



MINISTERIO  
DE SANIDAD

DELEGACIÓN DEL GOBIERNO PARA  
EL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE  
COORDINACIÓN DE PROGRAMAS

## RESUMEN FINAL PROYECTO INVESTIGACIÓN

**EXPEDIENTE: 2016I073**

**TÍTULO DEL PROYECTO: Estudio metabólico del consumo conjunto de alcohol y cocaína.**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL: Emilio Ambrosio Flores**

**EQUIPO DE INVESTIGACIÓN (nombre y apellidos del resto del equipo de investigación):**

**Antonio L. Crego Navazo**

**Alberto Marcos Bermejo**

**José Luis Luque García**

**Antonio Salgado Serrano**

**Alejandro Higuera Matas**

**Javier Orihuel Menéndez**

**Roberto Capellán Martín**

**Elena Sánchez López**

**Mónica R. Fernández Cabrera**

**ENTIDAD BENEFICIARIA Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN:**

**Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED)**

**Departamento de Psicobiología. Facultad de Psicología.**

---

### RESUMEN (1) (2):

Entre los usuarios de drogas de abuso, lo común es el policonsumo de dos o más de esas sustancias, siendo muy habitual que el alcohol sea una de ellas. Así, más del 90% de los consumidores de cocaína también toman alcohol. Se sabe que la presencia conjunta de estas dos drogas en el organismo induce diversos efectos psicológicos y fisiológicos, de entre los que destaca la generación de un metabolito particular, llamado cocaetileno, que no se forma si ambas drogas se consumen por separado. Ello parece ser debido a que, en presencia del alcohol, el metabolismo de la cocaína se hace de un modo diferente, además de aumentar la permanencia de la cocaína en el plasma sanguíneo. En comparación con los efectos de la cocaína sola, los que aparecen tras un policonsumo conjunto de esas dos drogas, relacionados con la formación de cocaetileno, son mayores indicadores de toxicidad hepática, de alteraciones en el sistema inmunitario, de producción de convulsiones y de

---



riesgo de muerte súbita y de suicidios, así como un menor control del consumo de ambas drogas. Aparte de los estudios hechos sobre el cocaetileno, en cuanto metabolito de la presencia conjunta de alcohol y cocaína, hay muy pocos trabajos 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. Este 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. Ello puede repercutir en la aparición de alteraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) que pudieran participar en la adicción a drogas, igual que se ha descrito para otros trastornos psicopatológicos. Por este motivo, con este proyecto de investigación básica y el empleo de animales de laboratorio, hemos querido seguir profundizando en los posibles cambios metabólicos inducidos por el policonsumo de cocaína y alcohol. A este fin, obtuvimos muestras biológicas (plasma sanguíneo y tejido de la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo, que son tres 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), de ambos sexos, que se autoadministraron conjunta e intravenosamente cocaína y alcohol. Esas muestras se analizaron mediante dos estrategias metabolómicas complementarias, no dirigida y dirigida, con el objetivo de tratar de identificar el mayor número posible de potenciales nuevos biomarcadores que resultaran del policonsumo de cocaína y alcohol. Para ello, empleamos plataformas instrumentales tales como: a) Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alta resolución con un equipo de 700 MHz; b) Cromatografía de Líquidos acoplada mediante Ionización por Electro spray a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (LC-ESI-HRMS); y c) Cromatografía de Gases acoplada mediante Ionización Electrónica a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (GC-EI-HRMS). Adicionalmente, utilizamos la metodología de electroforesis capilar con detección mediante fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) para estudiar las concentraciones plasmáticas de catorce aminoácidos. Los resultados obtenidos nos han permitido identificar tentativamente 170 compuestos significativos presentes en una u otra de las tres regiones cerebrales estudiadas. Igualmente, hemos identificado 111 compuestos significativos en el plasma de los animales. De ellos, el 25% también se habían encontrado en el cuerpo estriado, el 17% en la corteza prefrontal y el 12% en el hipocampo. Así mismo, encontramos que los niveles del aminoácido L-Tirosina se encontraban disminuidos en el plasma de los animales tras la autoadministración conjunta de cocaína y alcohol. Esos resultados sugieren que los cambios metabólicos que ocurren en el cerebro a consecuencia del policonsumo de cocaína y alcohol también pueden darse en el plasma sanguíneo, lo cual podría facilitar la traslación de este tipo de estudios metabolómicos hechos en animales a humanos, dada la posibilidad que se tiene en el ámbito sanitario de acceder a este fluido biológico. De todos los compuestos significativos identificados en nuestro estudio, ya conocemos que 59 de ellos participan en distintas vías metabólicas como son las de catecolaminas, purinas, pirimidinas, neuropéptidos, ácidos grasos y carboxílicos, lípidos, vitaminas, estrés oxidativo, metabolismo energético, sistemas endocannabinoide y colinérgico, al igual que en las de glutamato y glutamina, arginina, triptófano y de otros aminoácidos. En conjunto, todos estos datos, basados en estudios con animales empleando el mejor modelo animal que remeda la drogadicción humana (como es el procedimiento de la autoadministración intravenosa de drogas), así como en la aplicación de las metodologías metabolómicas más avanzadas, sugieren que en las personas el policonsumo de cocaína y alcohol puede igualmente producir alteraciones en diferentes vías metabólicas que se traduzcan, posteriormente, en efectos adversos para los usuarios de ambas drogas.

#### **ABSTRACT (English):**

Among the users of drugs of abuse, the common use is the poly-consumption of two or more of those substances and, very often, the alcohol is one of them. Thus, more than 90% of cocaine users also drink alcohol. It is known that the combined presence of these two drugs in the body induces various psychological and physiological effects, among which the generation of a particular metabolite, called cocaethylene, stands out, which does not form if both drugs are consumed separately. This seems to



be due to the fact that, in the presence of alcohol, the metabolism of cocaine is done in a different way, in addition to increasing the permanence of cocaine in the blood plasma. Compared to the effects of cocaine alone, those that appear after a poly-consumption of these two drugs, related to the formation of cocaethylene, are greater indicators of liver toxicity, alterations in the immune system, production of seizures and risk sudden death and suicide, as well as less control of the consumption of both drugs. Apart from the studies done on cocaethylene, as a metabolite of the poly-consumption of alcohol and cocaine, there are very few works on other possible metabolites derived from the combined consumption of these two drugs, and, even less, that we know, in one of the most important stages of development in drug addiction, such as youth. This type of research is necessary because it is known that a metabolic imbalance can affect brain development in those periods when adequate structural and functional maturation is still lacking. This may have repercussions in the appearance of Central Nervous System (CNS) alterations that could participate in drug addiction, just as it has been described for other psychopathological disorders. For this reason, with this basic research project and the use of laboratory animals, we have wanted to continue delving into the possible metabolic changes induced by the poly-use of cocaine and alcohol. To this end, we obtained biological samples (blood plasma and tissue from the prefrontal cortex, striatum, and hippocampus, which are three important neuroanatomical structures in the brain reward system) from young rats (51 to 72 days of age, equivalent at the stage of 21-24 years in humans) of both sexes, who self-administered a combination of cocaine and ethanol intravenously. Those samples were analyzed using two complementary metabolomic strategies, non-targeted and targeted, to try to identify as many potential new biomarkers as possible resulting from poly-consumption of cocaine and alcohol. For this, we use instrumental platforms such as: a) High Resolution Nuclear Magnetic Resonance (NMR) with a 700 MHz equipment; b) Liquid Chromatography coupled by Electrospray Ionization to High Resolution Mass Spectrometry (LC-ESI-HRMS); and c) Gas Chromatography coupled by Electron Ionization to High Resolution Mass Spectrometry (GC-EI-HRMS). Additionally, we used the capillary electrophoresis methodology with detection by laser-induced fluorescence (CE-LIF) to study the plasma concentrations of fourteen amino acids. The results obtained have allowed us to tentatively identify 170 significant compounds present in one or the other of the three brain regions studied. Likewise, we have identified 111 significant compounds in the plasma of animals. Of these, 25% had also been found in the striatum, 17% in the prefrontal cortex and 12% in the hippocampus. Similarly, we found that the levels of the amino acid L-Tyrosine were decreased in the plasma of the animals that self-administered the cocaine and ethanol combination. These results suggest that the metabolic changes that occur in the brain as a result of the poly-consumption of cocaine and alcohol may also occur in the blood plasma, which could facilitate the transfer of this type of metabolomic studies done in animals to humans, given the possibility that it has in the sanitary field to access this biological fluid. Of all the significant compounds identified in our study, we already know that 59 of them participate in different metabolic pathways such as catecholamines, purines, pyrimidines, neuropeptides, fatty and carboxylic acids, lipids, vitamins, oxidative stress, energy metabolism, endocannabinoid systems and cholinergic, as in those of glutamate and glutamine, arginine, tryptophan and other amino acids. Taken together, all these data, based on animal studies using the best animal model that mimics human drug addiction (such as the intravenous drug self-administration procedure) as well as the application of the most advanced metabolomic methodologies suggest that in human beings the poly-consumption of cocaine and alcohol can also produce alterations in different metabolic pathways that subsequently translate into adverse effects for the users of both drugs.

**PALABRAS CLAVE (3):**

**Autoadministración intravenosa de drogas, cocaína, alcohol, adolescencia, metabolómica, diferencias entre sexos.**

**KEY WORDS (English):**

**Intravenous drug self-administration, cocaine, alcohol, adolescence, metabolomics, sex differences.**



---

## JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO Y OBJETIVOS:

Como se ha adelantado ya en el apartado anterior, hay muy pocos trabajos sobre otros posibles metabolitos derivados del policonsumo de cocaína y alcohol y, aún menos, que nosotros sepamos, que se hayan realizado en sujetos jóvenes de ambos sexos, siendo muy conveniente estudiarlos en esa etapa del desarrollo porque es de las más importantes en la drogadicción. Adicionalmente, pensamos 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. 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, en el autismo y el déficit de atención con hiperactividad (TDAH), en los que se ha demostrado que se produce una disminución de los niveles de lisina (Zavala et al., 2001) y, además, en el caso del autismo, del glutamato (Shimmura et al., 2011).

Por esta razón, el objetivo general de nuestro proyecto ha sido el de investigar sobre los efectos que el consumo conjunto de alcohol y cocaína pueda tener en las personas, empleando el mejor modelo animal que remeda la drogadicción humana, el de la autoadministración de drogas, y metodologías metabólicas de última generación con el fin de aumentar nuestros conocimientos sobre los procesos psicobiológicos implicados en ese policonsumo, lo cual puede redundar en un mejor tratamiento farmacológico y psicosocial de los usuarios de esas dos drogas. Para poder cumplir adecuadamente este objetivo general, planteamos 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.
-



## **METODOLOGÍA Y DESARROLLO DEL PROYECTO. ANALISIS ESTADÍSTICO :**

### Metodología y desarrollo del proyecto:

Para la realización de este proyecto empleamos ratas machos y hembras jóvenes de la cepa Wistar desde el día postnatal 51 al postnatal 72, al inicio de los experimentos. Todos los animales fueron tratados de acuerdo con la Directiva Europea (86/609/EEC) sobre Bienestar animal. A cada animal se le implantó un catéter en la vena yugular izquierda. Tras siete días de recuperación post-operatoria, los sujetos del grupo de cocaína más alcohol conjuntamente y los de cocaína sola se expusieron a esas drogas en el modelo de la autoadministración intravenosa de drogas, mientras que los controles se expusieron a suero salino. De este modo, cuando los animales apretaron una palanca situada en un extremo de la caja de condicionamiento operante, se cerró un circuito que dio como resultado una inyección de una solución única conteniendo cocaína (1 mg/kg) y alcohol (2g/kg) disueltos en suero salino. Todo el proceso estuvo controlado por un ordenador. En esta situación experimental los animales se autoinyectaron libremente esas dos drogas conjuntamente hasta alcanzar patrones estables de consumo bajo un programa de reforzamiento de razón fija igual a 1 (RF1). El máximo número de autoinyecciones que permitimos fue de 15, a fin de que la cantidad total por día de cocaína más alcohol o de cocaína sola no llegara a producir efectos tóxicos. Estos experimentos de autoadministración se llevaron a cabo durante de tres semanas, en sesiones diarias de 2 horas de duración. Cuando algunos animales alcanzaron las 15 autoinyecciones antes de la finalización de las dos horas previstas de duración de la sesión, se cerró automáticamente el programa de reforzamiento y las cajas de autoadministración dejaron de estar operativas.

Las disoluciones de alcohol más cocaína y las de cocaína sola se prepararon diariamente y se calculó un volumen de administración diario de 1,5 a 2 ml/sesión para un sujeto de peso medio. El ajuste de la dosis se hizo según el peso del animal. El etanol que utilizamos fue Emprove® exp (Sigma Aldrich) con una pureza del 96%. La cocaína fue proporcionada por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

Tras la finalización de los experimentos (esto es, a los 21 días desde el inicio), a los dos días después de finalizar la última sesión de autoadministración de las drogas, se procedió al sacrificio de los animales para extraerles sangre troncal e, inmediatamente, obtener plasma centrifugando esas muestras. También, después de recoger la sangre troncal, se extrajeron los encéfalos para diseccionar de ellos la corteza prefrontal, el cuerpo estriado y el hipocampo, que se congelaron acto seguido y se guardaron a -80 °C, hasta ser estudiados con las diferentes estrategias metabolómicas que describiremos más adelante.

La cuantificación de los niveles plasmáticos de aminoácidos se llevó a cabo mediante la técnica de Cromatografía Electrocinética Micelar con Fluorescencia Inducida por láser, que es una variante de la Electroforesis Capilar. Para ello, utilizamos el equipo “Electrophoresis System Beckman, Laser Module” PA800 junto con un láser de 488nm Argón-ion laser (Beckman-Fullerton CA, USA). Empleamos patrones y reactivos químicos de grado analítico para identificar los catorce aminoácidos de interés, citados anteriormente en los Objetivos 5 y 6. Las muestras y los patrones fueron diluidas 1:20 con la disolución tampón del medio de separación y después se inyectaron hidrodinámicamente en el capilar durante 5 segundos. Como agente derivatizante de los aminoácidos para su separación quiral y con propiedades fluorescentes (fluoróforo) usamos FITC con una concentración de 1 mM en acetona. Las condiciones de análisis de partida fueron: tampón borato (pH 10.2) con 70 mM SDS, 5 % metanol, 17.5 mM HP-CD y 5 mM DM-CD; 23.5 kV y 25 °C de temperatura del capilar. Posteriormente, mediante el software de Beckman Coulter KARAT 32, cuantificamos el área-corregida del pico de cada analito aplicándole la recta de calibrado correspondiente.

Por su parte, las dos estrategias metabolómicas (no dirigida y dirigida) se llevaron a cabo con las siguientes plataformas instrumentales: a) Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alta resolución con un equipo de 700 MHz; b) Cromatografía de Líquidos acoplada mediante Ionización por Electrospray a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (LC-ESI-HRMS); y c) Cromatografía de



Gases acoplada mediante Ionización Electrónica a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (GC-EI-HRMS). Previamente a la aplicación de esas estrategias a las muestras cerebrales (de corteza prefrontal, cuerpo estriado e hipocampo), se realizaron varias pruebas analíticas destinadas a encontrar el mejor método de preparación de esas muestras antes de ser inyectadas en los equipos citados. De esas pruebas, concluimos que teníamos que utilizar dos procedimientos de preparación de las muestras, una que tuviera como disolvente 50/50 acetonitrilo/agua en el caso las plataformas de LC-ESI-HRMS y RMN y, otra, que tuviera 50/50 metanol/agua en el caso de las plataformas de LC-ESI-HRMS y GC-EI-HRMS. Esos dos procedimientos se estudiaron, en primer lugar, en el hipocampo por ser una región cerebral que está presente subcorticalmente en los dos hemisferios cerebrales y, por eso, son dos componentes separados y de un tamaño suficientemente grande, cada uno de ellos, que les hace susceptibles de ser empleados en estas aproximaciones previas para establecer las mejores condiciones experimentales que se mantendrían después. En base a los resultados que obtuvimos en el hipocampo con las tres plataformas metabolómicas citadas, se concluyó que la mejor estrategia analítica era utilizar como disolvente en el tratamiento de muestra la mezcla 50/50 metanol/agua y combinar la información aportada por las plataformas de LC-ESI-HRMS y GC-EI-MS dado que, en el caso de la plataforma con RMN y acetonitrilo/agua como disolvente en el tratamiento de muestra, se obtuvieron pobres resultados.

#### Análisis estadístico:

Para comparar estadísticamente la tasa de adquisición de la conducta de autoadministración de las drogas de nuestro estudio en machos y hembras, se llevó a cabo un análisis de supervivencia mediante el método de *Kaplan-Meier*. Valores de  $p \leq 0.05$  en el estadístico de *Breslow* (prueba *Wilcoxon* generalizada) indicaron diferencias significativas. Por su parte, para el estudio del mantenimiento la conducta de autoadministración de las drogas (esto es, de la combinación de cocaína y alcohol o de la cocaína sola), respecto a sus controles con autoadministración de salino, se calculó la media de la tasa de respuestas y de los grupos de tratamiento en cada sesión. Con esas medias, se realizó un ANOVA factorial mixto con un factor intra-sujeto de medidas repetidas (sesión) y 24 niveles (correspondientes a cada sesión de autoadministración) y dos factores entre-grupos, uno de efectos fijos, Tratamiento, con tres niveles (salino/cocaína/cocaína + alcohol), y uno de selección de valores, el Sexo de las ratas.

En el caso de los análisis de los 14 metabolitos medidos por CE-LIF en el plasma sanguíneo, así como de los sumatorios (SUM AA, AAA, BCAA) y las proporciones (o ratios) de aminoácidos (BCAA/Tyr, Tyr/Phe, Gln/Glu, Ser/Ala y Ser/Gly) con significado biológico, se llevaron a cabo sucesivos ANOVAs de dos vías, con dos factores entre-grupos, uno de selección de valores, el Sexo de los animales, y el otro factor de efectos fijos, el grupo de Tratamiento, con tres niveles: los sujetos que se autoadministraron cocaína (Coc); los de la combinación de alcohol y cocaína (C+A); y los controles o de solución salina (Sal). Para el análisis post hoc se empleó el test de *Gabriel* (que se aplica a muestras ligeramente no equilibradas y asumiendo igualdad de varianzas) por adecuarse mejor a nuestra matriz de datos. Allí donde se encontró un efecto principal significativo en el factor Tratamiento, se llevaron a cabo contrastes planificados (ortogonales) mediante el test del *Helmert* con el fin de comparar, en un primer contraste, el grupo salino respecto a los que contenían cocaína (Coc+C+A) y, en un segundo, el efecto de la adición del alcohol a la cocaína, C+A vs Coc. Un análisis exploratorio de los datos (EDA), mediante criterios estadísticos y gráficos, mostró ligeras desviaciones en la forma de las distribuciones de algunas de las variables estudiadas, que se corrigieron cuando fue preciso mediante transformaciones. El estadístico de Levene confirmó que en todos los casos se cumplió el criterio de igualdad de varianza de las distribuciones. Todos los análisis citados anteriormente se realizaron mediante el software estadístico SPSS 25 y en todas las pruebas se consideró un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

En lo que se refiere a los estudios metabolómicos con las dos estrategias, no dirigida y dirigida, el procesamiento de datos se realizó empleando distintos softwares según las plataformas utilizadas: a) *Compound Discoverer 2.1.0.401* de *Thermo Scientific* para LC-ESI-HRMS; b) *MestReNova 14.1.1* de *Mestrelabs Research* para RMN; y c) *MassLynx 4.1* de *Waters* para GC-EI-HRMS. La optimización de los parámetros de análisis de cada plataforma se llevó a cabo con una serie de muestras de control



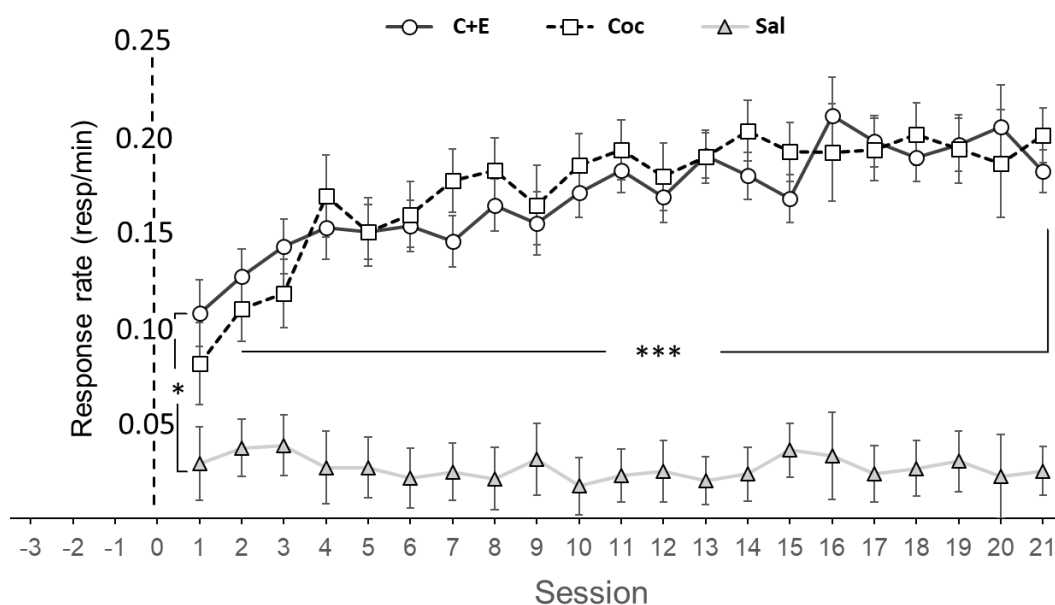
de calidad del proceso (QC) y una serie de blancos. El filtrado de todos los datos procesados se realizó con el programa de Microsoft Office Excel 2016. Se eliminaron aquellos datos que se encontraron no sólo en las muestras, sino también en los blancos, así como los que estuvieron en menos de un 70 % de las muestras de un mismo grupo de análisis y con alta variabilidad dentro de un mismo grupo ( $CV > 30\%$ ). En el programa Excel se realizó también parte del tratamiento de los datos, la normalización de los mismos según los miligramos (mg) de tejido utilizados en el análisis y la normalización por suma, para minimizar la variabilidad debida a causas instrumentales. Además, el tratamiento de los datos utilizando un escalado de Pareto, para minimizar tendencias debidas a la gran diferencia de concentraciones de los compuestos, se hizo con un programa específico de metabolómica, *MetaboAnalyst* 4.0. Los algoritmos empleados en la normalización y escalado se optimizaron utilizando previamente los QC y, posteriormente, se aplicaron al resto de muestras. Finalmente, el análisis estadístico de todos los datos procesados y tratados se realizó empleando de nuevo el programa *MetaboAnalyst* 4.0. En primer lugar, se aplicó un análisis multivariante no supervisado, como es el caso del Análisis de componentes principales (PCA), para la visualización de las muestras y el descarte de posibles valores atípicos (*outliers*). Posteriormente, se hizo un análisis multivariante supervisado, como es el caso del Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), para la generación de los modelos que permitieron la clasificación de los diversos grupos experimentales del estudio metabolómico realizado y encontrar los compuestos (o posibles metabolitos) que discriminaban en las distintas clasificaciones, a partir de los valores de las “Variables importantes en la proyección” (*Variable Importance in Projection*, VIP, en inglés), siendo considerados compuestos discriminantes aquellos con un  $VIP > 1.5$ . Asimismo, se realizaron análisis univariantes para obtener los valores “p” de los “test-t”, considerándose significativos los valores de  $p < 0,05$ . No obstante, debido al hecho de que en metabolómica se pueden llevar a cabo un gran número de análisis univariantes, puesto que pueden haber muchos compuestos detectados, el riesgo de contraer errores de falsos positivos (es decir, un resultado estadísticamente significativo, pero que en realidad no lo es) aumenta claramente, por lo que utilizamos la corrección de *Benjamini-Hochberg* para reducir el número de resultados significativos y, así, los falsos positivos. En dichos casos, el “p-valor” corregido para evitar errores de falsos positivos se denomina “Tasa de falsos descubrimientos” (*False Discovery Rate*, FDR, en inglés), siendo considerados significativos valores de  $FDR < 0,05$ . Por otro lado, también hay que tener en cuenta que los compuestos más relevantes deben ser aquellos que tengan una “Tasa de cambio” (*Fold Change*, FC, en inglés) mayor del 20 %. Así, para valores de  $FC > 1,2$  (lo que quiere decir que la abundancia del compuesto en el primer grupo que se compara es mayor que en el segundo) se dice que el compuesto está “sobre-expresado” (*upregulated*) y para valores de  $FC < 1/1,2 = 0,833$  (cuando la abundancia en el primer grupo es menor que en el segundo) se dice que el compuesto está “infra-expresado o reprimido” (*downregulated*). Por ello, valores de  $p$  ó  $FDR < 0,05$  y con un  $FC > 20\%$  son los que definen los compuestos (o posibles metabolitos) realmente significativos entre las distintas comparaciones de grupos experimentales estudiados. Todos esos criterios fueron aplicados a los posibles metabolitos que obtuvimos.

#### PRINCIPALES RESULTADOS:

Un primer objetivo esencial de nuestro proyecto ha sido el de la puesta a punto de la metodología para el estudio de la conducta de autoadministración intravenosa y conjunta de cocaína y alcohol en ratas machos y hembras de una edad de 51-72 días postnatales, que es un período del desarrollo equivalente al de 21-24 años en humanos. Es en esa etapa de nuestra vida cuando, además, es más frecuente el policonsumo de ambas drogas. Que nosotros supiéramos, en la literatura científica no había estudios similares con animales de ambos sexos y en esa etapa del desarrollo por lo que, basándonos en trabajos previos de nuestro grupo en los que ensayamos la administración pasiva y crónica de las dos drogas (Sánchez-López et al., 2016 b), iniciamos la autoadministración intravenosa de una solución conjunta de 1 mg/kg de cocaína y 2 g/kg de alcohol por autoinyección. Como ya se ha dicho anteriormente en el apartado de Metodología, las sesiones de autoadministración fueron diarias y duraron 3 semanas. Con el fin de que, en los estudios metabolómicos posteriores, que se iban a hacer con tejido de esos animales (tres regiones cerebrales y el plasma), éstos tuvieran una concentración total de cocaína+alcohol similar en su sangre al final de cada sesión diaria, se limitó el máximo de autoinyecciones que un animal dado podía darse a un valor de 15 en las dos horas de duración de cada



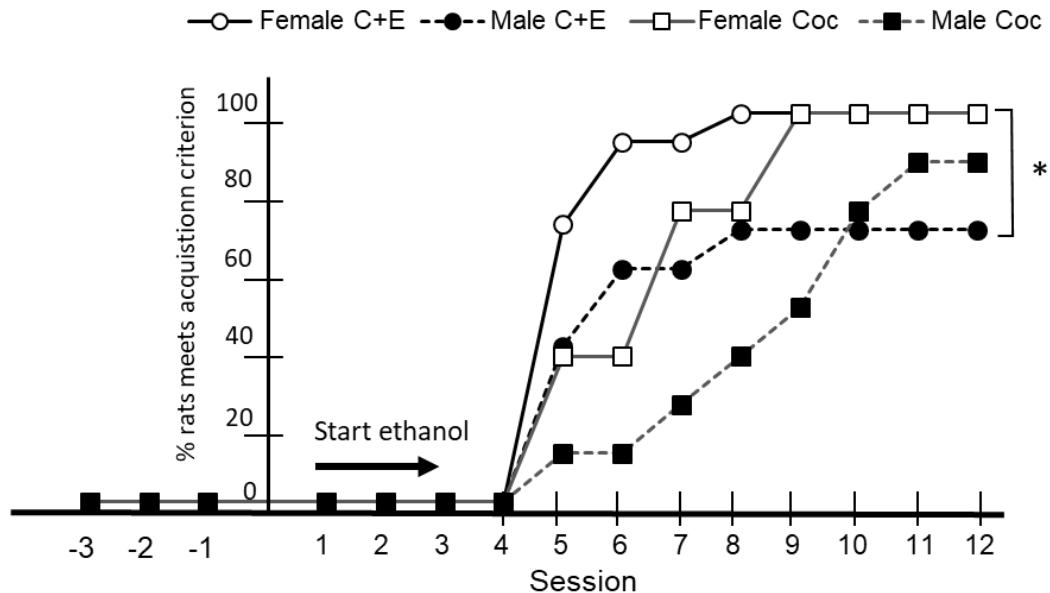
sesión. Se incluyeron, además, grupos de animales que se autoadministraron, unos cocaína sola ( 1 mg/kg) por inyección ) y otros suero salino, como grupos de control. En la Figura 1, puede verse la curva de mantenimiento de la conducta de autoadministración de esos animales.



**Figura 1.** Curva de mantenimiento de la conducta de autoadministración intravenosa de cocaína más alcohol/etanol (C+E), de cocaína sola (Coc) y de suero salino (Sal).

A la vista de la gráfica de la Figura 1, se aprecia que los animales expuestos a drogas, grupos C+E (o C+A) y Coc, se autoadministraron esas sustancias significativamente más en comparación con los del grupo Sal. Ello sugiere que la exposición conjunta a ambas drogas (C+E/C+A) tiene propiedades reforzantes positivas para los animales y que son comparables a las de la cocaína, esto es, que la presencia del alcohol no disminuye las propiedades reforzadoras de la cocaína. En la Figura 2, presentamos los resultados obtenidos cuando analizamos la fase de adquisición de esa conducta. Debe señalarse que los animales se expusieron progresiva y gradualmente a ambas drogas. Así, en las sesiones de la Figura 2 señalados con los números -1, -2 y -3, los animales comenzaron a autoadministrarse cocaína sola, mientras que en los de las sesiones con los números 1, 2 y 3 se empezó a añadir el alcohol gradualmente (1/3 de la dosis de 2 g/kg en la primera sesión; 2/3 de la dosis de 2 g/kg en la segunda; y 3/3 de la dosis de 2 g/kg en la tercera) en la solución de autoadministración que ya contenía cocaína (1 mg/kg). Cuando, a partir de la sesión 4, en la que ya los animales tenían las dosis completas de ambas drogas, analizamos la primera fase o de adquisición de la conducta de autoadministración, encontramos que las ratas hembras expuestas a cocaína + alcohol adquirieron más rápidamente el criterio de obtención del máximo número de autoinyecciones, (las 15 permitidas), en comparación con los machos, tanto de cocaína+alcohol como de cocaína sola, tal y como puede apreciarse en la Figura 2 mostrada a continuación. No hubo diferencias, por otro lado, entre las ratas hembras y los machos que se autoadministraron cocaína sola.





**Figura 2.** Adquisición de la conducta de autoadministración de cocaína + alcohol/etanol (C+E) y de cocaína sola (Coc).

Estos resultados sugieren que, tanto machos como hembras, parecen ser más sensibles a los efectos reforzadores positivos de la presencia conjunta de cocaína y alcohol, en comparación con los de la cocaína sola y, además, parece que las hembras pueden ser más vulnerables a las acciones reforzadoras de ambas drogas. En la fase de mantenimiento de la conducta de autoadministración, no obstante, no se observaron diferencias significativas entre ambos sexos, como puede observarse en la Figura 1 y, por ello, en la gráfica no se distingue entre machos y hembras.

Como también hemos dicho el apartado anterior de Metodología, una vez terminada la fase de mantenimiento, a los dos días después de esa finalización, se extrajo el plasma sanguíneo de todos los animales y sus cerebros para los estudios metabólicos posteriores. A este respecto, en la Tabla 1 (ver más abajo) pueden observarse los datos obtenidos tras el análisis de los niveles plasmáticos de 14 aminoácidos mediante el procedimiento de CE-LIF. Como puede apreciarse, hay diferencias basales entre sexos en siete aminoácidos (L-Orn, L-Gln, L-ala, glicina, L-Tyr, L-Phe y L-val; o por sus nombres completos, en Ornitina, Glutamina, Alanina, Tirosina, Fenilalanina y Valina), de modo que, con la excepción de la glutamina, los machos tuvieron valores más altos que las hembras, los cuales fueron independientes del tipo de droga autoadministrada.

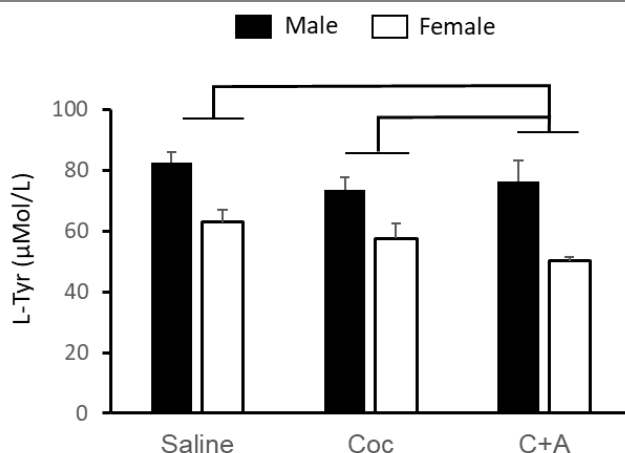


**Table 1** Plasma concentrations of amino acids ( $\mu\text{mol/L}$ )

|         | Saline |        |         | COC    |        |         | C+E    |        |         |
|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|
|         | Total  | Males  | Females | Total  | Males  | Females | Total  | Males  | Females |
| L-leu   | 185.95 | 207.64 | 164.25  | 173.59 | 179.52 | 167.66  | 179.86 | 175.43 | 183.03  |
| SD      | 42.81  | 50.55  | 16.38   | 22.22  | 19.09  | 24.76   | 25.93  | 19.55  | 29.99   |
| L-iso   | 105.57 | 110.84 | 100.31  | 106.71 | 113.23 | 100.19  | 102.48 | 102.39 | 102.55  |
| SD      | 18.21  | 20.74  | 14.44   | 16.03  | 16.76  | 13.13   | 14.11  | 13.73  | 14.89   |
| L-orn*  | 74.33  | 83.10  | 65.56   | 72.68  | 82.64  | 62.72   | 75.89  | 91.97  | 64.41   |
| SD      | 14.38  | 13.54  | 9.06    | 16.94  | 16.47  | 10.80   | 20.05  | 16.26  | 13.70   |
| L-gln*  | 766.83 | 739.19 | 794.47  | 691.84 | 636.61 | 747.08  | 714.56 | 672.09 | 744.89  |
| SD      | 117.27 | 111.18 | 122.38  | 94.50  | 45.18  | 100.61  | 102.35 | 87.25  | 104.34  |
| L-ala*  | 472.93 | 523.31 | 422.55  | 474.48 | 495.68 | 453.27  | 475.82 | 519.02 | 444.96  |
| SD      | 75.53  | 68.35  | 41.61   | 47.20  | 37.42  | 48.44   | 72.36  | 78.24  | 50.65   |
| L-treo  | 330.12 | 348.77 | 311.47  | 291.16 | 295.30 | 287.01  | 313.56 | 309.17 | 316.69  |
| SD      | 70.37  | 69.72  | 69.43   | 54.52  | 57.54  | 54.95   | 62.52  | 60.89  | 65.75   |
| Gly*    | 395.26 | 448.62 | 341.91  | 369.47 | 378.94 | 359.99  | 370.93 | 434.56 | 325.49  |
| SD      | 86.43  | 81.77  | 52.51   | 78.78  | 72.02  | 88.93   | 89.05  | 84.59  | 61.13   |
| L-ser   | 323.65 | 348.50 | 298.79  | 308.44 | 302.37 | 314.51  | 308.78 | 313.02 | 305.75  |
| SD      | 49.06  | 55.65  | 24.75   | 59.23  | 51.24  | 69.35   | 55.00  | 63.12  | 50.69   |
| Tau     | 312.11 | 340.76 | 283.46  | 317.52 | 247.61 | 387.43  | 277.47 | 263.11 | 287.73  |
| SD      | 124.01 | 153.29 | 84.52   | 212.97 | 63.93  | 286.24  | 61.27  | 74.29  | 50.50   |
| L-glu   | 127.51 | 140.25 | 114.77  | 119.20 | 111.19 | 127.21  | 128.00 | 139.07 | 120.10  |
| SD      | 29.50  | 30.50  | 23.39   | 41.35  | 20.82  | 55.53   | 19.89  | 14.84  | 19.64   |
| L-tyr*# | 72.78  | 82.59  | 62.98   | 65.70  | 73.75  | 57.65   | 61.11  | 76.37  | 50.22   |
| SD      | 15.53  | 11.48  | 12.78   | 11.70  | 11.01  | 4.91    | 20.29  | 23.97  | 4.84    |
| L-phe*  | 65.66  | 68.47  | 62.86   | 64.51  | 67.72  | 61.30   | 65.21  | 71.41  | 60.79   |
| SD      | 7.85   | 9.04   | 5.55    | 6.80   | 7.33   | 4.69    | 8.63   | 6.06   | 7.47    |
| L-val*  | 210.06 | 219.19 | 200.93  | 210.91 | 222.99 | 198.84  | 211.03 | 219.27 | 205.15  |
| SD      | 25.80  | 25.17  | 24.22   | 25.27  | 25.25  | 19.94   | 24.13  | 22.61  | 24.22   |
| L-asp   | 24.82  | 27.77  | 21.88   | 24.96  | 19.84  | 30.08   | 22.56  | 24.03  | 21.51   |
| SD      | 10.96  | 13.66  | 6.91    | 14.96  | 4.81   | 19.91   | 6.59   | 6.15   | 6.91    |

Differences: \* sex, # Treatment

Además, como puede comprobarse en esa Tabla 1 y en la Figura 3 (ver más abajo), las ratas hembras que se autoadministraron cocaína más alcohol mostraron niveles más bajos de L-Tirosina en comparación con los animales que se autoadministraron cocaína sola o suero salino.



**Figura 3.** Niveles del aminoácido L-Tirosina en el plasma sanguíneo de ratas machos y hembras que se autoadministraron cocaína+alcohol/etanol, cocaína sola o suero salino.

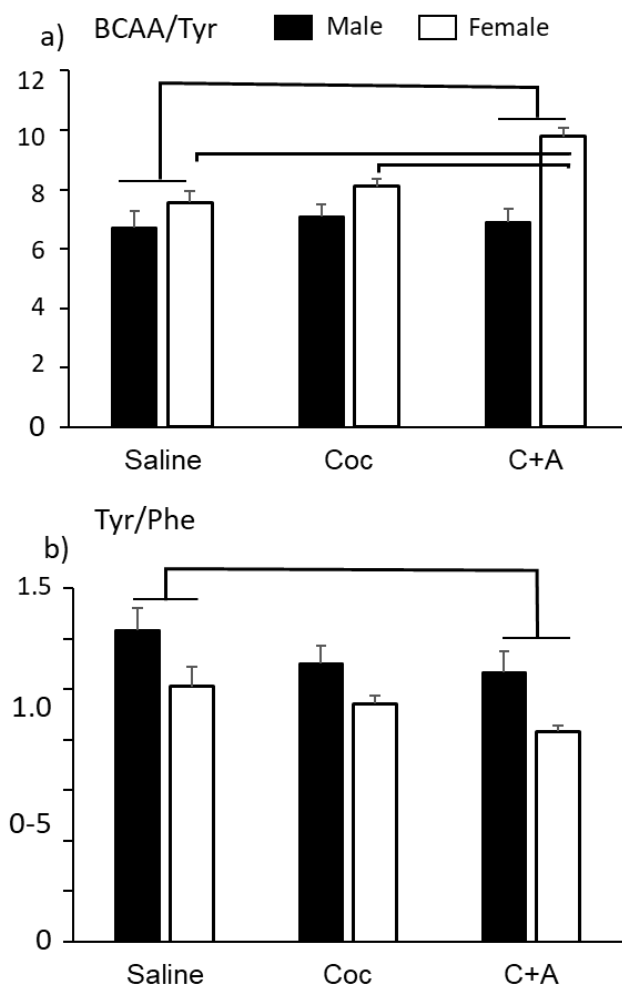
Por su parte, en la Tabla 2 (ver más abajo) aparecen los valores, estadísticamente significativos, de la suma de los aminoácidos aromáticos (Tirosina más Fenilalanina) y de aminoácidos de cadena ramificada (Valina + Isoleucina + Leucina; BCAA, por sus siglas en inglés), que fueron distintos (generalmente mayores) entre los machos y las hembras, independientemente de las drogas autoadministradas. También se muestran las proporciones (o ratios) encontradas entre BCAA/ Tirosina; Tirosina/Fenilalanina; Glutamina/Glutamato; Serina/ Alalina; y Serina/Glicina que fueron igualmente diferentes entre los dos sexos. En el caso de las proporciones/ratios entre BCAA/ Tirosina y entre Tirosina/Fenilalanina, además, se encontraron diferencias respecto a las drogas autoadministradas, como puede observarse gráficamente en la Figura 4 (ver más abajo).



**Table 2.** Molar ratios

|             | Saline |       |         | COC   |       |         | C+E    |       |         |
|-------------|--------|-------|---------|-------|-------|---------|--------|-------|---------|
|             | Total  | Male  | Females | Total | Males | Females | Total  | Males | Females |
| SUM AA      | 3467.  | 3688. | 3246.1  | 3291. | 3227. | 3354.   | 3307.2 | 3410. | 3233.   |
|             | 58     | 99    | 7       | 17    | 40    | 93      | 6      | 89    | 24      |
| SD          | 461.4  | 507.4 | 288.33  | 470.5 | 301.9 | 611.5   | 327.85 | 340.0 | 309.7   |
|             | 7      | 4     |         | 1     | 3     | 0       |        | 6     | 5       |
| AAA*        | 138.4  | 151.0 | 125.83  | 130.2 | 141.4 | 118.9   | 126.33 | 147.7 | 111.0   |
|             | 4      | 6     |         | 1     | 7     | 5       |        | 8     | 0       |
| SD          | 17.73  | 11.63 | 13.22   | 15.49 | 12.79 | 7.80    | 26.41  | 26.94 | 11.17   |
| BCAA*       | 501.5  | 537.6 | 465.49  | 491.2 | 515.7 | 466.6   | 493.37 | 497.0 | 490.7   |
|             | 8      | 6     |         | 1     | 4     | 8       |        | 9     | 2       |
| SD          | 79.89  | 88.96 | 51.64   | 60.12 | 58.97 | 53.77   | 55.46  | 45.60 | 63.11   |
| BCAA/Tyr&*# | 7.13   | 6.70  | 7.57    | 7.60  | 7.10  | 8.10    | 8.58   | 6.89  | 9.79    |
| SD          | 1.53   | 1.77  | 1.17    | 1.05  | 1.12  | 0.73    | 1.95   | 1.57  | 1.11    |
| Tyr/Phe*#   | 1.12   | 1.23  | 1.01    | 1.02  | 1.10  | 0.94    | 0.93   | 1.07  | 0.83    |
| SD          | 0.28   | 0.28  | 0.25    | 0.17  | 0.21  | 0.09    | 0.23   | 0.30  | 0.09    |
| Gln/Glu*    | 6.28   | 5.47  | 7.10    | 6.18  | 5.86  | 6.50    | 5.73   | 4.87  | 6.35    |
| SD          | 1.56   | 1.25  | 1.43    | 1.56  | 0.88  | 2.05    | 1.35   | 0.73  | 1.37    |
| Ser/Ala*    | 0.69   | 0.68  | 0.71    | 0.65  | 0.61  | 0.69    | 0.66   | 0.61  | 0.69    |
| SD          | 0.11   | 0.15  | 0.05    | 0.12  | 0.10  | 0.13    | 0.13   | 0.13  | 0.11    |
| Ser/Gly*    | 0.84   | 0.79  | 0.89    | 0.85  | 0.81  | 0.89    | 0.86   | 0.74  | 0.96    |
| SD          | 0.13   | 0.13  | 0.12    | 0.15  | 0.12  | 0.18    | 0.20   | 0.18  | 0.16    |

Differences: \* sex, #  
Treatment; & sex x  
treatment  
interaction  
**SUM AA:** sum of  
fourteen amino  
acids; **AAA:**  
aromatic amino acids  
(Tyr+Phe); **BCAA:**  
branched aminoacids  
(Val+Iso+Leu)



**Figura 4.** Valores de las proporciones/ratios entre la suma de aminoácidos de cadena ramificada y el aminoácido L-Tirosina (gráfica a) y los de las proporciones/ratios entre los aminoácidos Tirosina y Fenilalanina (gráfica b) en el plasma sanguíneo de ratas machos y hembras que se autoadministraron cocaína+alcohol/etanol, cocaína sola o suero salino.

De todos los datos expuestos en las Tablas 1 y 2, consideramos importante destacar el hecho de que la concentración del aminoácido L-Tirosina está disminuida significativamente, en comparación con los animales controles, tanto en machos como en hembras. También es de resaltar que aquellas proporciones/ratios en las que la L-Tirosina contribuye (BCAA/Tirosina y Tirosina/Fenilalanina) muestran diferencias significativas en los grupos de autoadministración de drogas. Se reseñan esos resultados porque, como sabemos, la Fenilalanina y la Tirosina son aminoácidos precursores de las catecolaminas (noradrenalina y adrenalina). A su vez, la Fenilalanina es un aminoácido esencial y en su conversión a Tirosina participa la enzima fenilalanina hidroxilasa. Por su parte, la enzima tirosina hidroxilasa cataliza la conversión de Tirosina en L-DOPA, la cual es la



molécula precursora de la dopamina. Se sabe que la hidroxilación de Fenilalanina a Tirosina se realiza principalmente en el hígado, pero también se hace en el cerebro y en la médula adrenal con la participación de la enzima tirosina hidroxilasa. Se ha comprobado, por otro lado, que en consumidores problemáticos la proporción Tirosina/Fenilalanina está claramente baja, así como en la enfermedad de Parkinson. Debido a que, como sabemos, ambas patologías se caracterizan por sus bajos niveles de dopamina, puede pensarse que ello podría ocurrir a causa de que los niveles de la molécula precursora de la dopamina, la L-Tirosina, están disminuidos en presencia de cocaína. Esta posible disminución de la Tirosina puede detectarse en el plasma, como hemos demostrado con los resultados de este proyecto, por lo que se puede hipotetizar que la L-Tirosina puede ser un marcador de posibles alteraciones en los niveles de dopamina cerebrales.

Por otra parte, la ratio BCAA/Tirosina se emplea habitualmente como un buen indicador del metabolismo hepático, por lo que podría utilizarse igualmente como un marcador plasmático de posibles alteraciones entre los niveles de aminoácidos de cadena ramificada y los de L-Tirosina en personas policonsumidoras de cocaína y alcohol.

En lo que se refiere a los resultados obtenidos con las dos estrategias metabolómicas (no dirigida y dirigida), en el caso de la **no dirigida** y en base a los datos que se obtuvieron con las muestras del hipocampo en las tres plataformas metabolómicas (RMN, LC-ESI-HRMS y GC-EI-HRMS) se comprobó, como también se indicó ya más arriba en el apartado de Metodología, que el mejor procedimiento analítico fue el de utilizar como disolvente en el tratamiento de muestra la mezcla 50/50 metanol/agua para, después, combinar la información aportada por las plataformas de LC-ESI-HRMS y GC-EI-HRMS dado que, en el caso de la plataforma de RMN y acetonitrilo/agua como disolvente en el tratamiento de muestra, no se obtuvieron buenos resultados. A este respecto, la Tabla 3 muestra un resumen del número total de compuestos detectados utilizando ambas plataformas metabolómicas en las tres regiones cerebrales estudiadas y, como cabía esperar, el número de compuestos detectados empleando la plataforma LC-ESI-HRMS es muy superior (entre 13 y 26 veces) que utilizando la de GC-EI-HRMS, siendo también de destacar el empleo, en el caso LC-ESI-HRMS, de las dos polaridades en la ionización (ESI+ y ESI-) para complementar los compuestos detectados.

**Tabla 3.** Número total de compuestos detectados<sup>(a)</sup> en las diferentes muestras de tejido estudiadas empleando como disolvente en el tratamiento de muestra 50/50 metanol/agua, tanto con una plataforma LC-ESI-HRMS con ionización positiva y negativa, como con una plataforma de GC-EI-HRMS.

| Nº total de compuestos detectados | LC-ESI-HRMS |       | GC-EI-HRMS |
|-----------------------------------|-------------|-------|------------|
|                                   | ESI +       | ESI - | Total      |
| Hipocampo                         | 815         | 485   | 52         |
| Corteza Prefrontal                | 745         | 407   | 87         |
| Cuerpo Estriado                   | 745         | 436   | 51         |

(a) Compuestos detectados en, al menos, el 70 % de las muestras de cada uno de los seis grupos experimentales de nuestro estudio: (H\_CA ; M\_CA;H\_C ; M\_C ; H\_S; M\_S; machos (M); hembras (H); salino (S); cocaína sola (C); cocaína más alcohol (CA)).



En relación con los resultados concretos obtenidos con LC-ESI-HRMS (ver Tabla 4, más abajo), se debe señalar que el estudio del hipocampo presentó una buena separación en el análisis discriminante (PLS-DA) en todas las comparaciones de los distintos tratamientos, observándose mayores diferencias de los tratamientos en los machos y menores en las hembras. Estas diferencias respecto al sexo se observaron también mayoritariamente en los otros dos tejidos cerebrales, aunque con excepciones en alguna comparación. Así, en lo que se refiere a la corteza prefrontal y cuerpo estriado, se vieron diferencias menos claras entre los tratamientos y, si bien hubo un buen número de compuestos significativos en los análisis discriminantes (PLS-DA), se observó una peor predicción del modelo que en el hipocampo. Esto fue más acusado en la corteza prefrontal, donde los valores que informaron de la validez del modelo PLS-DA para predecir a qué grupo se podría asignar una muestra dada (Q2), indicaron una peor clasificación. Por su parte, en cuerpo estriado sí que se observaron diferencias más claras entre los tratamientos, aunque no tan significativas como en hipocampo. En lo relativo a los compuestos significativos (esto es con  $FDR < 0.05$ ), se detectó un mayor número entre los distintos tratamientos en el hipocampo. No obstante, hubo excepciones, como en las comparaciones de machos entre cocaína y salino (M\_C-S) y de hembras entre cocaína+alcohol y cocaína sola (H\_CA-C), que tuvieron un número sorprendentemente bajo de compuestos significativos. Una posible explicación al bajo número de resultados significativos de estas dos comparaciones, es que ello pudiera ser debido a la presencia de alguna muestra que tuviera un perfil metabólico global relativamente distinto a aquellas de su mismo grupo (aunque hubiera superado los criterios de filtrado y de detección de *outliers*) y que esto aumentara la variabilidad intragrupal, disminuyendo así el número de compuestos significativos.



**Tabla 4.** Número de compuestos detectados, discriminantes y significativos en las diferentes muestras de tejido estudiadas empleando como disolvente en el tratamiento de muestra 50/50 metanol/agua y una plataforma de LC-ESI-HRMS.

| Comparativa<br>(a) | Nº de compuestos detectados<br>(b) |                    |                 | Nº de compuestos discriminantes según análisis multivariantes (c) |                    |                 | Nº de compuestos significativos según análisis univariantes (d) |                    |                 |
|--------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------|---|--------------------|-----------------|---|--------------------|-----------------|
|                    | Hipocampo                          | Corteza Prefrontal | Cuerpo Estriado | Hipocampo   | Corteza Prefrontal | Cuerpo Estriado | Hipocampo   | Corteza Prefrontal | Cuerpo Estriado |
| H_CA-S             | 968                                | 689                | 993             | 57  | 45                 | 61              | 48  | 7                  | 43              |
| M_CA-S             | 987                                | 922                | 920             | 67  | 68                 | 55              | 46  | 14                 | 21              |
| H_C-S              | 1082                               | 868                | 875             | 73  | 36                 | 62              | 42  | 20                 | 25              |
| M_C-S              | 1026                               | 815                | 992             | 77  | 62                 | 62              | 3   | 15                 | 83              |
| H_CA-C             | 965                                | 767                | 897             | 53  | 43                 | 48              | 1   | 17                 | 53              |
| M_CA-C             | 1053                               | 986                | 1002            | 87  | 67                 | 55              | 100   | 71                 | 66              |

(a) Comparaciones según el sexo, machos (M) y hembras (H), y el tratamiento aplicado, salino (S), cocaína (C) y cocaína más alcohol (CA). El número total de animales que se compararon entre sí fue de 60, siendo el número de cada grupo de tratamiento el siguiente: H\_CA (14); M\_CA (10); H\_C (8); M\_C (8); H\_S (10); y M\_S (10).

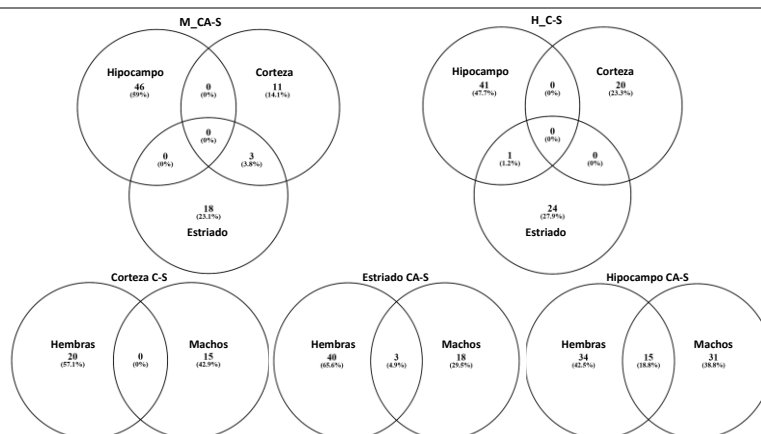
(b) Compuestos detectados con un CV < 30 % en, al menos, uno de los dos grupos de la comparación y presentes en, al menos, el 70 % de todas las muestras de uno de los dos grupos comparados.

(c) Compuestos que discriminan la clasificación del modelo PLS-DA, es decir, con VIP > 1,5.

(d) Compuestos significativos según un análisis univariante, con FDR < 0.05 y un FC > 20 % y con fórmula molecular asignada.

Por otro lado, dado el gran número de compuestos significativos obtenidos con la plataforma LC-ESI-HRMS, consideramos oportuno realizar varias comparaciones de los mismos con diferentes diagramas de Venn. Así, como se puede ver en la Figura 5 (ubicada más abajo), donde se muestran algunos ejemplos representativos de dichos diagramas, cuando se compararon los distintos compuestos significativos para los diferentes tratamientos y sexos entre las tres regiones cerebrales, se pudo concluir que el número de compuestos comunes entre esas regiones cerebrales era prácticamente despreciable. Asimismo, cuando comparamos en un determinado tratamiento y tejido los compuestos significativos entre machos y hembras, se pudo concluir que el número de compuestos comunes entre ambos sexos era también prácticamente despreciable en la corteza prefrontal y el cuerpo estriado, pero no así en el hipocampo. A la vista de estas comparaciones, podemos considerar que fue un gran acierto el haber decidido analizar estas tres regiones cerebrales, así como estudiarlas en machos y hembras, ya que todo ello ha hecho posible encontrar un mayor número de compuestos significativos y posibles metabolitos biomarcadores del consumo conjunto de cocaína y alcohol en sujetos jóvenes de ambos sexos, cumpliendo así el segundo de los objetivos esenciales de nuestro proyecto.





**Figura 5.** Gráficos de Venn correspondientes a diferentes comparaciones entre muestras de distintas regiones cerebrales, tanto en ratas hembra como en machos, obtenidas después de un tratamiento con 50/50 metanol/agua y analizadas con una plataforma de LC-ESI-HRMS.

Respecto a los resultados obtenidos con la plataforma GC-EI-HRMS (ver Tabla 5, más abajo), la principal conclusión que destacamos es que el número total de compuestos detectados es menor que con la de LC-ESI-HRMS. Este hecho hizo que, aunque esperado, no se pudieran obtener unos resultados relevantes en el estudio de PLS-DA ya que, al haber menos compuestos para generar el modelo, éste no se ajustaba correctamente, impidiendo la consecución de un listado de metabolitos discriminantes. Sin embargo, sí que se pudieron realizar análisis univariantes para encontrar los compuestos significativos si bien, por la misma razón expuesta anteriormente, el número fue bastante menor que con LC-ESI-HRMS. En cuanto al número de estos compuestos significativos ( $p$ -valor  $< 0.05$ ), al igual que sucedió con LC-ESI-HRMS, de entre los distintos tratamientos se detectaron un mayor número en el hipocampo. La principal ventaja de estos análisis frente a los de LC-ESI-HRMS, además de ser complementarios a LC-ESI-HRMS en cuanto al tipo de compuestos detectados, es que se puede obtener una identificación más robusta y de manera más sencilla de dichos compuestos empleando librerías como las del NIST (National Institute of Standards and Technology), lo que facilita la validación de los compuestos considerados como significativos.



**Tabla 5.** Número de compuestos detectados y significativos obtenidos en las diferentes muestras de tejido estudiadas empleando como disolvente en el tratamiento de muestra 50/50 metanol/agua y una plataforma GC-EI-HRMS.

| Comparativa<br>(a) | Nº de compuestos detectados<br>(b) |                    |                 | Nº de compuestos significativos según análisis univariantes (c) |                    |                 |
|--------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------|---|--------------------|-----------------|
|                    | Hipocampo                          | Corteza Prefrontal | Cuerpo Estriado | Hipocampo   | Corteza Prefrontal | Cuerpo Estriado |
| H_CA-S             | 47                                 | 86                 | 48              | 8   | 2                  | 7               |
| M_CA-S             | 52                                 | 86                 | 50              | 4   | 1                  | 1               |
| H_C-S              | 47                                 | 87                 | 50              | 4   | 4                  | 1               |
| M_C-S              | 52                                 | 85                 | 49              | 3   | 0                  | 1               |
| H_CA-C             | 48                                 | 87                 | 49              | 5   | 2                  | 4               |
| M_CA-C             | 52                                 | 85                 | 49              | 2   | 1                  | 2               |

(a) Comparaciones según el sexo, machos (M) y hembras (H) y el tratamiento aplicado, salino (S), cocaína (C) y cocaína más alcohol (CA).

(b) Compuestos detectados con un CV < 30 % en, al menos, uno de los dos grupos de la comparación y presentes en, al menos, el 70 % de todas las muestras de uno de los dos grupos comparados.

(c) Compuestos significativos, según un análisis univariante, con p-valor < 0.05 y un FC > 20 %.

Seleccionados los compuestos significativos como se ha ido describiendo, el siguiente paso consistió en identificar esos metabolitos como potenciales biomarcadores, con el fin de tratar de establecer una interpretación biológica adecuada, siendo ésta una de las tareas más desafiantes y laboriosas de los estudios metabolómicos. Se comenzó con la identificación tentativa de los metabolitos obtenidos en la plataforma GC- EI-HRMS, dado que los espectros de masas obtenidos con ionización electrónica (EI, *Electron Ionization* en inglés) en un sistema de HRMS pueden encontrarse directamente en la espectroteca oficial del ya citado NIST, lo cual posibilita la identificación automática de los metabolitos buscados en base a su espectro de masas de alta resolución (ver Tabla 6, más abajo). Dentro de los metabolitos significativos obtenidos con esa plataforma, puede señalarse la presencia de algunos ácidos grasos (p.e., el ácido octadecenóico u octadecanóico que está en los tres tejidos), aminoácidos (Valina, Isoleucina, Alanina, Serina, Glicina y Glutamina) y azúcares (Fructosa y Glucosa).



**Tabla 6.** *Compuestos significativos en las diferentes muestras de tejido estudiadas con un sistema GC-EI-HRMS que han sido identificados tentativamente.*

| Comparativa <sup>(a)</sup> | Compuestos significativos identificados tentativamente  |  |   |
|----------------------------|---|--|---|
|                            | Hipocampo   | Corteza Prefrontal   | Cuerpo Estriado   |
| H_CA-S                     | Ácido Octadecanoico<br>Fructosa<br>Glucosa<br>Valina<br>Ácido Máfico<br>Ácido Isocítrico<br>Isoleucina<br>Alanina | Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenoico<br>Ácido 9-Octadecenoico   | Ácido Mirístico<br>Uridina<br>Ácido Octadecanoico<br>Valina<br>Ácido Pirrol-2-carboxílico<br>Dietil Phthalato<br>Colesterol |
| M_CA-S                     | Glicerol<br>Serina<br>Alanina<br>1-monopalnitina  | 2-1E-1-Octadeceniloxietil esterato   | Alfa-D-Glucopiranosido  |
| H_C-S                      | Ácido bórico<br>Glicerol<br>Ácido 2-hidroxiopropanoico<br>Ácido 14-metilpentadecanoico                            | Ácido 5,8,11,14-Eicosatetraenoico<br>Ácido 9-Octadecenoico<br>Ácido Hexadecanoico<br>Ácido 4,7,10,13,16,19 docosaheptaenoico | Ácido Octadecanoico   |
| M_C-S                      | Ácido Bórico<br>Ácido 2-hidroxiopropanoico<br>1-nonanol   | 0  | Ácido Pirrol-2-carboxílico  |
| H_CA-C                     | Ácido Bórico<br>Ácido 2-hidroxi propanoico<br>Ácido Octadecanoico<br>Ácido 14-metilpentadecanoico<br>Fructosa     | Oleamida<br>Ácido 4,7,10,13,16,19 docosaheptaenoico  | Glutamina<br>Metanamina<br>Glicina<br>Dietil Phthalato<br>Valina  |
| M_CA-C                     | Isoleucina<br>Serina  | 2-1E-1-Octadeceniloxietil esterato   | Ácido Pirrol-2-carboxílico<br>Valina  |

(a) Comparaciones según el sexo, machos (M) y hembras (H) y el tratamiento aplicado, salino (S), cocaína (C) y cocaína más alcohol (CA).

Con una plataforma LC-ESI-HRMS, la identificación tentativa es mucho más compleja, ya que los espectros de masas de alta resolución obtenidos con ionización por electrospray (ESI, *Electrospray Ionization*, en inglés) dependen de los instrumentos en los que se obtienen y, por lo tanto, no existen espectrotecas asociadas a los mismos. Por ello, el empleo de este tipo de plataformas obliga a que la identificación tentativa se haga realizando búsquedas en bases de datos especializadas, como las de METLIN y KEGG, cotejando la masa exacta de los valores obtenidos experimentalmente con los teóricos de las bases de datos y asumiendo un error máximo de 5 ppm. Además, nosotros también tuvimos en cuenta la distribución o perfil isotópico del ion molecular y el patrón de fragmentación MS/MS porque, de estar disponibles en la base de datos, son herramientas muy útiles para ayudar en la identificación tentativa de un compuesto. A pesar de todo ello, en bastantes ocasiones no es posible encontrar la identificación tentativa de todos los compuestos que han sido detectados como significativos, a partir de la respuesta de sus espectros de masas obtenidos experimentalmente. Así, en nuestro caso, de los 675 compuestos significativos que encontramos con fórmula molecular asignada, sólo 170 de ellos fueron identificados tentativamente (ver Tablas 7-9, más abajo), lo que supone un 25 % del total, aproximadamente. Dentro de los metabolitos significativos obtenidos con LC-EI-HRMS, destacan la presencia de ácidos grasos, aminoácidos, azúcares y aminas, entre otros compuestos.



**Tabla 7.** *Compuestos significativos identificados tentativamente en las diferentes muestras de tejido estudiadas tras la comparación entre los tratamientos de cocaína+alcohol y salino (CA-S), tanto para ratas hembras como machos, con un sistema LC-ESI-HRMS.*

| HEMBRAS   | MACHOS   |
|---|--|
| <b>HIPOCAMPO (33)</b>   |  |
| Cytosine<br>2-Hydroxymethylclavam<br>Thiomorpholine 3-carboxylate S-Allyl-L-cysteine<br>L-Methionine S-oxide<br>Nε-Acetyl-L-lysine<br>2-Pyridyl hydroxymethane sulfonic acid<br>Prenyl-L-cysteine<br>Cytidine<br>sn-glycero-3-Phosphocholine<br>Aminofructose 6-phosphate<br>S-(Hydroxyphenylacetothiohydroximoyl)-L-cysteine<br>Pantetheine<br>Vaccenic acid<br>14'-apo-beta-carotenal<br>4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid<br>7, 10, 13, 16, 19-Docosapentaenoic acid<br>β-D-Fructose 1,6-bisphosphate<br>Pyruvate | N-Nitrosopyrrolidine<br>Cytosine<br>Glutamine<br>Cinnamic acid<br>2,3-Dihydroxyindole<br>4-Methylene-L-glutamine<br>Citrulline<br>Nε-Acetyl-L-lysine<br>Oxalomalic Acid<br>Cytidine<br>sn-glycero-3-Phosphocholine<br>Aminofructose 6-phosphate<br>1-Deoxy-D-alto-heptulose 7-phosphate<br>CDP-ethanolamine<br>LysoPC(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)) |
| <b>CORTEZA PREFRONTAL (7)</b>   |  |
| Cytosine<br>Threonic acid<br>Pantothenic Acid<br>Glutamyl-glutamic acid   | 3-Hydroxy-N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine<br>Pantothenic Acid<br>N-Acetylaspartylglutamic acid   |
| <b>CUERPO ESTRIADO (14)</b>   |  |
| Trigonellinamide<br>Acetyl-L-arginine<br>Succinyl-L-ornithine<br>Inosine<br>Hydroxyphenylacetothiohydroximoyl)-L-cysteine<br>Acetylaspartylglutamic acid  | Furoic acid<br>Methylhydantoin<br>Hydroxybenzaldehyde<br>Pyrroline hydroxycarboxylic acid<br>Hydroxyacetophenone<br>3-Hydroxy-N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine<br>Pyrene-1,8-dione<br>Acetylaspartylglutamic acid   |



**Tabla 8.** *Compuestos significativos identificados tentativamente en las diferentes muestras de tejido estudiadas tras la comparación entre los tratamientos de cocaína y salino (C-S), tanto para ratas hembras como machos, con un sistema LC-ESI-HRMS.*

| HEMBRAS  | MACHOS  |
|--|---|
| <b>HIPOCAMPO (16)</b>  |   |
| L-Valine<br>3,4-Dehydrothiomorpholine-3-carboxylate<br>Thiomorpholine 3-carboxylate<br>trans-Lachnophyllol<br>S-Allyl-L-cysteine<br>N-Acetyl-leucine<br>Nε-Acetyl-L-lysine<br>N-Acetyl-L-glutamic acid<br>Prenyl-L-cysteine<br>D-Glucarate<br>Ribose 1-phosphate<br>sn-glycero-3-Phosphocholine<br>Aminofructose 6-phosphate<br>S-(Hydroxyphenylacetothiohydroximoyl)-L-cysteine<br>Pantetheine<br>β-D-Fructose 1,6-bisphosphate |   |
| <b>CORTEZA PREFRONTAL (13)</b>   |   |
| 4-Amino-2-nitrotoluene<br>Histidine<br>Arabinonic acid<br>Gluconic acid<br>Butoxycarboxim<br>Glutamyl phosphate<br>Inosine<br>Butyrolactone<br>2-Aminoacrylic acid   | 3,4-Dehydrothiomorpholine-3-carboxylate<br>Methyloxaloacetate<br>Aminomuconic acid<br>N-Hydroxy-L-phenylalanine   |
| <b>CUERPO ESTRIADO (21)</b>  |   |
| Quinone<br>Methylhydantoin<br>Maleamic acid<br>Hydroxybenzaldehyde<br>2-Hydroxymethylclavam<br>Hydroxy-L-phenylalanine<br>Galactonic acid  | Cytosine<br>Methylhydantoin<br>Pyrroline hydroxycarboxylic acid<br>Asparagine<br>Phenylacetamide<br>Methylimidazoleacetic acid<br>Hydroxymethylclavam<br>Pyridoxamine<br>Acetylspermidine<br>Methoxybrassinin<br>Inosine<br>Deoxy-D-altro-heptulose 7-phosphate<br>Glutamylglutamic acid<br>Acetylaspartylglutamic acid |



**Tabla 9.** *Compuestos significativos identificados tentativamente en las diferentes muestras de tejido estudiadas tras la comparación entre los tratamientos de cocaína+alcohol y cocaína (CA-C), tanto para ratas hembras como machos, con un sistema LC-ESI-HRMS.*

| HEMBRAS   | MACHOS   |
|---|--|
| <b>HIPOCAMPO (23)</b>   |  |
|   | N-Nitrosopyrrolidine<br>Brunfelsamidine<br>Cytosine<br>Goitrin<br>Glutamine<br>4-Methylene-L-glutamine<br>S-Allyl-L-cysteine<br>Arabinonic acid<br>4-Aminobenzenesulfonate<br>Citrulline<br>Nε-Acetyl-L-lysine<br>2-Pyridyl hydroxymethane sulfonic acid<br>Prenyl-L-cysteine<br>3-Hydroxy-N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine<br>Oxalomalic Acid<br>Cytidine<br>Phosphatidyl glicerol<br>sn-glycero-3-Phosphocholine<br>Aminofructose 6-phosphate<br>1-Deoxy-D-alto-heptulose 7-phosphate<br>Pantetheine<br>Xanthosine<br>N-Acetylaspartylglutamic acid |
| <b>CORTEZA PREFRONTAL (15)</b>  |  |
| Cytosine<br>Guanidinobutanoic acid<br>Coumarin<br>Guanosine<br>UDP-glucose  | 4-Vinylcyclohexene<br>Butylbenzene<br>limonene 1alpha,2alpha-epoxide<br>Phosphodimethylethanolamine<br>Hydroxy-L-phenylalanine<br>Diaminononanoate<br>ribosylimidazoleacetic acid<br>Tributyl phosphate<br>D-Ribose 1-diphosphate<br>Acetone cyanohydrin   |
| <b>CUERPO ESTRIADO (28)</b>   |  |
| Quinone<br>Methylhydantoin<br>Phenylacetamide<br>Threonic acid<br>Hydroxyacetophenone<br>2-Hydroxymethylclavam<br>Xanthine<br>Vanillylamine<br>Fucono-1,5-lactone<br>Hydroxy-L-phenylalanine<br>threo-Isocitric acid<br>Galactonic acid<br>Glutamyl phosphate<br>Inosine<br>Hydroxyphenylacetothiohydroximoyl)-L-cysteine<br>Cytidine 2'-phosphate<br>UDP-D-galactose | Cytosine<br>Asparagine<br>Acetylspermidine<br>Diaminononanoate<br>3-Hydroxy-N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine<br>Dihydroxybenzophenone<br>Butoxycarboxim<br>Uridine<br>Deoxy-D-alto-heptulose 7-phosphate<br>N-Acetyl-b-neuraminic acid<br>Adenosylhomocysteine  |



---

Por otro lado, la identificación inequívoca de los diferentes compuestos identificados tentativamente exige analizar los estándares correspondientes a los mismos, de modo que sólo se podrá alcanzar dicha identificación si las masas exactas, los espectros MS/MS y los tiempos de retención cromatográficos de esos estándares coinciden con los de los compuestos encontrados en las muestras analizadas. En el momento de redactar este Resumen Final, esa identificación inequívoca todavía no ha sido posible finalizarla en su totalidad, si bien ya hemos podido identificar 59 metabolitos significativos presentes en una u otra de las tres regiones cerebrales estudiadas y que, con diferentes porcentajes, también están presentes en el plasma sanguíneo (ver más adelante). Todos esos metabolitos participan en distintas vías metabólicas como son las de catecolaminas, purinas, pirimidinas, neuropéptidos, ácidos grasos y carboxílicos, lípidos, vitaminas, estrés oxidativo, metabolismo energético, sistemas endocannabinoide y colinérgico, al igual que en las de glutamato y glutamina, arginina, triptófano y de otros aminoácidos.

En lo que se refiere a las muestras de plasma, obtuvimos los resultados que describiremos más adelante aplicando una **estrategia** metabolómica **dirigida**. Como sabemos, en los estudios metabolómicos se hacen planteamientos no dirigidos cuando los compuestos a identificar no son conocidos pero, en nuestro caso, al haber identificado tentativa y previamente en el presente proyecto un buen número de metabolitos en las tres regiones cerebrales estudiadas, era pertinente realizar un análisis metabolómico dirigido en el plasma de los animales por ser, además, un tejido en el que las investigaciones que se hagan en él tienen un gran poder de traslación porque, normalmente, puede obtenerse sangre con facilidad para hacer estudios similares en personas (obviamente, siendo informados y con su consentimiento).

Dado que el plasma es un tejido en el que los metabolitos se encuentran ya en una matriz líquida acuosa y con un alto contenido proteico, la preparación de muestra requiere de la eliminación de proteínas previamente. Para ello, se evaluaron dos alternativas: a) la simple ultrafiltración del plasma con membranas de 3 kD; y b) la precipitación de las proteínas del plasma mediante disolventes orgánicos, seguida de su posterior filtración a través de cartuchos de extracción de fase sólida para la eliminación de fosfolípidos. Como se puede observar en la Tabla 10 (ver más abajo), los resultados obtenidos permitieron concluir que el protocolo que posibilitaba detectar un mayor número de metabolitos en las muestras de plasma fue el de precipitación de proteínas.



**Tabla 10.** Valor medio (n=5) de compuestos detectados en muestras de plasma<sup>(a)</sup> según el tratamiento de muestra indicado y con una plataforma de LC-ESI-HRMS.

| ESI+                           |                                     | ESI-                           |                                     |
|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Ultrafiltración <sup>(b)</sup> | Precipitación + SPEP <sup>(c)</sup> | Ultrafiltración <sup>(b)</sup> | Precipitación + SPEP <sup>(c)</sup> |
| 886                            | 1458                                | 366                            | 487                                 |

- (a) Compuestos con intensidad mayor de 1.000.000 cuentas, eliminado los componentes del blanco (n=4).
- (b) Utilizando membranas de 3 kDa.
- (c) Utilizando metanol (4/1) con relación al plasma y un cartucho de SPE para la eliminación de fosfolípidos.

Una vez precipitadas las proteínas del plasma y eliminados sus fosfolípidos, se utilizó la plataforma de análisis LC-ESI-HRMS y se obtuvieron los resultados recogidos en las Tablas 11-13 (ver más abajo). En total fueron 111 los compuestos significativos detectados en el plasma, que también se identificaron tentativamente en las distintas regiones cerebrales de nuestro proyecto, siendo el mayor número de ellos los que se encontraron en el cuerpo estriado, 58 en total (52 %); 28 en el hipocampo (25 %); y otros 25 en la corteza prefrontal (23 %). Por otro lado, si tenemos en cuenta el número total de compuestos significativos identificados en las distintas regiones cerebrales (ver Tabla 4, más arriba), el 25 % de los encontrados en el cuerpo estriado también aparecen en el plasma, un 17 % lo hacen en la corteza prefrontal y un 12 % en el hipocampo. Es preciso decir, no obstante y como se puede observar en las Tablas 11-13, que no todos los compuestos encontrados en el plasma tienen una tasa de cambio superior al 20 % ( $FC > 1.2$  o  $FC < 0.833$ ), algo que sí sucedía en las regiones cerebrales citadas.







**Tabla 12.** *Compuestos significativos (descritos por su fórmula molecular) encontrados en la corteza prefrontal que están presentes en el plasma según las distintas comparaciones realizadas en base a los diferentes tratamientos (cocaína+alcohol; cocaína sola;salino), tanto para ratas hembra como para ratas macho. Los compuestos resaltados con letra **negrita** son aquellos que coinciden en más de una columna.*

| CORTEZA PREFRONTAL vs PLASMA en HEMBRAS |                                |                    |                                |                     |                                |
|---|--------------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| Comparación CA vs S                     |                                | Comparación C vs S |                                | Comparación CA vs C |                                |
| Compuesto                               | Regulación <sup>a</sup> P (FC) | Compuesto          | Regulación <sup>a</sup> P (FC) | Compuesto           | Regulación <sup>a</sup> P (FC) |
| <b>C5 H4 O4</b>                         | ☐ (1.79)                       | <b>C5 H4 O4</b>    | ☐ (1.15)                       | C5 H11 N3 O2        | ☐ (1.53)                       |
| <b>C4 H5 N3 O</b>                       | ☐ (0.80)                       | C7 H8 N2 O2        | ☐ (0.66)                       | <b>C4 H5 N3 O</b>   | ☐ (1.47)                       |
| C9 H17 N O5                             | ☐ (1.01)                       | C12 H11 N2         | ☐ (☐☐0)                        | C9 H6 O2            | ☐ (0.89)                       |
| CORTEZA PREFRONTAL vs PLASMA en MACHOS  |                                |                    |                                |                     |                                |
| Comparativa CA vs S                     |                                | Comparativa C vs S |                                | Comparativa CA vs C |                                |
| Compuesto                               | Regulación <sup>a</sup> P (FC) | Compuesto          | Regulación <sup>a</sup> P (FC) | Compuesto           | Regulación <sup>a</sup> P (FC) |
| <b>C9 H17 N O5</b>                      | ☐ (0.98)                       | C5 H6 O5           | ☐ (1.04)                       | C2 H5 N7 O3 S       | ☐ (1.10)                       |
| C9 H20 N4 O4                            | ☐ (1.08)                       | <b>C9 H11 N O3</b> | ☐ (1.05)                       | C2 H6 N4 P2 S       | ☐ (☐☐0)                        |
|   |                                |                    |                                | C2 H6 N4 P2 S*      | ☐ (1.31)                       |
|   |                                |                    |                                | C3 H N2 O P3        | ☐ (0.88)                       |
|   |                                |                    |                                | C3 H3 N3 P2         | ☐ (1.06)                       |
|   |                                |                    |                                | C4 H7 N9 O2         | ☐ (0.76)                       |
|   |                                |                    |                                | C7 H6               | ☐ (1.29)                       |
|   |                                |                    |                                | C7 H2 Cl N O3       | ☐ (1.38)                       |
|   |                                |                    |                                | C8 H19 O4 P         | ☐ (☐☐0)                        |
|   |                                |                    |                                | <b>C9 H11 N O3</b>  | ☐ (1.09)                       |
|   |                                |                    |                                | <b>C9 H17 N O5</b>  | ☐ (0.80)                       |
|   |                                |                    |                                | C9 H20 N2 O2        | ☐ (1.17)                       |

\* Compuestos isoméricos

(a) Regulación: ☐ compuesto “sobre-expresado”; ☐ compuesto “infra-expresado o reprimido”; FC, “tasa de cambio”. ☐☐☐☐☐☐ solo se ha detectado el compuesto en el primer grupo que se compara. ☐☐(☐☐0), solo se ha detectado el compuesto en el segundo grupo que se compara.



**Tabla 13.** Compuestos significativos (descritos por su fórmula molecular) encontrados en el cuerpo estriado que están presentes en el plasma según las distintas comparaciones realizadas en base a los diferentes tratamientos (cocaína+alcohol; cocaína sola; salino), tanto para ratas hembra como para ratas macho. Los compuestos resaltados con letra **negrita** son aquellos que coinciden en más de una columna.

| CUERPO ESTRIADO vs PLASMA en HEMBRAS |                                     |                        |                                     |                           |                                     |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| Comparación CA vs S                  |                                     | Comparación C vs S     |                                     | Comparación CA vs C       |                                     |
| Compuesto                            | Regulación <sup>P(a)P</sup><br>(FC) | Compuesto              | Regulación <sup>P(a)P</sup><br>(FC) | Compuesto                 | Regulación <sup>P(a)P</sup><br>(FC) |
| C2 H7 N2<br>O6 P S                   | ☐ (1.27)                            | C3 H5 O11<br>P3        | ☐ (1.04)                            | C4 H6 N2<br>O2            | ☐(☐)(☐)                             |
| C3 H6 N6<br>O2                       | ☐ (0.98)                            | C4 H2 O8<br>S2         | ☐ (1.35)                            | C4 H2 N6<br>O5            | ☐(☐)(☐)                             |
| C3 H5 N2 P<br>S                      | ☐(☐)(☐)                             | <b>C6 H4 O2</b>        | ☐ (1.05)                            | C5 H5 N O<br>S            | ☐(☐)(☐)                             |
| C7 H8 N2 O                           | ☐ (2.33)                            | C6 H4 O2*              | ☐(☐)(☐)                             | C5 H9 N2 P<br>S           | ☐(☐)(☐)                             |
| C10 H24<br>N2 O3                     | ☐ (0.94)                            | <b>C6 H12 O7</b>       | ☐(☐)(☐)                             | <b>C6 H4 O2</b>           | ☐ (1.01)                            |
|                                      |                                     | <b>C6 H9 N O3</b>      | ☐ (0.72)                            | C6 H10 O5                 | ☐ (0.70)                            |
|                                      |                                     | C6 H5 O13<br>P3        | ☐ (1.44)                            | <b>C6 H12 O7</b>          | ☐(☐)(☐)                             |
|                                      |                                     | C7 H6 O2               | ☐ (0.56)                            | <b>C6 H9 N O3</b>         | ☐ (0.66)                            |
|                                      |                                     | C7 H N8<br>O11 P3 S2   | ☐(☐)(☐)                             | C8 H9 N O                 | ☐(☐)(☐)                             |
|                                      |                                     | <b>C9 H11 N<br/>O3</b> | ☐ (1.05)                            | <b>C9 H11 N<br/>O3</b>    | ☐(☐)(☐)                             |
|                                      |                                     | C9 H N6 O8<br>P3 S     | ☐ (1.79)                            |                           |                                     |
| CUERPO ESTRIADO vs PLASMA en MACHOS  |                                     |                        |                                     |                           |                                     |
| Comparación CA vs S                  |                                     | Comparación C vs S     |                                     | Comparación CA vs C       |                                     |
| Compuesto                            | Regulación <sup>P(a)P</sup><br>(FC) | Compuesto              | Regulación <sup>P(a)P</sup><br>(FC) | Compuesto                 | Regulación <sup>P(a)P</sup><br>(FC) |
| C4 H8 N10                            | ☐(☐)(☐)                             | C2 H5 O7 P<br>S        | ☐ (0.99)                            | C2 H7 N2 P<br>S           | ☐ (1.02)                            |
| <b>C4 H6 N2<br/>O2</b>               | ☐(☐)(☐)                             | C3 H9 N2<br>O5 P       | ☐(☐)(☐)                             | C2 H3 N2<br>O3 P          | ☐ (0.54)                            |
| <b>C5 H7 N O3</b>                    | ☐ (1.01)                            | <b>C4 H5 N3 O</b>      | ☐ (1.38)                            | C3 H5 N2 P<br>S           | ☐ (0.94)                            |
| C5 H12 N2<br>O2 S                    | ☐ (0.99)                            | <b>C4 H6 N2<br/>O2</b> | ☐ (0.80)                            | C3 H7 N2 O<br>P S         | ☐ (1.08)                            |
| C7 H6 O2                             | ☐ (1.44)                            | <b>C4 H8 N2<br/>O3</b> | ☐ (1.06)                            | C4 H8 N8                  | ☐ (1.52)                            |
|                                      |                                     | <b>C5 H7 N O3</b>      | ☐ (1.43)                            | <b>C4 H5 N3 O</b>         | ☐ (0.92)                            |
|                                      |                                     | C8 H9 N O              | ☐ (0.86)                            | <b>C4 H8 N2<br/>O3</b>    | ☐ (1.07)                            |
|                                      |                                     | <b>C9 H21 N3<br/>O</b> | ☐ (1.54)                            | C4 H10 N3<br>O4 P         | ☐(☐)(☐)                             |
|                                      |                                     | C12 H23 N<br>O4        | ☐ (0.90)                            | C6 H13 Cl<br>O6           | ☐ (0.77)                            |
|                                      |                                     | C12 H23 N<br>O4*       | ☐ (1.03)                            | C6 H13 Cl<br>O6*          | ☐(☐)(☐)                             |
|                                      |                                     | C20 H28                | ☐ (0.66)                            | C6 H10 N2<br>O9           | ☐ (1.06)                            |
|                                      |                                     |                        |                                     | <b>C9 H21 N3<br/>O</b>    | ☐ (0.64)                            |
|                                      |                                     |                        |                                     | C9 H20 N2<br>O2           | ☐ (1.15)                            |
|                                      |                                     |                        |                                     | C9 H12 N2<br>O6           | ☐ (0.97)                            |
|                                      |                                     |                        |                                     | C9 H9 N10<br>O P S        | ☐ (1.36)                            |
|                                      |                                     |                        |                                     | C10 H21<br>N4 O5 P3<br>S2 | ☐(☐)(☐)                             |

\* Compuestos isoméricos

(a) Regulación: ☐ compuesto "sobre-expresado"; ☐ compuesto "infra-expresado o reprimido"; FC, "tasa de cambio". ☐(☐)(☐) solo se ha detectado el compuesto en el primer grupo que se compara. ☐(☐)(☐), solo se ha detectado el compuesto en el segundo grupo que se compara.



A la vista de los datos recogidos en las Tablas 11-13, consideramos de interés señalar que el importante número de compuestos significativos encontrados en el plasma, en cuanto potenciales biomarcadores, nos permite suponer que los cambios metabólicos que ocurren en el cerebro a consecuencia de la autoadministración conjunta de alcohol y cocaína también pueden darse en el plasma, pudiendo ello ser un reflejo de lo que acontece en el cerebro, lo cual resalta, además, la posible utilidad clínica de los potenciales biomarcadores identificados en el plasma. Como ya se ha apuntado más arriba, no hay que olvidar que las investigaciones que se hagan en el plasma de animales de laboratorio posibilitan una rápida traslación de ese tipo de estudios a otros que podrían hacerse en humanos, al ser este tipo de muestras biológicas más accesibles para poder ser obtenidas de personas, algo que no es tan posible para muestras de tejido cerebral.

#### DISCUSIÓN:

Como hemos indicado anteriormente en el apartado de Justificación del Proyecto y Objetivos, son escasos los trabajos previos en la literatura científica en los que animales de laboratorio se hayan autoadministrado por vía intravenosa conjuntamente cocaína y alcohol. Uno de ellos es el de Ikegami *et al.* (2002), en el que ratas adultas macho se autoadministraron cocaína y alcohol como un procedimiento de preexposición al alcohol, con el objetivo de facilitar que los animales se autoadministraran posteriormente solamente alcohol por vía intravenosa. El otro trabajo es el de Winger *et al.* (2007), en el que estudiaron en monos rhesus (3 machos y 3 hembras) si la autoadministración conjunta de alcohol y otras drogas, como el ácido gamma hidroxibutirato (GHB), el lunitracepán o la cocaína, podría aumentar las propiedades reforzadoras de estas últimas. Todos los monos rhesus empleados en este estudio tenían una historia previa de consumo de otras drogas y no eran experimentalmente puros ("naïves", en inglés). A diferencia de estos dos trabajos, en nuestro proyecto se ha tratado de caracterizar más detalladamente la conducta de autoadministración conjunta de cocaína y alcohol en sí misma, con el fin de describir una metodología conductual que pudiera ser de utilidad para otros estudios biológicos. Con ese propósito, se analizaron las fases de adquisición y de mantenimiento de esta conducta en ratas jóvenes de ambos sexos, no expuestas previamente a ninguna droga de abuso. Se estudió, además, esas mismas fases en la conducta de autoadministración de cocaína sola, a efectos comparativos. Nuestros resultados han mostrado que la presencia conjunta de cocaína y alcohol facilitó un aprendizaje más rápido de la conducta de autoadministración en las hembras, en comparación con los machos. No se encontraron, sin embargo, esas diferencias entre sexos en el caso de que la cocaína fuera la única droga autoadministrada. Estos resultados sugieren que puede haber diferentes sensibilidades entre machos y hembras ante las propiedades reforzadoras de la combinación de ambas drogas. Según nuestros datos, aparentemente las ratas hembra serían más susceptibles a dichas propiedades en la fase inicial de la adquisición de esta conducta. Sin embargo, una vez adquirida la conducta de autoadministración, durante la siguiente fase, la de mantenimiento, no se mantuvieron las diferencias entre hembras y machos de los grupos de cocaína y alcohol. En esta fase de mantenimiento, tampoco



encontramos diferencias entre los animales que se autoadministraron conjuntamente alcohol y cocaína y entre los que se autoadministraron cocaína solamente. No obstante, es claramente significativa la diferencia entre los grupos de autoadministración de drogas y los de suero salino, demostrándose que la combinación de cocaína y alcohol es un estímulo reforzador para los animales de ambos sexos y que la presencia de alcohol no disminuye las propiedades reforzadoras de la cocaína, al menos en roedores de laboratorio y en las condiciones particulares de nuestro estudio. En este sentido, estos resultados no concuerdan con los de Winger *et al.* (2007) en monos rhesus, en los que estos autores indicaron que la autoadministración conjunta de ambas drogas (alcohol: 50, 100 o 200 mg/kg p.v./inyección; cocaína: 0.01 o 0.03 mg/kg p.v./inyección) redujo las propiedades reforzadoras de la cocaína. Es posible, no obstante, que los resultados de nuestro estudio se diferencien de los de esos autores no sólo por la especie animal empleada, sino también por las dosis de cocaína que fueron sensiblemente más bajas en su trabajo (0,01 a 0,03 mg/kg p.v./inyección) que en el nuestro (1 mg/kg p.v./inyección). A este respecto, Ikegami *et al.* (2002) comprobaron que a una concentración constante de alcohol (125 mg/kg p.v./inyección), que es muy similar a la nuestra (133 mg/kg p.v./inyección), cuando iban reduciendo progresivamente la concentración de cocaína desde 0,75 a 0,1 mg/kg p.v./inyección, al llegar a la dosis de 0,40 mg/kg p.v./inyección de cocaína, si comparaban las respuestas de autoadministración conjunta de cocaína y alcohol (125 mg/kg p.v./inyección de etanol más 0,4 mg/kg/inyección de cocaína) y las respuestas de autoadministración de cocaína sola (0,4 mg/kg p.v./inyección), éstas eran menores. Estos datos sugieren que, posiblemente, se requiera de una dosis mínima de cocaína para que sea la dosis de alcohol la fundamental en el mantenimiento de la conducta de autoadministración conjunta de ambas drogas. No debe descartarse, por otra parte, la posible importancia de la formación del metabolito cocaetileno en el mantenimiento de la conducta de autoadministración conjunta de cocaína y etanol. La inhibición por el alcohol de la hidrólisis del grupo éster metílico de la cocaína por parte de las carboxilesterasas, genera una menor producción del metabolito no psicoactivo benzoilecgonina, lo que implica que la cocaína requiera de más tiempo para su metabolización y esté más tiempo en el plasma, y por el otro, estas carboxilesterasas catalizan el paso de la cocaína al cocaetileno (Rafla y Epstein, 1979; Dean, *et al.*, 1992) con sus propios efectos reforzadores que se añaden a los correspondientes de la cocaína y los del alcohol. Es bien conocido que este metabolito es autoadministrado por ratas de laboratorio y es positivo en el modelo del Condicionamiento de la Preferencia de Lugar, lo cual indica que tiene propiedades reforzadoras equiparables a las de la cocaína sola.

En lo que se refiere al análisis de las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos, como hemos expuesto anteriormente en el apartado de Principales Resultados, encontramos diferencias significativas entre sexos en siete de los catorce aminoácidos que estudiamos en este proyecto (por sus siglas en inglés, L-Orn, L-Gln, L-Ala, Gly, L-Tyr, L-Phe y L-Val) siendo, generalmente, los niveles mayores en los machos que en las hembras (con la excepción de L-Gln), independientemente del tratamiento. También hemos encontrado diferencias entre sexos en aminoácidos aromáticos (AAA), en los de cadena ramificada (BCAA) y en la ratio L-Glu/L-Gln. Es de especial interés destacar que las concentraciones de L-Tirosina fueron diferentes estadísticamente en función del tratamiento. En comparación con los animales controles, tanto en el grupo de cocaína sola como en el de cocaína combinada con alcohol, los niveles de ese aminoácido bajaron en machos y en hembras. Se encontraron, además, diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en la ratio L-Tyr/L-Phe y en la ratio BCAA/L-Tyr. Como apuntamos ya en la exposición de estos datos en el apartado de Principales Resultados, sabemos que L-Fenilalanina y L-Tirosina son precursores de las catecolaminas. La Fenilalanina es un aminoácido esencial y su conversión hacia Tirosina es catalizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa. Por su parte, la Tirosina



hidroxilasa (TH) es una enzima que participa en la conversión de la Tirosina a L-Dopa que, como sabemos es la molécula precursora de la dopamina. La hidroxilación de fenilalanina a tirosina, aunque se produce principalmente en el hígado, también se produce en el SNC y en la médula adrenal donde es catalizada por la propia tirosina hidroxilasa (Ikeda, 1965). Se ha descrito que, en consumidores problemáticos de cocaína, la ratio L-Tyr/L-Phe es especialmente baja (Tennant, 1985) y que también está disminuida en la enfermedad de Parkinson (Hirayama, et al., 2016). Estas dos patologías se caracterizan por mostrar niveles bajos de dopamina cerebrales y ello podría ser debido a que los niveles del aminoácido precursor de la dopamina (la Tirosina) estuvieran más bajos en presencia de la cocaína, un hecho que puede ser detectado en el plasma, como hemos comprobado en este estudio y que podría ser de validez como posible indicador de alteraciones en los niveles de dopamina cerebrales. Por su parte, es bien conocido que la ratio BCAA/L-Tyr es un buen indicador del metabolismo hepático, con lo que podría ser también de utilidad como marcador de las posibles alteraciones en la relación entre aminoácidos de cadena ramificada y la Tirosina en consumidores de cocaína y alcohol. Por otro lado, como conocemos, en la síntesis de catecolaminas la TH es la enzima limitante de la velocidad de síntesis de dopamina y, dado que en nuestro estudio hay un claro sexodimorfismo en los niveles bajos de Tirosina en las hembras, se podría considerar que los estrógenos pudieran tener una función en estos resultados. Así, se ha demostrado que los estrógenos regulan la expresión de TH (Ivanova y Beyer, 2003) y que la ovariectomía en roedores adultos (ratones y ratas) reduce el número de células inmunoreactivas a la hidroxilasa de tirosina, pero el reemplazo con un agonista de  $\beta$ -estradiol previene o disminuye la pérdida de células (Johnson *et al.*, 2010). Es preciso señalar también que existen diferencias entre sexos en cuanto a las variables farmacocinéticas que afectan a la metabolización de ambas drogas y que podrían contribuir al sexodimorfismo encontrado, tanto en la conducta como en patrón de aminoácidos. Así, los niveles plasmáticos de metabolitos de la cocaína como ecgonina metil-éster y norcocaína están aumentados en hembras, mientras que los de la benzoilecgonina lo están en machos (Festa, 2004). Respecto al alcohol, el metabolismo de primer paso es superior en hombres, mientras que el volumen de distribución es menor en mujeres (Soldin y Mattison, 2009).

En relación con el análisis de las dos estrategias metabolómicas (no dirigida y dirigida) que hemos hecho en las tres regiones cerebrales (corteza prefrontal, cuerpo estriado e hipocampo) y en el plasma sanguíneo, como ya se ha dicho anteriormente también en el apartado de Principales Resultados, hemos identificado tentativamente 170 compuestos significativos entre los diferentes grupos de animales de nuestro proyecto (esto es, de cocaína más alcohol; de cocaína sola; y de suero salino), empleando una estrategia de análisis no dirigida en muestras de las tres regiones cerebrales ya citadas. Posteriormente, una vez identificados dichos compuestos, aplicamos una estrategia dirigida para analizar el plasma sanguíneo de esos mismos animales y encontramos 111 compuestos significativos. De ellos, el 25% también se habían encontrado en el cuerpo estriado, el 17% en la corteza prefrontal y el 12% en el hipocampo. Este tipo de datos sugieren que los cambios metabólicos que ocurren en el cerebro, a consecuencia de la autoadministración conjunta de alcohol y cocaína, también pueden darse en el plasma sanguíneo, lo cual refleja la posible utilidad clínica de los metabolitos que se identifiquen en este fluido biológico que, en humanos, es más susceptible de poder ser estudiado por su mayor accesibilidad en comparación con las tres regiones cerebrales que venimos citando. De todos los compuestos significativos identificados, ya conocemos que 59 de ellos participan en distintas vías metabólicas como son las de catecolaminas, purinas, pirimidinas, neuropéptidos, ácidos grasos y carboxílicos, lípidos, vitaminas, estrés oxidativo, metabolismo energético, sistemas endocannabinoide y colinérgico, al igual que en las de glutamato y glutamina, arginina,



---

triptófano y de otros aminoácidos.

Que nosotros conozcamos, los resultados del presente estudio son muy novedosos siendo, además, nuestro proyecto el primero que se ha centrado en un modelo animal de policonsumo de dos sustancias, como la cocaína y el alcohol, que son drogas de un consumo muy prevalente en nuestro país y en otros países de nuestro entorno. Los datos que hemos obtenido, basados en experimentos con animales empleando el mejor modelo animal que remeda la drogadicción humana (el de la autoadministración intravenosa de drogas), así como en la aplicación de las metodologías metabólicas más avanzadas sugieren que, en las personas, el policonsumo de cocaína y alcohol podría producir alteraciones en diferentes vías metabólicas que se tradujeran posteriormente en efectos adversos para la salud de los policonsumidores de ambas drogas. Dichos efectos nocivos hacen muy necesario tratar de seguir explorando las interacciones y sinergias que pueden darse entre esas dos sustancias, por lo que consideramos que las aportaciones del presente trabajo y, muy particularmente, la de caracterizar un modelo animal operante, que nos ha permitido abordar el policonsumo de drogas en el laboratorio con la mayor validez ecológica experimental posible, pueden contribuir al desarrollo de otros trabajos futuros que enfoquen sus esfuerzos hacia una mejor comprensión de los mecanismos psicobiológicos últimos que parecen estar interviniendo en este tipo de consumo problemático humano y, en su caso, ayudar a establecer terapias adecuadas.

#### **APLICABILIDAD E IMPACTO SOCIO-SANITARIO DEL PROYECTO:**

Aunque nuestro proyecto es de investigación básica, consideramos que puede tener aplicabilidad a largo plazo. Nosotros hemos trabajado con el modelo animal (el de la autoadministración intravenosa de drogas) que es considerado por la literatura científica como el mejor para imitar a la conducta adictiva humana. Por tanto, nuestro modelo de policonsumo de cocaína y alcohol tiene una alta validez ecológica y, posiblemente, los cambios que hemos descrito relativos a los niveles del aminoácido L-Tirosina en plasma y de otros metabolitos identificados en el plasma y en las tres regiones cerebrales estudiadas, pueden aproximarse bastante a lo que pudiera ocurrir en seres humanos.

Por otro lado, hemos incluido la perspectiva de género desde hace mucho tiempo en nuestros diseños experimentales porque es claro que hay diferencias apreciables en las conductas adictivas de hombres y mujeres. Finalmente, el hecho de que hayamos empleado plasma sanguíneo en nuestro diseño facilita una más pronta traslación de nuestra metodología y resultados metabólicos a otros estudios que puedan hacerse en seres humanos.

Desde una perspectiva puramente formativa, consideramos que también nuestro estudio tiene aplicabilidad e impacto sociosanitario porque nuestros resultados, que se publican en revistas internacionales de prestigio, informan de que el policonsumo de cocaína y alcohol parece afectar a numerosas vías metabólicas en el cerebro y en plasma sanguíneo. Como una consecuencia, ello puede inducir un desequilibrio metabólico que podría participar en la aparición de desarreglos en el sistema nervioso y en trastornos como los adictivos.

#### **SÍNTESIS DE LOS ASPECTOS MÁS RELEVANTES QUE APORTA EL ESTUDIO:**

Este estudio ha tenido como objetivo esencial tratar de contribuir al avance en el conocimiento de los posibles efectos psicobiológicos que el policonsumo de cocaína y alcohol puede producir en las personas. Nuestra investigación es de carácter preclínico y se ha realizado en ratas jóvenes de laboratorio de ambos sexos, que tenían una edad (51-72 días) que se corresponde con la de 21-24 años de seres humanos, porque es en la juventud cuando, habitualmente, se inicia la dependencia de drogas. Para llevar a cabo este trabajo, hemos demostrado que ratas jóvenes de ambos sexos son capaces de autoadministrarse intravenosamente con facilidad una solución única de 1 mg/kg de cocaína más 2 g/kg de alcohol disueltos en suero salino. Consideramos que el establecimiento de este procedimiento de condicionamiento operante es una de las aportaciones principales de nuestro estudio. Hemos comprobado, además, que a esas dosis, los animales mostraban una curva de aprendizaje de la conducta de autoadministración que era similar a la de la cocaína autoadministrada

---



sola, lo cual significa que la presencia de alcohol en la solución de autoadministración no reduce las propiedades reforzadoras positivas de la cocaína. Este hecho es importante porque permite mantener ese policonsumo durante bastante tiempo en los animales, al tiempo posibilita realizar numerosos otros experimentos para caracterizar conductualmente en profundidad dicho policonsumo, así como investigar en sus correlatos neurobiológicos. Como ejemplo de lo que se acaba de decir, nosotros mismos, una vez que desarrollamos ese modelo animal de policonsumo, hemos tratado de averiguar si se producirían cambios en el metaboloma de los animales que se autoadministraron conjuntamente ambas drogas. Del mismo modo, cualesquiera otros investigadores que se basen en nuestro modelo animal pueden estudiar el proceso fisiopatológico que les interese y en el tejido que deseen.

En nuestro diseño incluimos animales machos y hembras porque es sabido que, con frecuencia, los efectos de las drogas de abuso son diferentes en función del sexo. A este respecto, hemos comprobado en nuestro estudio que sí se dan esas diferencias tanto en aspectos conductuales como metabolómicos. De igual modo, en nuestro diseño incluimos el análisis del metaboloma no sólo de regiones cerebrales importantes en el sistema neuronal del reforzamiento (corteza prefrontal, cuerpo estriado e hipocampo), sino también del plasma sanguíneo, por ser éste un tejido de fácil acceso en las personas. Ello posibilita que los resultados que se obtengan de investigaciones hechas con animales en ese fluido biológico puedan tener una pronta traslación a los seres humanos. En este sentido, en nuestro estudio hemos comprobado que un buen número de los metabolitos que se identificaron en las tres regiones cerebrales, también se detectaron en el plasma sanguíneo, lo cual apunta a que, de ocurrir igual en las personas, algunos cambios metabolómicos que se dieran en el plasma, podrían ser indicadores de que también se dan esos cambios en áreas cerebrales relevantes para las conductas adictivas.

#### **ENLACES O REFERENCIAS PARA AMPLIAR INFORMACIÓN ACERCA DEL PROYECTO (en su caso):**

No disponemos de ningún enlace particular que lleve a más información sobre el presente proyecto. Se dispone de un repositorio en nuestra Universidad, pero es para publicaciones científicas y académicas en general, pero no para ampliar información sobre proyectos concretos.

#### **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS GENERADAS (4):**

1. Marcos, A., Moreno, M., Orihuel, J., Ucha, M. Paz, A.M., Higuera-Matas, A., Capellán, R., Crego, A.L., Martínez-Larrañaga, M.R., Ambrosio, E., Anadón, A.(2019). Intravenous self-administration of combined cocaine and ethanol in young adult rats: behavioral study and amino acids profile. PLoS ONE 15(3): e0227044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227044>

*Artículos también han sido financiados, en parte, con fondos del presente Proyecto, dado que hay materiales comunes, como los fungibles, cuyos gastos son difíciles de deslindar:*

2. Fernández-Cabrera MR, Higuera-Matas A, Fernaud-Espinosa I, DeFelipe J, Ambrosio E, Miguéns M. Selective effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on medium spiny neurons in the striatum. PLoS One. 2018 Jul 26;13(7):e0200950. doi: 10.1371/journal.pone.0200950. eCollection 2018. PMID: 30048477

3. Bello-Arroyo E, Roque H, Marcos A, Orihuel J, Higuera-Matas A, Desco M, Caiolfa VR, Ambrosio E, Lara-Pezzi E, Gómez-Gaviro MV. MouBeAT: A New and Open Toolbox for Guided Analysis of Behavioral Tests in Mice. Front Behav Neurosci. 2018 Sep 7;12:201. doi: 0.3389/fnbeh.2018.00201. eCollection 2018. PMID: 30245618





4. Ucha M, Roura-Martínez D, Contreras A, Pinto-Rivero S, Orihuel J, Ambrosio E, Higuera-Matas A. Impulsive Action and Impulsive Choice Are Differentially Associated With Gene Expression Variations of the GABA<sub>A</sub> Receptor Alfa 1 Subunit and the CB<sub>1</sub> Receptor in the Lateral and Medial Orbitofrontal Cortices. *Front Behav Neurosci*. 2019 Feb 20;13:22. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00022. eCollection 2019. PMID:30842730

5. Roura-Martínez D, Ucha M, Orihuel J, Ballesteros-Yáñez I, Castillo CA, Marcos A, Ambrosio E, Higuera-Matas A. Central nucleus of the amygdala as a common substrate of the incubation of drug and natural reinforcer seeking. *Addict Biol*. 2019 Jan 8. doi: 10.1111/adb.12706. [Epub ahead of print] PMID:30623520

6. Ucha M, Coria SM, Núñez AE, Santos-Toscano R, Roura-Martínez D, Fernández-Ruiz J, Higuera-Matas A, Ambrosio E. Morphine self-administration alters the expression of translational machinery genes in the amygdala of male Lewis rats. *J Psychopharmacol*. 2019 Jul;33(7):882-893. doi: 10.1177/0269881119836206. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30887859.

#### **PRESENTACIÓN DE RESULTADOS (CONGRESOS, JORNADAS Y ACTIVIDADES DE DISEMINACIÓN CIENTÍFICA Y TÉCNICA):**

1. Marcos, A., Moreno-Fernández, M., de Paz, A.M., Orihuel, J., Capellán, R., Ucha, M., Roura, D., Higuera-Matas, A., Anadón, A., Ambrosio, E. (2019). Combined cocaine and alcohol intravenous self-administration in young-adult rats: a metabolomics approach. 3rd International Meeting of Spanish Psychobiology Society. Granada (Spain), May 29-31, 2019.

2. Marcos, A., Orihuel, J., Roura, D., Ucha, M., Capellán, R., Higuera-Matas, A., Anadón, A., Ambrosio, E. (2017). Combined cocaine and alcohol administration alters plasma amino acid levels in male and female rats. 6th International Drug Abuse Research Society (IDARS) Meeting. Dubrovnik, Croatia, September 4-8, 2017.

3. Marcos, A., Sánchez-López, E., Orihuel, J., Roura, D., Ucha, M., Capellán, R., Higuera-Matas, A., Crego, A.L., Ambrosio, E., Anadón, A. (2017). Influencia de la edad y el género sobre el patrón plasmático de aminoácidos y derivados de aminoácidos tras la administración crónica de cocaína y/o alcohol. 26ava Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid (FARMADRID 26). Universidad Rey Juan Carlos I, 29 de Junio de 2017.

4. Marcos, A., Pastor-Pardo, H., Capellán, R., Orihuel, R., Higuera-Matas, A., Ambrosio, E. (2017). Simultaneous cocaine and alcohol intravenous self-administration in young-adult rats. II Congreso Internacional de Psicobiología. Ávila, 19-21 de Julio de 2017.

Comunicaciones en Congresos que también han sido financiados, en parte, con fondos del presente Proyecto, dado que hay materiales comunes, como los fungibles, cuyos gastos son difíciles de deslindar:

5. Roberto Capellán, Javier Orihuel, Marta Oteo Vives, Marta Ibáñez Moragues, Natalia Magro Calvo, Miguel Ángel Morcillo Alonso, Marta Casquero-Veiga, María Luisa Soto-Montenegro, Marcos Ucha, Emilio Ambrosio and Alejandro Higuera-Matas (2018). Behavioural, metabolic and structural disturbances involved in the comorbidity between cocaine addiction and schizophrenia. 11th Forum of FENS (Federation of European Neuroscience Societies). Berlin (Germany), 7-11 July 2018.

6. J. Orihuel, R. Capellán, M. Ucha, D. Roura-Martínez, E. Ambrosio and A. Higuera-Matas (2018). The lingering marks of chronic adolescent  $\delta$ 9-tetrahydrocannabinol exposure: complex effects on addiction-related traits and parallel psychological, neuroimaging and transcriptomic alterations. 11th Forum of FENS (Federation of European Neuroscience Societies). Berlin (Germany), 7-11 July 2018.



7. L. Blazquez-Llorca, M. Miguéns, M. Montero-Crespo, A. Selvas, J. DeFelipe and E. Ambrosio (2018). Cocaine self-administration enhances hippocampal synapses size in Lewis rats. 11th Forum of FENS (Federation of European Neuroscience Societies). Berlin (Germany), 7-11 July 2018.

8. David Roura-Martínez, Alberto Marcos, Javier Orihuel, Roberto Capellán, Emilio Ambrosio, Alejandro Higuera-Matas (2018). Aminas plasmáticas y cerebrales como biomarcadores de la incubación del seeking. 27<sup>ava</sup> Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid ( FARMADRID27). Madrid, 26 de Junio de 2018.

9. J. Orihuel, R. Capellán, M. Ucha, D. Roura-Martínez, E. Ambrosio y A. Higuera-Matas (2018). Alteraciones en rasgos relacionados con la adicción tras la exposición crónica de  $\delta$ 9-tetrahidrocannabinol en la adolescencia: estudios transcriptómicos y neuroimagen. 27<sup>ava</sup> Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid ( FARMADRID27). Madrid, 26 de Junio de 2018.

10. Roberto Capellán, Javier Orihuel, Marta Oteo Vives, Marta Ibáñez Moragues, Natalia Magro Calvo, Miguel Ángel Morcillo Alonso, Marta Casquero-Veiga, María Luisa Soto-Montenegro, Marcos Ucha, Emilio Ambrosio y Alejandro Higuera-Matas (2018). Alteraciones conductuales, metabólicas y estructurales implicadas en la comorbilidad entre esquizofrenia y adicción a cocaína. 27<sup>ava</sup> Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid ( FARMADRID27). Madrid, 26 de Junio de 2018.

11. L. Blazquez-Llorca, M. Miguéns, M. Montero-Crespo, A. Selvas, J. DeFelipe, E. Ambrosio (2018). La autoadministración de cocaína aumenta el tamaño de las sinapsis en el hipocampo de ratas Lewis. 27<sup>ava</sup> Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid ( FARMADRID27). Madrid, 26 de Junio de 2018.

12. Assis, M.A., Ucha, M., Ferrado, R., Carranza, P., y Ambrosio, E. (2019). La autoadministración de cocaína modula diferencialmente los niveles de células inmunes en animales Lewis y Fischer 344. 1st International Meeting of Spanish Socidrogalcohol Society/ XLVI Jornadas Nacionales de Socidrogalcohol. Málaga ( Spain), March 7-9, 2019.

13. Assis, M.A., Díaz, D., Ferrado, R., Orihuel, J., Capellán-Martín, R., Weruaga, E. y Ambrosio, E. (2019). El trasplante de médula ósea modifica la recaída a la cocaína entre ratas de distintas estirpes. 1st International Meeting of Spanish Socidrogalcohol Society/ XLVI Jornadas Nacionales de Socidrogalcohol. Málaga ( Spain), March 7-9, 2019.

14. J. Orihuel, R. Capellán, M. Ucha, D. Roura-Martínez, E. Ambrosio, A. Higuera-Matas. (2019). Behavioural, transcriptomic and structural changes in adult rats after an adolescent chronic treatment with  $\Delta^9$  tetrahydrocannabinol. 3rd International Meeting of Spanish Psychobiology Society. Granada (Spain), May 29-31, 2019.

15. Marcos, A. , Orihuel, J. , Roura- Martínez, D. , Ucha, M., Capellán, R., Higuera- Matas, A. , Ambrosio, E. y Anadón, A. (2018). Big- data, metabolómica y drogas de abuso. 6<sup>a</sup> edición del Laboratorio de Ideas. Reunión conjunta del CIBERSAM y Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud ( RETICS). Centro de Congresos de San Fernando (Cádiz), 31 de Mayo y 1 de junio de 2018.

#### **PATENTES Y MODELOS DE UTILIDAD (en su caso) :**

Al establecer el modelo animal de autoadministración intravenosa en ratas jóvenes de ambos sexos y, al tener ellos un pequeño tamaño por su edad, tuvimos que diseñar un sistema especial de conexiones de los catéteres implantados con el sistema que conectaba con la bomba que dispensaba las drogas. Ese sistema ha constituido un Modelo de Utilidad que la OTRI de nuestra Universidad está tramitando



---

para ser patentado con el nombre de "*Procedimiento de conexión de los catéteres implantados a los animales que se autoadministran intravenosamente drogas de abuso*".

#### **BIBLIOGRAFÍA (4):**

Dean, R. A., Christian, C. D., Sample, R. H. B., Bosron, W. F. (1992). Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine. *ASEB J.*, 5, 2735-2739.

Festa, E. D., Russo, S. J., Gazi, F. M., Niyomchai, T., Kemen, L. M., Lin, S. N., ... & Quinones-Jenab, V. (2004). Sex differences in cocaine-induced behavioral responses, pharmacokinetics, and monoamine levels. *Neuropharmacology*, 46(5), 672-687.

Hirayama M, Tsunoda M, Yamamoto M, Tsudad T, Ohnoe K (2016). Serum Tyrosine-to-Phenylalanine Ratio is Low in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* 6:423-431. DOI 10.3233/JPD-150736.

Ikeda, M., Levitt, M. & Udenfriend, S. (1965). Hydroxylation of phenylalanine by purified preparations of adrenal and brain tyrosine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun*, 18, 482-488.

Ikegami, A., Olsen, C.M., Fleming, S.M., Guerra, E.E., Bittner, M.A., Wagner, J., Duvauchelle, C.L. (2002). Intravenous ethanol/cocaine self-administration initiates high intake of intravenous ethanol alone. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 72, 787-794.

Ivanova, T., Beyer, C. (2003). Estrogen regulates tyrosine hydroxylase expression in the neonate mouse midbrain. *J Neurobiol*, 54, 638-647.

Johnson, M.L., Ho, C.C., Day, A.E., Walker, Q.D., Francis, R., Kuhn, C.M. (2010). Oestrogen Receptors Enhance Dopamine Neurone Survival in Rat Midbrain. *J Neuroendocrinol*, 22, 226-237.

Rafla, F.K. & Epstein, R.L. (1979). Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol. *J Anal Toxicol*, 3, 59-63.

Shimmura C, Suda S, Tsuchiya KJ, Hashimoto K, Ohno K, Matsuzaki H, Iwata K, Matsumoto K, Wakuda T, Kamenoy Y, Suzuki K, Tsujii M, Nakamura K, Takei N, Mori N. (2011). Alteration of plasma glutamate and glutamine levels in children with high-functioning autism. *PloS One*, 6(10), e25340. Epub 2011 Oct 5.

Sánchez-López, E., Marcos, A., Ambrosio, E., Maiboroda, O.A., Marina, M.L., Crego, A.L. (2017). Investigation on the combined effect of cocaine and ethanol administration through a liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 140, 313-321. doi: 10.1016/j.jpba.2017.03.061.

Soldin, O.P., Mattison, D.R. (2009). Sex Differences in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet*, 48(3), 143-157.

Tennant, F.S. Jr. (1985). Effect of Cocaine Dependence on Plasma Phenylalanine and Tyrosine Levels and Urinary MHPG Excretion. *Am J Psychiatry*, 142, 1200-1201.

Winger, G., Galuska, C.M., Hursh, S.R. (2007). Modification of ethanol's reinforcing effectiveness in rhesus monkeys by cocaine, flunitrazepam, or gamma-hydroxybutyrate. *Psychopharmacology*, 193, 587-598.

Zavala, M., Castejón, H.V., Ortega, Castejón, O.J., Marcano de Hidalgo, A., Montiel, N. (2001). Desequilibrio de aminoácidos plasmáticos en pacientes autistas y en sujetos con trastorno de déficit de atención o hiperactividad. *Revista de Neurología*, 33, 401-407.



---

**COFINANCIACIÓN (APARTE DE LA DELEGACIÓN DEL GOBIERNO PARA EL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS), en su caso:**

No se ha dispuesto de fondos provenientes de otras instituciones para financiar el presente proyecto.

**AGRADECIMIENTOS:**

Se agradece a la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas la financiación del presente proyecto de investigación, con Número de Referencia 2016I073, que es lo que ha hecho posible que nuestro estudio haya podido realizarse.

También se agradece a la Red de Trastornos Adictivos (RTA), financiada por el Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social a través del Instituto de Salud Carlos III, el contrato predoctoral que uno de los miembros del equipo investigador de este proyecto, D. Javier Orihuel Menéndez, ha disfrutado a través de la ayuda del nodo de la UNED asignada a nuestro grupo de investigación con Número de Expediente RTA2016/0017/0022.

Igualmente, se agradece a la Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED) que haya proporcionado y mantenido las instalaciones, el Animalario y los laboratorios en los que se ha podido desarrollar el presente proyecto de investigación, así como a la Universidad de Alcalá de Henares (representada en el equipo investigador por, principalmente, el Prof. Dr. D. Antonio L. Crego Navazo) y a la Universidad Complutense de Madrid (representada en el equipo investigador por el Prof. Dr. D. José Luis Luque García) por ser las instituciones con las que hemos colaborado para llevar a buen puerto nuestros experimentos metabolómicos.

**CONTACTO (dirección de correo electrónico para consultas al equipo de investigación):**

Para todo tipo de consultas en relación con el presente proyecto de investigación, se ruega ponerse en contacto con el Investigador Principal y Catedrático de Psicobiología de la UNED, Prof. Dr. D. Emilio Ambrosio Flores, a través del siguiente correo electrónico:

[eambrosio@psi.uned.es](mailto:eambrosio@psi.uned.es)

---

**NOTAS:**

(1): Este resumen está dirigido a dar a conocer los aspectos sustanciales de los proyectos financiados por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas tanto a la población general como a profesionales, a través de su publicación en la página web del Ministerio de Sanidad. Procure ser conciso en las exposiciones. Incluya las gráficas y tablas que considere oportunas. En el caso de precisar otro tipo de información (audiovisuales, archivos de datos, etc.), consulte con el órgano instructor para valorar procedimiento de difusión.

(2): Máximo 500 palabras.

(3): Utilice como fuente el Medical Subjects Headings, MeSH, del Index Medicus.



MINISTERIO  
DE SANIDAD

DELEGACIÓN DEL GOBIERNO PARA  
EL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE  
COORDINACIÓN DE PROGRAMAS

(4) Se recomienda seguir los Requisitos de Uniformidad del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas conforme a las normas de la US National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/?amp=&depth=2>).