

## AYUDAS ECONÓMICAS PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN SOBRE DROGODEPENDENCIAS EN EL AÑO 2016.

**INVESTIGADOR PRINCIPAL: EMILIO AMBROSIO FLORES**

**Número de expediente: 2016I073**

**Entidad: UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA**

**Tipo de investigación: BÁSICA**

**Nombre del proyecto: Estudio metabólico del consumo conjunto de alcohol y cocaína.**

**Número de anualidades: 3**

**1ª anualidad: 55.000€**

**2ª anualidad: 14.000€**

**3ª anualidad: 15.000€**

**Total concedido: 84.000€**

### RESUMEN DEL PROYECTO

Cerca del 97% de las personas que consumen cocaína también consumen alcohol y se sabe que la presencia conjunta de ambas drogas en el organismo puede acarrear consecuencias adversas para los usuarios, ya que es conocido que, en presencia de alcohol, el metabolismo de la cocaína se hace de un modo diferente al que ocurriría si no estuviera presente el alcohol, apareciendo un nuevo metabolito, el cocaetileno, que tiene toxicidad hepática además de estar relacionado con la producción de convulsiones, un mayor riesgo de muerte súbita y de suicidios que el del consumo de solamente cocaína, así como con una inducción en la persona de un menor control del consumo de ambas drogas. En humanos, el cocaetileno intensifica los efectos eufóricos de la cocaína y, en modelos animales, tiene propiedades reforzantes positivas similares a las de la cocaína, como refleja el hecho de que se lo autoadministran las ratas de laboratorio. Aparte de los trabajos hechos sobre la toxicidad del cocaetileno, en cuanto metabolito de la presencia conjunta de alcohol y cocaína, hay muy pocos estudios sobre otros posibles metabolitos derivados del consumo conjunto de esas dos drogas, y, menos aún, que conozcamos, en una de las etapas del desarrollo más importantes en la drogadicción, como es el caso de la juventud. Nosotros consideramos que ese tipo de investigaciones son necesarias porque se sabe que un desequilibrio metabólico puede afectar al desarrollo cerebral en aquellos periodos en los que aún falta una adecuada maduración estructural y funcional del Sistema Nervioso Central (SNC). Ello puede repercutir en la aparición de alteraciones en el SNC que pudieran participar en la adicción a drogas, igual que ha sido documentado que pueden influir en la aparición de diferentes trastornos psiquiátricos como, por ejemplo, el autismo y el déficit de atención con hiperactividad. Por ello, en el presente proyecto, que es continuación de otro inmediatamente anterior financiado por el Plan Nacional sobre Drogas, queremos seguir profundizando en las posibles alteraciones metabólicas inducidas por el consumo conjunto de cocaína y alcohol. A este fin, obtendremos las muestras biológicas a analizar (plasma sanguíneo y tejido de estructuras neuroanatómicas importantes en el sistema de reforzamiento cerebral) de ratas jóvenes (de 51 a 72 días de edad, equivalente a la etapa de 21-24 años en seres humanos (Spear, 2000)), de ambos sexos, que se autoadministrarán conjunta e intravenosamente alcohol y cocaína. Dichas muestras serán analizadas mediante varias estrategias metabólicas complementarias para conseguir un conocimiento del metaboloma lo más completo posible. Así, emplearemos una multiplataforma de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (MS) en el caso de las regiones cerebrales y de sistemas de Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas (LC-MS) con analizadores de ultra-alta resolución con FTICR (Resonancia de ion ciclotrón por transformada de Fourier) en el caso del plasma. Adicionalmente, empleando la metodología de electroforesis capilar con detección mediante fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) y ultravioleta (CE-UV/VIS) estudiaremos las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos glicina, L-alanina, L-glutamina, L-glutamato, L-isoleucina, L-leucina, L-ornitina, L-prolina, L-serina, L-treonina, taurina, L-tirosina, L-fenilalanina, triptófano L-Valina, creatinina, L-cisteína y L-arginina.

Pretendemos identificar con esas estrategias el mayor número posible de potenciales nuevos biomarcadores que nos permitan llegar a una mejor comprensión de los efectos psicobiológicos de la autoadministración conjunta de cocaína y alcohol. Dado que está reconocido que el mejor modelo animal de drogadicción es el de la autoadministración y el de mayor validez ecológica, pensamos que nuestros posibles hallazgos con animales de laboratorio pueden tener un gran valor traslacional en lo relativo a lo que podría ocurrir en personas jóvenes.

## **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

### **Objetivo general:**

El objetivo esencial del presente proyecto es estudiar el efecto que la autoadministración conjunta de alcohol y cocaína pueda tener sobre los metabolitos de dos sistemas importantes en el organismo, el plasma sanguíneo y el cerebro.

Gracias a la experiencia ganada durante la realización del proyecto anterior, consideramos que seremos capaces de cumplir ese objetivo central, ya que conocemos bien los procedimientos adecuados para llevarlo a cabo. Así, podemos afirmar que no hay dificultades técnicas con la autoadministración conjunta intravenosa y crónica de 1 mg/kg de cocaína más 2 g/kg de etanol durante tres semanas en ratas de laboratorio. Hemos comprobado que los animales se autoadministran esas dosis sin problemas aparentes. Nos interesaba que los sujetos fueran adolescentes y/o jóvenes, por lo que durante el proyecto anterior cambiamos el modo de sujetar el dispositivo que lleva el catéter intravenoso, que antes lo teníamos sobre el cráneo, a implantarlo en la espalda del animal. Eso evitó que tuviéramos una pérdida experimental considerable porque en los animales jóvenes los huesos del cráneo no tienen aún la suficiente consistencia y el dispositivo se desprendía. Comprobamos también que a la edad de 51-72 días postnatales en la rata podían hacerse este tipo de estudios sin dificultades y no tanto a una edad más temprana (28-49 días postnatales), considerada equivalente a la adolescencia en la especie humana. En nuestra opinión, la edad elegida para los animales (51-72 días postnatales) es la adecuada, porque en la edad equivalente en humanos (21-24 años) ya se dan consumos conjuntos de alcohol y cocaína con mayor frecuencia.

A diferencia del proyecto anterior, en el presente la exposición a ambas drogas en los animales no va a hacerse mediante administración pasiva (aunque los animales estaban en cajas de condicionamiento operante, recibían la droga pasivamente a través del catéter), ya que es lógico que en un primer abordaje se trate de comprobar si las dosis elegidas no tienen efectos tóxicos claramente observables, si esos jóvenes animales son capaces de soportar todo lo que conlleva el procedimiento de administración intravenosa, etc., pero una vez superadas esas dificultades técnicas, el modelo de elección es el de la autoadministración intravenosa de ambas drogas, por la enorme importancia que tiene el hecho de que el sujeto pueda regular a voluntad su conducta de ingesta. Como sabemos, está bien demostrado en la literatura científica por diversos grupos, incluido el nuestro, que el comportamiento de autoadministración de drogas induce cambios neurobiológicos que no se dan cuando la administración es pasiva (Miguéns et al., 2008). Es posible que nuestros hallazgos sobre los metabolitos que hemos descrito en el proyecto anterior cuando los animales recibían el alcohol y la cocaína conjuntamente de forma pasiva, no sean iguales a los que se encuentren cuando se autoadministran ambas drogas. Creemos, además, que éste será, que conozcamos, el primer estudio en el que se combinen la metodología de la autoadministración intravenosa de drogas y la de las diversas estrategias metabolómicas. Por otro lado, hay que tener en cuenta que las personas no toman pasivamente el alcohol o la cocaína, si no que se autoadministran voluntariamente esas drogas. Por ello, si se dispone de la técnica de autoadministración, es la que debe emplearse por el mayor potencial traslacional que va a proporcionar. Pueden, lógicamente, hacerse aproximaciones con administración pasiva, como hemos hecho nosotros, bien para ajustar la dosis a autoadministrarse, bien para comprobar posibles toxicidades, etc., pero una vez definidas las variables a estudiar, la metodología de la autoadministración es la que proporciona la información más relevante desde el punto psicobiológico. De

ahí que nuestros grupos experimentales en este proyecto sean solamente de autoadministración, uno de alcohol y cocaína y otro de suero salino (como grupo control). Emplearemos también animales de ambos sexos porque es recomendación de la comunidad científica hacerlo así, ya que es sabido que muchos tratamientos no funcionan de igual modo en mujeres que en hombres y porque se ha descrito en humanos que eran cocainómanos y se mantienen abstinentes que existen diferencias entre sexos en varios biomarcadores plasmáticos de adicción a la cocaína (Pedraz et al., 2015).

En este nuevo proyecto queremos incorporar también no sólo muestras del plasma, sino de tres regiones cerebrales de interés, como son la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo, por ser áreas neuroanatómicas relevantes en el sistema de reforzamiento cerebral y por su mayor tamaño, dado que las diversas estrategias metabólicas dirigidas y no dirigidas que vamos a aplicar exigen una cantidad mínima de miligramos por región cerebral. Esas estrategias, que son complementarias y muy avanzadas técnicamente, van encaminadas a identificar el mayor número posible de metabolitos. Introducimos, pues, en este nuevo proyecto nuevos planteamientos metabólicos, además de una nueva matriz biológica, el tejido cerebral.

Vamos a continuar tratando de detectar y cuantificar nuevos aminoácidos en el plasma de los animales mediante CE-LIF y particular los de la L-tirosina, la L-fenilalanina y el triptófano (que son aromáticos), de interés especial por ser los precursores de neurotransmisores monoaminérgicos, y otros como los de L-Valina, creatinina, L-cisteína, L-arginina. Nos interesa, además, comparar la relación entre las concentraciones de aminoácidos de cadena ramificada (Valina, Isoleucina y Leucina) y los tres aromáticos citados porque pueden competir por los sistemas de transporte utilizados para el paso de la barrera hematoencefálica. A este respecto, se sabe que algunos de esos sistemas de transporte se comparten entre los aminoácidos largos neutros (LNAAs, large neutral amino acids; en la nomenclatura en inglés). De estos se distinguen dos principales grupos: los de cadena ramificada (BCAAs, branched-chain amino acids) y los de tipo aromático (ArAAs, aromatic amino acids). Como representantes de los de cadena ramificada destacan la valina, la isoleucina y la leucina y, entre los aromáticos, la fenilalanina, la tirosina y el triptófano. Por otro lado, como sabemos, esos tres aminoácidos aromáticos son esenciales para la síntesis de la serotonina y en la ruta metabólica de las catecolaminas. La fenilalanina es un aminoácido que se transforma en tirosina a través de la fenilalanina hidroxilasa. La tirosina sintetizada por esta vía, junto con la procedente de los alimentos, compete con aminoácidos largos neutros como la valina, la isoleucina y la leucina por los mecanismos de transporte en la barrera hematoencefálica. De esta manera, la síntesis de dopamina y noradrenalina se ven limitadas por la disponibilidad de tirosina, que depende de la competencia por los mecanismos de transporte necesarios para el paso de la tirosina. Se sabe también que un proceso similar ocurre con el triptófano, precursor de la serotonina (Wurtman et al., 1981).

Finalmente, quisiéramos también estudiar si la presencia conjunta de alcohol y cocaína afecta a la integridad de la barrera hematoencefálica, dado lo que acabamos de comentar. Este estudio sería llevado a cabo por el becario y miembro del equipo investigador de este proyecto, D. Javier Orihuel Menéndez, durante su estancia en el laboratorio del Dr. Syed Ali, del National Center for Toxicological Research/USFDA, en Jefferson, Arkansas, EE.UU, al que se desplazaría en el caso de que nos fuera concedida la solicitud del presente proyecto. El Dr. Ali es un experto en estudios de toxicidad en cultivos celulares y está ahora mismo estudiando cambios en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica inducidos por drogas de abuso, particularmente psicoestimulantes derivados de las anfetaminas. Para nosotros, además, la formación de un miembro del equipo en estudios con cultivos celulares nos proporciona una herramienta adicional de gran utilidad porque nos permitiría aproximaciones in vitro, de relativa rapidez, con muestras de células nerviosas que serían susceptibles de ser analizadas con planteamientos metabólicos dirigidos y no dirigidos.

### Objetivos específicos:

En consecuencia, para poder cumplir adecuadamente el objetivo general antes expuesto, nos proponemos llevar a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Investigar en ratas machos y hembras jóvenes, en el período postnatal del día 51 al 72, el efecto de la autoadministración conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre el metaboloma de tres regiones cerebrales diferentes (corteza prefrontal, cuerpo estriado e hipocampo) y compararlo con el que tendrían animales similares que se autoadministraran suero salino.
2. Analizar en esas tres regiones cerebrales en ratas machos y hembras jóvenes, en el período postnatal del día 51 al 72, el efecto de la autoadministración conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre las concentraciones de una serie de posibles biomarcadores descubiertos en el punto 1 y compararlos con los que tendrían animales similares que se autoadministraran suero salino.
3. Investigar en ratas machos y hembras jóvenes, en el período postnatal del día 51 al 72, el efecto de la autoadministración conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre el metaboloma de su plasma y compararlo con el que tendrían animales similares que se autoadministraran suero salino.
4. Analizar en los plasmas de ratas machos y hembras en el período postnatal del día 51 al 72, el efecto de la autoadministración conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre las concentraciones de una serie de posibles biomarcadores descubiertos en el punto 3 y compararlos con los que tendrían animales similares que se autoadministraran suero salino.
5. Estudiar en ratas machos y hembras jóvenes, en el período postnatal del día 51 al 72, el efecto de la autoadministración conjunta e intravenosa de alcohol y cocaína sobre las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos L-glutamato, glicina, taurina, L-serina, L-alanina, L-leucina, L-isoleucina, L-glutamina, L-treonina, L-prolina y L-ornitina (que han sido identificados por nosotros en estudios previos de administración pasiva), así como la L-tirosina, la L-fenilalanina y el triptófano (de interés especial por ser los precursores de neurotransmisores monoaminérgicos) y los de L-Valina, creatinina, L-cisteína, L-arginina.
6. Comparar, en las condiciones experimentales del punto anterior, la relación entre las concentraciones de aminoácidos de cadena ramificada (Valina, Isoleucina, Leucina) y las de aromáticos (Triptófano, Tirosina y Fenilalanina).
7. Investigar si la presencia conjunta de alcohol y cocaína afecta a la integridad de la barrera hematoencefálica mediante cultivos celulares de células nerviosas. Este estudio sería llevado a cabo por el becario y miembro del equipo investigador de este proyecto, D. Javier Orihuel Menéndez, durante su estancia en el laboratorio del Dr. Syed Ali, del National Center for Toxicological Research/USFDA, en Jefferson, Arkansas, EE.UU, al que se desplazaría en el caso de que nos fuera concedida la solicitud del presente proyecto.

### HIPÓTESIS

Por datos previos obtenidos por nuestro grupo consideramos que la autoadministración de alcohol y cocaína conjuntamente va a alterar el metaboloma de los animales tanto en las regiones cerebrales como en el plasma sanguíneo. Los cambios que se observen en los metabolitos van a ser distintos en machos y en hembras e, incluso, puede que diferentes a los que hemos observado en trabajos previos con administración pasiva de ambas drogas conjuntamente.

Pensamos también que las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos que estudiaremos con la metodología de CE-LIF van a ser diferentes y que se van a producir alteraciones en las relaciones entre aminoácidos de cadena ramificada y los aromáticos. Por último, en el caso de que se pudiera estudiar la integridad de la barrera hematoencefálica en cultivos celulares hipotetizamos que también a verse afectada por la presencia conjunta de alcohol y cocaína en el medio de cultivo.