágenes de cada muestra proteica pueden ser analizadas por un software de procesamiento de imagen y estadística para encontrar diferencias entre ellas (*DeCyder-Differential analysis software*). Finalmente, las manchas proteicas que resultan diferentes significativamente se procesan e identificarán a través de espectrometría de masas en tándem por la técnica MALDI-TOF (podría traducirse como: desorción/ionización láser asistida por matriz acoplado a un detector iónico de tiempo de vuelo). Por lo tanto, utilizamos esta nueva técnica para determinar diferencias entre varias regiones cerebrales de ratas Wistar consumidoras o no de cocaína. Los análisis proteómicos se realizan en colaboración con el Profesor Corrales F. (CIMA, Universidad de Navarra). La secuenciación proteica se realiza en base a la identificación de varios fragmentos de péptidos y su posterior análisis de solapamiento con la proteína candidata.

Los análisis realizados por esta técnica dan el siguiente tipo de resultados



Esta imagen de un gen bidimensional corresponde a una electroforesis hecha de un caso y un control simultáneamente analizados. Mediante fluorescencia se identifican las proteínas con expresión diferencial entre caso (cocaína) y control (Animal sin exposición) que permite identificar si la variación es por incremento o disminución de la expresión. Por ejemplo, para la proteína marcada como 1800 el resultado es el siguiente.



Esta proteína candidata es posteriormente analizada, dando su análisis de secuencia la identificación de Glicer aldehído 3-p deshidrogenasa que es una enzima del metabolismo de la glucosa y cuya expresión incrementada en los animales adictos a cocaína indica una mayor utilización de recursos energéticos, en este caso por parte de la corteza prefrontal medial.

OBJETIVO 2 Se han reclutado y fenotipado clínicamente 109 casos, en los que se ha evaluado la comorbilidad psiquiátrica, así como 73 controles a los que se ha realizado un estudio de



historial de consumo de drogas y psicopatología, seleccionándose aquellos casos que cumplieran los criterios de no exposición. Los controles fueron pareados por edad, sexo e índice de masa corporal. Todos ellos donaron voluntariamente sangre de la que se extrajo a) Plasma para los estudios proteómicos, b) Linfocitos para los estudios proteómicos en el compartimento inmune y c) DNA y RNA que se procesó en el banco de muestras de la Red de Trastornos Adictivos. Los datos de la población reclutada fueron los detallados en la Tabla 1. La tabla 2 muestra un primer análisis preliminar de la presentación de psicopatología en 43 casos de consumidores de Cocaína, comparándose a continuación con la población tratada en comunidad terapéutica o con la población general andaluza. Se han recogido también 100 muestras poblacionales de plasma de participantes del estudio Pizarra, una cohorte poblacional en la que se está estudiando en la localidad de Pizarra en Málaga la relación entre dieta, factores nutricionales y factores genéticos en el desarrollo de enfermedades crónicas.

El análisis de psicopatología asociada a consumo de cocaína en pacientes que demandan tratamiento en los centros provinciales de drogodependencias de Málaga se está realizando utilizando como comparación las poblaciones identificadas en centro hospitalario (Colaboración con la Dra. Marta Torrens), en centro de comunidad terapéutica (Colaboración con los Drs. Antonio Verdejo y Esperanza Vergara, de la Universidad de Granada) y con la población general andaluza (Estudio realizado por la Dra. Isolde Gorneman).

Se está preparando una publicación común para describir las diferencias y similitudes en la presentación de patología comórbida (Patología dual) en las poblaciones de estos centros.



Tabla 1. Características sociodemográficas y los trastornos por consumo de sustancias.

		CPD	CONTROL
N (%)		Total 109 (100)	Total 73 (100)
Edad [Media (DT)]		36.6 (8.7)	38.5 (10.8)
Sexo			
Hombre		94 (86.2)	40 (54.8)
Mujer		15 (13.8)	33 (45.2)
Estado Civil			
Nunca casado		60 (55.0)	38 (51.8)
Casado		27 (24.8)	28 (37.3)
Divorciado/Separado		21 (19.3)	7 (9.5)
Viudo		1 (0.9)	1 (1.4)
Nivel Educativo			
≤ Estudios Primarios		79 (72.5)	2 (2.7)
≥ Estudios Secundarios		30 (27.5)	71 (97.3)
Empleo			
Empleo		38 (34.9)	59 (80.1)
Desempleo		66 (60.6)	6 (8.2)
Jubilación/Incapacidad		5 (4.5)	-
Estudios		-	8 (10.9)
Alguna Detención			
No		59 (55.1)	73 (100)
Sí		50 (45.9)	-
Algún tratamiento por consumo de sustancias			
No		10 (9.2)	73 (100)
Sí		99 (90.8)	-
Algún tratamiento psicológico o psiquiátrico			
No		70 (64.2)	59 (80.1)
Sí		39 (35.8)	14 (19.9)
Trastornos por consumo de Sustancias			
Cocaína Abuso		92 (84.4)	-
Cocaína Dependencia		95 (87.2)	-
Otras sustancias Abuso		60 (55.0)	1 (1.4)
Otras Sustancias Dependencia		46 (42.2)	-
Trastornos Psiquiátricos Comorbidos			
Trastornos Afectivos		48 (44.4)	6 (8.2)
Trastornos de Ansiedad		24 (22.0)	4 (5.5)
Trastornos por Estrés Post-Traumático		11 (10.2)	6 (8.2)
Trastornos Psicóticos		28 (25.9)	-



Tabla 2. Comorbilidad Psiquiátrica.

Comorbilidad psiquiátrica - vida	n(%)	IC 95%
ALGÚN TRASTORNO MENTAL	43 (79,6)	66,4-89,3
TRASTORNOS EJE I		
TRASTORNOS ESTADO DE ANIMO (TEA)	31 (57,4)	43,2-70,7
TEA PRIMARIOS	12 (22,2)	12,0-35,5
TEA INDUCIDOS	25 (46,3)	32,6-60,4
TRASTORNOS DE ANSIEDAD (TA)	17 (31,4)	19,5-45,5
TA PRIMARIOS	12 (22,2)	12,0-35,5
TA INDUCIDOS	15 (27,7)	16,4-41,6
TRASTORNOS PSICÓTICOS (TP)	17 (31,4)	19,5-45,5
TP PRIMARIOS	2 (3,7)	0,45-12,7
TP INDUCIDOS	9 (16,7)	7,9-29,2
TRASTORNOS CONDUCTA ALIMENTARIA (Bulimia)	1 (1,9)	0,004-9,8
TRASTORNOS EJE II		
TRASTORNO ANTISOCIAL DE LA PERSONALIDAD	15 (27,8)	16,4-41,6
TRASTORNO LÍMITE DE LA PERSONALIDAD	19 (35,2)	22,6-49,3

Estos casos se han comparado con los identificados en una cohorte de una comunidad terapéutica, y con los conocidos para la población andaluza general. Como se observa en la siguiente tabla, los trastornos del estado de ánimo (TEA) son mas frecuentes en nuestra cohorte que en población general, así como los trastornos afectivos (TA).

Trastornos Psiquiátricos	Población normal (%) (n=1600) (1)	Pacientes CPD (%) (n=54)	Exacto de Fisher
TEA	26,2	57,4	<0,0001**
TA	17,5	31,4	0,017*
Algún diagnóstico vida	42,1	79,6	<0,0001**

OBJETIVO 3 Se han finalizado los estudios de proteómica en animales que desarrollan escalada a cocaína (Rata) y se ha comenzado con la generación de los geles de separación proteica 2-d en humanos. De modo adicional, se han realizado estudios de expresión de proteínas relevantes para la adicción a cocaína en el cerebro de rata y ratón y se han desarrollado análisis de validación farmacológica.

Estudios en animales de experimentación.

En rata Wistar se ha analizado la expresión diferencial de proteínas en las cuatro áreas cerebrales propuestas, comparando animales que hacen escalada en la adicción con animales que no se han expuesto a cocaína. El análisis de los resultados esta en marcha y se ha terminado el relacionado con la corteza prefrontal, un elemento anatómico clave que determina el comportamiento compulsivo de los sujetos que desarrollan escalada en el consumo de cocaína y pierden el control. Las proteínas candidatas encontradas hasta el momento son las siguientes:



Nombre	T-test and Av.Ratio: NA / C	Tasa de cambio en ratas adictas Av. Ratio
Proteína EZRIN	T-test 0,0039	1,2
Elongation factor Tu, mitochondrial	0,041	-1,22
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,014	2,86
Lactate dehydrogenase	0,0021	1,6
Tubulin beta-2A chain	0,047	-1,33
Voltage-dependent anion-selective channel protein	0,046	-1,27
Hemoglobin subunit beta-1	0,018	-1,44

Como puede observarse, la proteínas candidatas a modificarse drásticamente en los animales que hacen escalada tienen que ver con el citoesqueleto y la reorganización sináptica (Ezrina, Tubulina), así como con el metabolismo energético (Proteínas mitocondriales y citoplasmáticas relacionadas con la producción de energía). También se observa una disminución de una proteína que tienen que ver con la transmisión inhibitoria, lo que conllevaría una mayor excitabilidad. Estos hallazgos indican que en la corteza prefrontal de animales que desarrollan escalada en la adicción a cocaína, los cambios subyacentes afectan a la estructura y desarrollo de conexiones sinápticas, así como a la tasa de consumo energético de las neuronas corticales. El siguiente paso previsto es la realización de un análisis diferencial de la expresión de estas proteínas mediante a) inmunohistoquímica en cerebros de ratas que realizan escalada y b) utilización de transfecciones virales para producir pérdidas o ganancias de función de estas proteínas y comprobar si así se revierte el fenotipo.

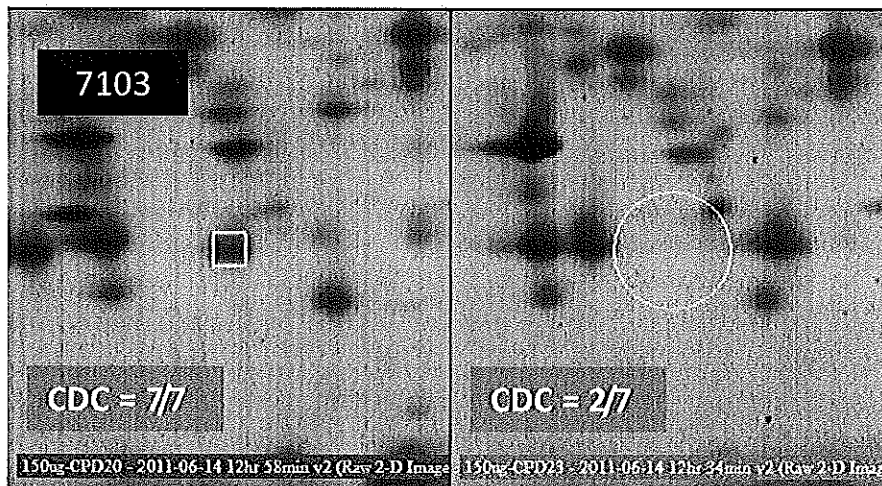
Con el objetivo de ampliar el análisis proteico en animales dependientes a cocaína, se han realizado experimentos adicionales en los que se ha identificado la presencia y la actividad de otras proteínas involucradas en la adicción. Se han utilizado tanto modelos de ratón como modelos de rata, en los que se ha analizado la expresión de estas proteínas en animales con y sin exposición a cocaína. Se ha explorado a) la acción y efectos de la cocaína sobre la expresión y actividad de la glutaminasa, así como b) el papel del receptor del ácido lisofosfatídico cerebral tipo 1 (LPA1) en las respuestas a cocaína y c) el papel del receptor PPAR α y su ligando endógeno oleiletanolamida en la adicción a cocaína. Estos tres estudios se han publicado en las revistas *Psychopharmacology* y *Addiction Biology* (Ver sección de artículos publicados). Estos estudios demuestran que:

1. La producción de glutámico por la enzima glutaminasa puede verse afectada por la exposición a cocaína, lo que conllevaría cambios adaptativos en la transmisión excitatoria cortical.
2. En el caso del receptor para ácido lisofosfatídico tipo 1 (LPA1), se ha comprobado que esta proteína en el cerebro es esencial para el mantenimiento de los aprendizajes condicionados relacionados con la exposición a cocaína.
3. Se ha comprobado que la Oleiletanolamida, pero no el receptor PPAR α es capaz de modular el aprendizaje y las respuestas adaptativas a cocaína.



Por ultimo, se ha diseñado un estudio de expresión diferencial de proteínas en dos cepas de ratas (Lewis y Fischer) con distinta sensibilidad a cocaína, en los que se ha estudiado fundamentalmente la distribución del sistema endocannabinoide. Este estudio se ha realizado como colaboración con el profesor Emilio Ambrosio, de la UNED. Los resultados iniciales se han publicado en el Int J of Neuropsychopharmacology.

OBJETIVO 4 Se han comenzado los análisis de secuenciación de las proteínas diferencialmente expresadas en el plasma de usuarios de cocaína con fenotipos extremos, teniendo como límites establecidos la presencia de dos o menos criterios de adicción o de siete criterios para diferenciar fenotipos extremos. Los primeros análisis han identificado proteínas expresadas diferencialmente que podrían ser candidatas a biomarcadores de adicción, como las que se presentan a continuación.



Candidato 1

Voltage-dependent N-type Ca^{2+} channel



Candidato 2

Iodotyrosine dehalogenase 1 (Q6PHW0)

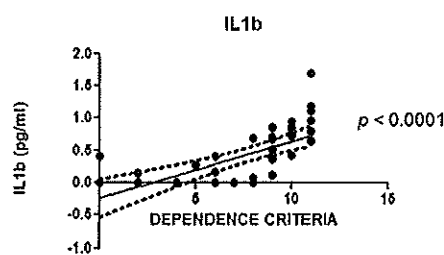
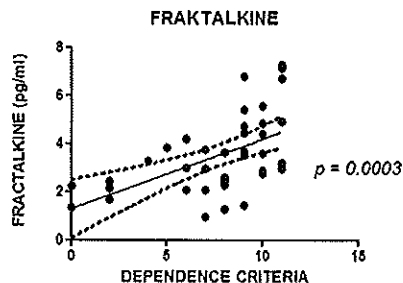
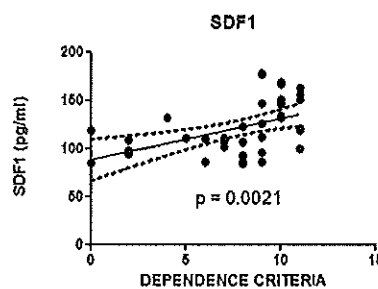
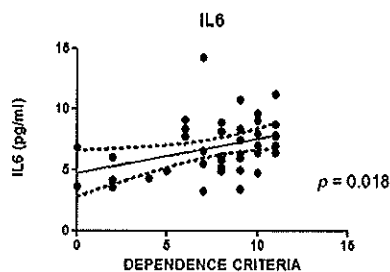


Se han identificado candidatos relacionados con perfil metabólico, control hormonal y señalización intercelular. Estos candidatos deberán validarse en un número suficientemente alto de casos y controles, trabajo que se ha puesto en marcha en este momento al alcanzarse ya una cifra mínima de 75 casos y 75 controles para poder hacer un estudio poblacional con seguridad. Adicionalmente, y tras poner a punto la técnica DIGE, descrita en el objetivo 1, se está considerando la posibilidad de hacer un estudio de expresión diferencial de perfiles proteicos en colaboración con el laboratorio de biomarcadores proteicos de Sabine Bahn de la Universidad de Cambridge.

Con el objetivo de ganar en resolución en este proyecto, y mientras se realiza este estudio cualitativo, se han realizado dos estudios adicionales en las muestras de plasma de los pacientes adictos a cocaína:

a) *Estudio de la expresión de citoquinas y quemoquinas en pacientes expuestos a cocaína.*

Las citoquinas y quemoquinas circulantes son proteínas señalizadoras y reguladoras de la función inmunológica. Se sabe hoy día que estas proteínas pueden tener un papel fundamental en los procesos de neuroinflamación y aprendizaje, así como verse alteradas en pacientes con trastornos psicopatológicos. Se ha realizado un análisis diferencial de la expresión de varias citoquinas y se ha hallado que la expresión plasmática de ellas está relacionada con la severidad de la dependencia. A continuación se muestran los análisis iniciales de los candidatos en relación con la severidad de la dependencia. Los niveles circulantes de fractalquina, interlequina 6, SDF1 e interlequina 1b correlacionan claramente con la presencia de niveles altos de dependencia, mientras que los niveles de las TNFalpha o BDNF no muestran esta correlación.

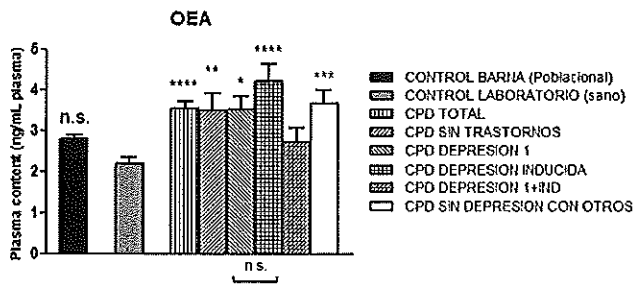


Estos estudios se están analizando para su publicación próxima.

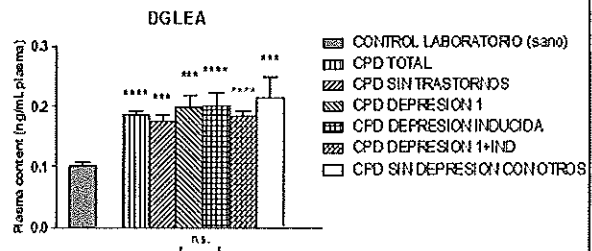
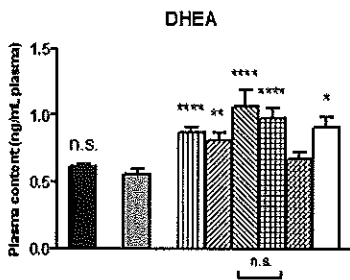
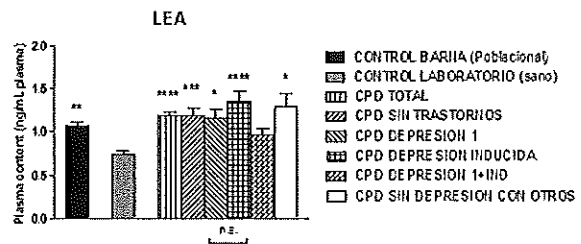
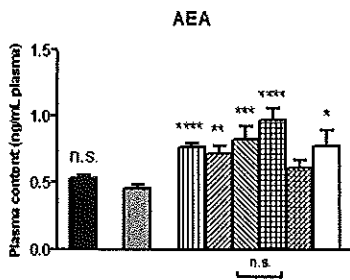


b) Estudio de los niveles de aciletanolamidas y endocannabinoides en los pacientes adictos a cocaína.

Estos estudios se basan en los hallazgos en modelos animales que se han publicado (Ver Bilbao et al., *Addiction Biology*; Rivera et al, *Int J Neuropsychopharmacology* y Luque-Rojas et al., *Int J Neuropsychopharmacology*) y en los que se demostró que la expresión y la función de proteínas responsables de la formación y degradación de estos lípidos bioactivos variaba en función de la exposición a cocaína, el desarrollo de dependencia y el genotipo del animal. Se ha podido comprobar que algunos de estos lípidos bioactivos, como la anandamida y la OEA están incrementados en los pacientes que han consumido cocaína, especialmente en las primeras fases del proceso, cuando no tienen un nivel de severidad (numero de criterios de dependencia) elevado. Este efecto no era dependiente de la edad, de la psicopatología asociada afectiva (Ansiedad o depresión), del sexo ni del consumo de alcohol, aunque los niveles de estos endocannabinoides si variaban con la presencia de consumo de cannabis. En las siguientes figura se pone como ejemplo los resultados preliminares para la oleiletanolamida y la anandamida.



POLYUNSATURATED



Niveles de anandamida y sus congéneres en pacientes adictos a cocaína.



OBJETIVO 5

Este objetivo se planteo para ser realizado una vez terminado el estudio diferencial entre ambos fenotipos y ambas especies. Dado que el análisis de los casos de proteómica en humanos está en marcha, es de esperar que se pueda hacer el estudio comparativo en las muestras de estos pacientes a lo largo del próximo año, estudio que se comunicará oportunamente al Plan Nacional Sobre Drogas.

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

El principal objetivo de este proyecto es el desarrollo de biomarcadores de adicción a cocaína. Aunque el análisis de los plasmas de los pacientes reclutados es muy laborioso y tardará en dar sus resultados definitivos, si se han podido hallar dos conjuntos de biomarcadores de interés para futuras validaciones clínicas. EL hallazgo de los cambios en anandamida y oleiletanolamida en los pacientes con historial de consumo a cocaína podría servir para determinar la exposición a la misma y la presencia de cambios adaptativos asociados a su consumo que son independientes de la psicopatología. Los cambios en citoquinas y chemoquinas identificados abren una nueva vía de investigación sobre el importante papel de la neuroinflamación en las enfermedades mentales, y en especial en la adicción. Será necesario identificar si estos mediadores proteicos del sistema inmunológico son capaces de modificar, agravando o atenuando, las acciones de las drogas de abuso, mediante estudios en modelos animales. De ser así, podríamos encontrarnos ante una vía terapéutica inesperada.

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

OTRAS SUBVENCIONES O AYUDAS RECIBIDAS PARA ESTE PROYECTO: origen, cantidad, en qué se aplica

No se han conseguido las financiaciones solicitadas en 2010 a la Mutua Madrileña y a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, por lo que este proyecto se financia en su totalidad con la presente subvención del Plan Nacional Sobre Drogas.

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR Ninguna.

En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección pndinvestigación@msps la presente memoria.

En Málaga a 13 de Septiembre de 2012

FIRMA

Fernando Rodriguez de Fonseca