



## ANEXO IV

### JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

#### MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

FINAL X

**Número Expediente:** 2010I037

**Investigador Principal:** Consuelo Guerri Sirera

**Otros Investigadores:** María Pascual Mora, Sara Fernández Lizarbe, Silvia Alfonso Loeches, Juan Ureña Peralta

**Título Proyecto o subproyecto:** *Papel de la activación del sistema innato inmunitario y de la glía en el daño cerebral inducido por el consumo de alcohol.*

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

**Organismo:** Fundación CV Centro de Investigación Príncipe Felipe

**Centro:** Centro de Investigación Príncipe Felipe

**Departamento:** Patología Celular

**Comunidad Autónoma:** Comunidad Valenciana

**Duración:** 3 años

**Fecha de inicio:** Diciembre 2010

**Fecha de finalización:** Diciembre 2013

**Año Convocatoria:** 2010

**Área Temática:** Valoración del daño cerebral producido por el consumo de alcohol

**Palabras Clave:** Alcohol, daño cerebral, sistema inmunitario, adolescencia



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

Evidencias recientes demuestran el papel de las células gliales y de la respuesta innata inmune, en procesos de neuroinflamación, daño cerebral y neurodegeneración. Estas evidencias también indican la participación del sistema inmune en cerebro y de los receptores TLRs (Toll-like), principales receptores que participan en la respuesta inmune, en las enfermedades neurodegenerativas. Nuestros resultados recientes, tanto en animales adolescentes con dosis intermitentes de alcohol como en adultos con un consumo crónico, demuestran que el alcohol causa muerte neural y ésta se asocia con un aumento de mediadores inflamatorios, como citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y otros compuestos como iNOS y COX-2, en ciertas regiones cerebrales. Hemos sido los primeros en demostrar que el mecanismo molecular de la neuroinflamación tiene lugar mediante una activación de los receptores TLR4 y los IL-1RI en las células gliales.

Pretendemos abordar la **hipótesis** de que el etanol, a través de su interacción con ciertos microdominios lipídicos de la membrana (*lipid rafts*) recluta y activa a varios TLRs (TLR4, TLR2) en las células gliales promoviendo su señalización y síntesis de mediadores inflamatorios que conllevan a muerte neural, daño en la estructura de la mielina (como se observa en alcohólicos) y alteraciones cognitivas y conductuales en el alcohólico y en el adolescente.

**Sujetos de estudio:** Ratones C57 BL/6 machos (adultos 2 meses y adolescentes 30.45 días) y hembras, crías para los cultivos primarios de astrocitos y microglia. Ratones deficientes en los receptores TLR4<sup>-/-</sup> (KO) y TLR2<sup>-/-</sup> KO.

**Tratamientos con etanol:** **ratones** adultos (2 meses de edad) en los que se administra 10% de alcohol en el agua de bebida durante 5 meses, administración crónica. Intoxicación aguda en adolescentes: 5gr/kg (ip) de forma intermitente con intervalos de 2 días de descanso. Total 8 dosis,

### Objetivos alcanzados

**1- Analizar las interacciones entre el etanol con los receptores TLR4 y/o TLR2 en células de microglia y de astroglia en cultivo.**

Objetivo alcanzado, finalizado y los resultados publicados

*Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J y Guerri C, Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering inflammatory response in microglial cells. [J.Neurochem 126:261-273, 2013](#)*

**2- Evaluar si la eliminación de los receptores TLR4 en ratones (TLR4<sup>-/-</sup>) previene en parte los efectos neurotóxicos del etanol. Se utilizarán ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>, y éstos se tratarán con consumo crónico de alcohol.**

Objetivo alcanzado y publicado los resultados,

*Alfonso-Loeches et al, Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse [GLIA 60:948-964, 2012](#)*



**3- Evaluar los posibles cambios en las proteínas de la mielina y en su composición tras el consumo crónico y agudo de alcohol.**

Objetivo alcanzado y publicado los resultados

Alfonso-Loeches et al, Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse *GLIA* 60:948-964, 2012.

**4- Estudiar si el consumo de alcohol durante la adolescencia induce cambios epigenéticos que puedan subyacer tanto a las alteraciones cognitivas como las conductuales, como son la mayor predisposición al abuso de alcohol en la fase adulta** (Objetivo finalizado y publicado los resultados):

Pascual M, Baliño P, Alfonso-Loeches S, Aragón C, Guerri C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain, Behavior, and Immunity* 25 80–91, 2011

Silvia Alfonso-Loeches and Consuelo Guerri Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48(1): 19–47, 2011

(Se adjuntarán tres separatas de cada uno de ellos)

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

No ha habido modificaciones en el plan de trabajo

**OBJETIVOS PLANTEADOS** :(Transcribir los del proyecto original)

**1-** Analizar las interacciones entre el etanol con los receptores TLR4 y/o TLR2 en células de microglia y de astroglia en cultivo. En este objetivo se estudiará si el etanol es capaz de reclutar a TLR4 o TLR2 en astrocitos o microglia en cultivo primario, potenciando su respuesta inmune. Dicha respuesta se evaluará en células gliales procedentes de animales controles o carentes en los receptores TLR4 o TLR2 o en células en donde se silencie a estos receptores mediante el uso de siRNA.

**2-** Evaluar si la eliminación de los receptores TLR4 en ratones (TLR4<sup>-/-</sup>) previene en parte los efectos neurotóxicos del etanol. Se utilizarán ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>, y éstos se tratarán con dosis agudas intermitentes o consumo crónico de alcohol



3- Puesto que en alcohólicos se observa una disminución de sustancia blanca, sugiriendo alteraciones en la estructura de la mielina, pretendemos evaluar posibles cambios en la expresión de proteínas asociadas a la mielina, como la MBP (proteína básica de la mielina), la MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein, y la CNPasa (2-3 cyclin nucleotide phosphohidrolasa) y de su estructura, utilizando inmunohistoquímica y microscopia electrónica, en ratones con un consumo crónico o agudo de alcohol. Para analizar si las alteraciones en la mielina se asocian con la respuesta de los TLRs, este objetivo se realizará en ratones normales y deficientes en TLR4, con dosis agudas y tras un consumo crónico de alcohol.

4- Estudiar si el consumo de alcohol durante la adolescencia induce cambios epigenéticos que puedan subyacer tanto a las alteraciones cognitivas como las conductuales, como son la mayor predisposición al abuso de alcohol en la fase adulta. Se analizarán los cambios en la acetilación de histonas en promotores de genes relacionados con adicción. Estos estudios se realizarán en corteza prefrontal de animales adolescentes y adultos con administraciones de alcohol de forma intermitente

**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).

**Objetivo-1- Analizar las interacciones entre el etanol con los receptores TLR4 y/o TLR2 en células de microglia y de astroglia en cultivo.**

Los resultados demuestran que en tanto en astrocitos como en microglia en cultivo, el alcohol es capaz de activar tanto los receptores TLR4 como los TLR2, incluso potenciar su acción cuando actúan los dos receptores. El mecanismo de activación es a través de la interacción del etanol con los microdominios de membrana "lípid rafts" (LR) o balsas lipídicas. Mediante estudios de inmunoprecipitación y microscopia confocal observamos que el alcohol agrega a estos dos receptores y tras su estimulación etanol se produce una co-localización de los TLR4 y TLR2 en los LR caveolae en la membrana.

- Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J y Guerri C. ETHANOL INDUCES TLR4/TLR2 ASSOCIATION TRIGGERING AN INFLAMMATORY RESPONSE IN MICROGLIAL CELLS. *J.Neurochem* 126:261-273, 2013

**Objetivo 2. Evaluar si la eliminación de los receptores TLR4 en ratones (TLR4<sup>-/-</sup>) previene en parte los efectos neurotóxicos del etanol.**

Demostramos que la muerte neuronal, la neuroinflamación y la activación de los receptores TLR4 inducidos por el consumo de alcohol, se producen especialmente en los ratones silvestres y no observamos cambios evidentes en ratones TLR4 con consumos de alcohol, sugiriendo que estos receptores son una diana importante a los efectos del etanol en el cerebro. Los cambios en neuroinflamación se relacionan con cambios en la conducta como la ansiedad asociada al consumo de alcohol. Las



alteraciones conductuales no se observan en ratones TLR4-Kp con consumo de alcohol, lo que nuevamente indica que la activación de estos receptores median tanto el daño cerebral como las alteraciones conductuales con el consumo de alcohol.

Además, hemos observamos que las alteraciones en el daño cerebral que causa el consumo de alcohol es más significativo en hembras que en machos, lo que confirma los trabajos en humanos que demuestran que aunque el daño cerebral que causa el alcohol es el mismo en hombres y en mujeres, el periodo de consumo en estas últimas es más corto que en hombres.

-*Silvia Alfonso-Loeches and Consuelo Guerri* Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48(1): 19–47, 2011

-*Pascual M, Baliño P, Alfonso-Loeches S, Aragón C, Guerri C.* Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain, Behavior, and Immunity* 25 80–91, 2011

- *Alfonso-Loeches et al.,* Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology* 311:27-34, 2013

**Objetivo-3- Puesto que en alcohólicos se observa una disminución de sustancia blanca, sugiriendo alteraciones en la estructura de la mielina, pretendemos evaluar posibles cambios en la expresión de proteínas asociadas a la mielina.** Hemos analizado los efectos del etanol y alteraciones en mielina, tanto a nivel bioquímico como morfológico y de microscopia electrónica.

Utilizando inmunohistoquímica e inmunotransferencia nuestros resultados demuestran que el tratamiento crónico de etanol reduce significativamente varias proteínas que participan en el proceso de mielinización, en varias áreas cerebrales de los ratones WT tratados con alcohol. Específicamente, analizamos las siguientes proteínas: la proteína proteolípida (PLP), proteína básica de la mielina (MBP), glicoproteína asociada a la mielina (MAG), glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG), la 2'-3'-nucleótido cíclico fosfohidrolasa (CNPasa) y el proteoglicano condroitín sulfato (NG2).. Demostramos que esta reducción en genes y proteínas asociadas de la mielina se reduce significativamente en corteza cerebral, (CTX), hipocampo y cuerpo calloso de ratones WT tratados con alcohol durante 5 meses. Gran parte de estos cambios no se observan en regiones cerebrales de ratones TLR4-KO. Un dato interesante, fue que el tratamiento con alcohol incrementó significativamente los niveles de NG2, proteoglicano que es expresado por las células precursoras de oligodendrocitos, en el CTX y el hipocampo de los ratones WT y en la CTX de los ratones TLR4-KO. Puestos que las células precursoras de oligodendrocitos expresan NG2 {Kang, 2010 #115; Nishiyama, 2009 #360} y suelen presentar cambios importantes en respuesta a un daño o proceso desmielinizante, nuestros resultados sugieren que una sobreexpresión de NG2, podría ser un mecanismo compensatorio como respuesta al daño cerebral y desmielinización que induce el alcohol. De hecho el consumo crónico de alcohol induce la muerte de los oligodendrocitos y aumenta las células NG2. El abuso de alcohol también altera la morfología de la mielina, reduce el número de fibras mielínicas y causa muerte neuronal

Estudios mediante microscopia electrónica mostraron incrementos significativos en el daño total de las fibras de mielina en CC y CTX de ratones WT tratados con etanol.



Sin embargo, en los ratones TLR4-KO tratados con etanol, sólo el 6.6 % y 5.7% del total de las fibras de mielina de CTX y CC respectivamente, mostraron ciertas alteraciones. Estos resultados sugieren que la deficiencia en el receptor TLR4 confiere cierta neuroprotección ya que se observa daño focal, ante los efectos deletéreos del etanol

Para confirmar el papel de TLR4 en los procesos de neuroinflamatorios inducidos por el alcohol así como evaluar la pérdida de mielina y alteraciones neuronal, etc., se utilizó un sistema de imagen *in vivo* llamado IVIs 200. Este sistema óptico de imagen avanzado permite captar imágenes bidimensionales e incluso tridimensionales con un marcaje específico para diferentes proteínas marcadoras de glía o neuronas. Además, esta técnica no invasiva, permite seguir un proceso en el mismo animal durante un tiempo determinado, que dependerá de la proteína de estudio y/o del tratamiento aplicado. Esta técnica, nos permitió emplear la tomografía fluorescente (FLIT) para obtener una reconstrucción tridimensional (3D) *in vivo*. La sonda específica confirmó que PLP sólo se detectaba en cerebro; y que se reduce con el consumo de alcohol. En resumen, las observaciones que se recogen de este estudio de imagen, confirmaron los resultados obtenidos a nivel bioquímico. Este sistema óptico de imagen avanzado nos permitió captar imágenes bidimensionales e incluso tridimensionales con un marcaje específico para diferentes proteínas marcadoras de glía o neuronas.

Adicionalmente, hemos demostrado, por primera vez, que el consumo de alcohol durante la adolescencia en ratas, causa alteraciones en el desarrollo de la mielina, lo que podría explicar los cambios cognitivos y conductuales

*-Alfonso-Loeches et al, Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. GLIA 60:948-964, 2012.*

*- Pascual M, Pla A, Miñarro J and Guerri C. Neuroimmune Activation and Myelin Changes in Adolescent Rats Exposed to High-Dose Alcohol and Associated Cognitive Dysfunction: A Review with Reference to Human Adolescent Drinking. Alcohol and Alcoholism, 1-6, 2013*

**Objetivo-4- Estudiar si el consumo de alcohol durante la adolescencia induce cambios epigenéticos que puedan subyacer tanto a las alteraciones cognitivas como las conductuales, como son la mayor predisposición al abuso de alcohol en la fase adulta.** Hemos demostrado que la administración intermitente de alcohol en animales adolescentes causan un aumento de la actividad histona acetil transferasa, en zona la prefrontal de animales adolescentes, dando lugar a un aumento en la acetilación de las histonas H3 y H4 así como una demetilación de la histona H3 en la región promotora de genes relacionados con la adicción, tales como cFos, Cdk5 and FosB. Estos hallazgos epigenéticos se relacionaron con un aumento de los efectos del alcohol en el condicionamiento de lugar. Además, la co-administración de butirato sódico (un inhibidor de la deacilasa) junto con el etanol, prologa la extinción del condicionamiento de lugar y la restauración de los efectos del etanol en los adolescentes. Estos resultados indican que el consumo de alcohol durante la adolescencia induce remodelación en la cromatina, modificando la acetilación y metilación de las histonas y los efectos del alcohol sobre el condicionamiento de lugar



Los resultados sugieren que fármacos que modifiquen la acetilación de histonas podrían ser efectivos para tratar o prevenir el mayor riesgo de adicción en jóvenes que inician su consumo en fases tempranas.

Nuestros resultados también demuestran que muchos de los cambios epigenéticos en animales adolescentes se asocian con alteraciones en el desarrollo de la mielina

*-Pascual et al. Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning Neuropharmacology 62:23-2318, 2012.*

*- Pascual M, Pla A, Miñarro J and Guerri C. Neuroimmune Activation and Myelin Changes in Adolescent Rats Exposed to High-Dose Alcohol and Associated Cognitive Dysfunction:A Review with Reference to Human Adolescent Drinking. Alcohol and Alcoholism, 1-6, 2013*

#### **ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN:**

**-Pascual M, Fernandez-Lizarbe M, Guerri C. Role of TLR4 in ethanol effects on innate and adaptive immune responses in peritoneal macrophages. *Immunol Cell Biol.* 89(6):716-727, 2011.**

**-Pascual M, Baliño P, Alfonso-Loeches S, Aragon CM, Guerri C. Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immunol.* 25:80-91, 2011**

**- Alfonso-Loeches S, Guerri C. Molecular and behavioural aspects of the action of alcohol on the adult and the developing brain. *Crit. Rev. Clin. Lab.* 48(1):19-47, 2011**

**- Alfonso-Loeches S, Pascual M, Gomez-Pinedo U, Pascual M and Guerri C, Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse *GLIA* 60:948-964, 2012**

**- Pascual M, Do Couto B, Alfonso-Loeches S, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M and Guerri C.Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning *Neuropharmacology* 62:23-2318, 2012.**

**--Alfonso-Loeches S, Pascual M and Guerri C. Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology* 311:27-34, 2013**

**--Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J y Guerri C, Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering inflammatory response in microglial cells. *J.Neurochem* 126:261-273, 2013**



- Guerri C and Pascual M. ***Role of toll-like receptors in alcohol-induced neuroinflammation and behavioural dysfunctions.*** In “**Neural-immune interactions in brain function and alcohol related disorders**” Ed NIAAA, Cui, Grandison and Noronha, (Springer) pp: 279-306, 2013.

-Pascual M, Pla A, Miñarro J and Guerri C. ***Neuroimmune Activation and Myelin Changes in Adolescent Rats Exposed to High-Dose Alcohol and Associated Cognitive Dysfunction:A Review with Reference to Human Adolescent Drinking.***  
***Alcohol and Alcoholism, 1-6, 2013***

## CONGRESOS

1- Invitada como ponente y participación en el comité científico del **Word Congress Congreso of Alcohol Research, Sapporo, Japon , 9-13 de Septiembre, 2012**

- **Simposio:** Is Alcoholism a Neuroimmune Disease?

Ponencia: CHANGES OF IMMUNE MOLECULES OF NEURAL CELLS BY ALCOHOL TREATMENT, **Consuelo Guerri**

-**Simposio : Epigenetics and alcoholism. What we have learned so far?**

Ponencia: (Objetivo 3)

CHANGES IN HISTONE ACETYLATION IN THE PREFRONTAL CORTEX OF ETHANOL-EXPOSED ADOLESCENT RATS CORRELATE WITH ETHANOL-INDUCED PLACE CONDITIONING, Pascual M. Do Cauro B, Alfonso-Loeches<sup>1</sup>; J. Miñarro<sup>2</sup> and C.Guerri

- Poster: (Objetivo 2 del proyecto)

ETHANOL INDUCES TLR4/TLR2 ASSOCIATION, TRIGGERING AND INFLAMMATORY RESPONSE IN MICROGLIAL CELLS

S. Fernández-Lizarbe, J. Montesinos, MJ Morillo and C. Guerri.

2- Invitada como ponente en el **Congreso Americano de la RSA** (Research Society of Alcohol), San Francisco, June 23-27, 2012.

Conferencia C.Guerri “TLR4 response participates in ethanol-induced neuroinflammation and brain damage” C.Guerri.

3- Participación en la **FENS (Federation of European Neurosciences Societies)**  
**Barcelona, Julio 14-18, 2012.**

### Comunicaciones:

- **TLR4 function in ethanol-induced demyelination process** Guerri<sup>1</sup>, S. Alfonso-Loeches<sup>1</sup>, M. Pascual-Mora<sup>1</sup>, U. Gómez-Pinedo, J. Ureña-Peralta<sup>1</sup>, M. Pascual Lucas<sup>1</sup>, M.J. Morillo<sup>1</sup>, J. Renau-Piqueras<sup>2</sup>



**- Critical role of NLRP3-INFLAMMASOME and TLR4 response in ethanol-induced neuroinflammation and damage** S. Alonso-Loeches S, Ureña-Peralta, MJ.Morillo, U. Gómez-Pinedo and C.Guerri

**4- Invitada y organizadora de un simposio en el Congreso ESBRA, Varsovia , Septiembre 8-12, 2013**

**Simposio 1:** Fetal Alcohol Spectrum Disorders: Strange Beginnings to Cutting Edge Research ( Chairs: Ed Riley and C.Guerri)

Ponencia: Ethanol alters human embryonic stem cells differentiation toward neural progenitors (NPs), alters cell fate and impairs NPs transformation into mature neural cells

**Simposio 2:** Persistent effects of Binge Drinking on Adolescent brain (Chair: C Guerri and A. Noronha, NIAAA)

Ponencia: Long-term cognitive dysfunctions in adolescent rats with binge drinking are associated with neuroimmune activation and myelin dysfunction.

**5- Conferencia Invitada de clausura en el Congreso LASBRA ( Lastinoamerican Society for biomedical research on Alcohol).** Concepción, Chile. Octubre 16-19, 2013

C.Guerri: Role of the neuroimmune system on Alcohol and drug addiction

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

Nuestros resultados indican el que la activación y respuesta de los receptores del sistema neuro-inmunitario, TLRs (TLR4 y TLR2) por la glia, con la consiguiente liberación de citocinas y compuestos inflamatorios desempeña un papel crucial tanto en el daño cerebral y alteraciones en la mielina que se observa en alcohólicos como en la disfunciones conductuales asociadas con el consumo de alcohol. Nuestros hallazgos sugieren, nuevos tratamientos para paliar los efectos del etanol en cerebro.

Los resultados del presente proyecto han sido innovadores a nivel internacional como lo demuestra la invitación a participar en un libro editado y dirigido por el NIAAA de USA sobre este tema.

Referente a la divulgación de los resultados, nuestro grupo ha impartido numerosos seminarios, noticias de prensa y charlas a estudiantes sobre las consecuencias del abuso de alcohol durante la adolescencia y su repercusión en el desarrollo cerebral.

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



MINISTERIO  
DE SANIDAD  
Y POLÍTICA SOCIAL

SECRETARIA GENERAL DE  
POLITICA SOCIAL

DELEGACION DEL GOBIERNO  
PARA EL PLAN NACIONAL  
SOBRE DROGAS

**OTRAS SUBVENCIONES O AYUDAS RECIBIDAS PARA ESTE PROYECTO:**

origen, cantidad, en qué se aplica

NINGUNA

**OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR**

**En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección [pndinvestigación@msps](mailto:pndinvestigación@msps) la presente memoria.**

**En ..Valencia ... a .10.. de .Enero.. de ..2014....**

FIRMA

Dra . Consuelo Guerri Sirera