



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD  2ª ANUALIDAD  3ª ANUALIDAD  FINAL

Nº Expediente: 2012|011

**Investigador principal:** GARCÍA FUSTER, María Julia

**Otros investigadores:** Jesús A. García Sevilla, María Álvaro Bartolomé, Benjamin Keller

**Título del Proyecto:** Complicaciones derivadas del consumo de cocaína durante la adolescencia: Comorbilidad psiquiátrica en el adulto.

**Título del Proyecto Coordinador en el que se integra (sólo en caso de ser un subproyecto):**

**Organismo:** Universidad de las Islas Baleares

**Centro:** Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS)

**Departamento:** Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS)

**Área temática:** Biomedicina / Medicina Clínica y Epidemiología

**Palabras clave:** adolescencia, consecuencias, adicción, cocaína, modelos animales, neuroplasticidad

**RESUMEN: (objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2000 palabras).**

El objetivo global de este proyecto era investigar, utilizando el modelo de rata adolescente, las consecuencias conductuales y adaptaciones neuronales derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína a nivel de los índices de adicción y comorbilidad psiquiátrica (síntomatología depresiva) desarrollados en la rata adulta. La literatura científica sugiere que cuanto más temprano es el inicio en el consumo de drogas más probable es la progresión hacia el abuso y la adicción. El desarrollo de una conducta adictiva es consecuencia de una interacción entre la genética, el ambiente y la psicopatología de cada individuo. Además, el consumo de drogas en general y de la cocaína en particular puede originar, además de la adicción, otras patologías asociadas, como son los trastornos depresivos. Es lo que se conoce como comorbilidad psiquiátrica inducida por el consumo de cocaína, ya que la aparición del trastorno depresivo es consecuencia de la adicción. Por tanto, este proyecto ha evaluado las consecuencias que el inicio temprano del consumo de cocaína durante la adolescencia tiene en la etapa adulta a nivel conductual (índice adictivo, trastorno depresivo en modelo animal), así como a nivel de las posibles neuroadaptaciones inducidas en el hipocampo (ej., neurogénesis, FADD y proteínas asociadas, así como marcadores epigenéticos) que participen en mediar la conducta observada. Finalmente, se pretendía investigar si un tratamiento antidepresivo entre la fase adolescente y la fase adulta era capaz de mejorar la sintomatología del trastorno depresivo, y como consecuencia mejorar los índices de adicción derivados del inicio temprano en el consumo de cocaína. Los datos obtenidos aportan nueva información sobre las consecuencias derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína en los índices de adicción así como en la manifestación de comorbilidad psiquiátrica en la rata adulta.

La hipótesis de partida de este proyecto se postuló gracias a resultados preliminares obtenidos en el laboratorio que permitieron identificar una ventana de especial vulnerabilidad durante la adolescencia temprana (entre los días postnatales, PND 33-39) donde un régimen que induce sensibilización a cocaína conlleva a un incremento de la proteína pro-apoptótica FADD en hipocampo y a una disminución del cociente p-FADD/FADD, considerado como una medida de neuroplasticidad 24 h después de la última dosis (PND 40). Estos datos se presentaron en la reunión científica de la RETICS-Red de Trastornos Adictivos (RTA, RD12/0028/0011) (García-Fuster MJ, Keller B: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescence vulnerability. *Reunión Científica de la Red de Trastornos Adictivos*. Póster y comunicación oral CO-18. Oviedo, 24-25 de Septiembre 2013). Además, estos experimentos iniciales también estudiaron los efectos de la administración de cocaína a otras edades posteriores durante el período adolescente (PND 39-46, PND 47-54) sin encontrarse cambios significativos como los descritos en el etapa más temprana (PND 33-39) (véase García-Cabrerizo R, Keller B, García-Fuster MJ: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience* 304:302-315, 2015), así como se estudiaron otros marcadores moleculares (ej, papel de los receptores cannabinoides, véase García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ:



Opposite regulation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during early adolescence. *Neuroscience Letters* 615: 60-65, 2016). Por tanto, los resultados más interesantes demuestran que FADD está incrementado durante la adolescencia temprana y tras administración de cocaína. Un incremento de la forma pro-apoptótica FADD junto con una disminución del cociente neuroplástico p-FADD/FADD sugiere la inducción de cierto grado de neurotoxicidad y/o la disminución de la supervivencia celular en el hipocampo causada por la administración crónica de cocaína. Por tanto, para abordar los objetivos descritos en el Proyecto, se escogió este período durante la adolescencia temprana (PND 33-39) como el más vulnerable a la exposición de cocaína para evaluar las consecuencias a largo plazo a nivel conductual (ej., índices de adicción, comorbilidad psiquiátrica) y bioquímico (ej., posible inducción de neurotoxicidad mediada por una disminución en la neurogénesis y/o supervivencia celular) en la rata adulta.

Para abordar el estudio de las consecuencias de la administración de un paradigma de administración de cocaína crónica durante la adolescencia (ventana de vulnerabilidad: PND 33-39) a nivel del posterior desarrollo de una adicción a cocaína en la rata adulta, la I.P. del proyecto ha realizado varias estancias en el Instituto de Neurociencias (Molecular & Behavioral Neuroscience Institute) de la Universidad de Michigan (Ann Arbor, EE.UU) en colaboración con las Drs. Huda Akil y Shelly B. Flagel (marzo-junio de 2013, julio-agosto de 2014 y octubre-noviembre de 2015). La vulnerabilidad individual al desarrollo de una adicción se puede estudiar en animales de experimentación mediante la caracterización inicial de su actividad motora en un nuevo ambiente, estableciéndose dos tipologías de ratas, las denominadas HR (high-responders, alta actividad) y las LR (low-responders, baja actividad). Los animales HR desarrollan una mayor sensibilización conductual así como una más rápida autoadministración de la droga en comparación con los LR. La Dra. Huda Akil lleva generando una colonia de ratas HR y LR por más de 43 generaciones. La colaboración, por tanto, se ha centrado en estudiar las consecuencias neurobiológicas (regulación del destino celular, cambios epigenéticos) derivadas de la experiencia adolescente (ventana de vulnerabilidad PND 33-39) y sus implicaciones para la adicción a cocaína en la rata adulta mediante la utilización de esta colonia HR-LR con diferente vulnerabilidad inicial a la adicción. Los resultados más interesantes de esta colaboración muestran como las ratas LR (ie, resistentes a desarrollar una adicción) incrementan sus índices adictivos en la edad adulta tras la administración repetida de cocaína durante la adolescencia (PND 33-39). Los índices adictivos se estudiaron a dos niveles. El primer nivel se centró en estudiar cómo la exposición a cocaína en la adolescencia (PND 33-39) afectaba a la respuesta conductual en la rata LR adulta (generación 38) de un paradigma condicionante de Pavlov (14 sesiones, PND 62-75) donde se asociaba un estímulo condicionado (palanca en caja operante) con un estímulo incondicionado (recompensa de un pellet de comida). Ante dicho test conductual, algunas ratas desarrollan una respuesta preferente hacia el estímulo incondicionado ("sign-trackers", ST) y otras hacia el estímulo condicionado ("goal-trackers", GT). Las ratas LR criadas en el MBNI muestran todas una respuesta GT con un 95-100% de probabilidad. La exposición a cocaína en la adolescencia incrementó esta predisposición a GT a la vez que disminuyó los índices de proliferación y supervivencia celular en el hipocampo de rata adulta (PND 77). Estos resultados demuestran la existencia de complicaciones (a nivel conductual y de neurotoxicidad hipocámpal) derivadas del consumo de cocaína durante la adolescencia en la rata adulta. Los datos derivados de este diseño experimental están actualmente en vías de publicación: García-Fuster MJ, Parsegian A, Watson SJ, Akil H, Flagel SB: Adolescent cocaine exposure enhances goal-tracking behavior and impairs hippocampal cell genesis in adult bred rats typically resilient to addiction. *Under Revision* (March 2016). Además, estos resultados se presentaron en dos comunicaciones científicas: (1) García-Fuster MJ, Parsegian A, Blandino P, Akil H, Flagel SB: Alterations in the propensity to sign- and goal-track and neurobiological correlates in selectively bred rats exposed to cocaine during adolescence. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. San Diego, November 2013; y (2) García-Fuster MJ, Parsegian A, Flagel SB, Akil H: Adolescent cocaine exposure alters the propensity to sign- and goal-track in selectively bred rats. *Reunión Científica de la Red de Trastornos Adictivos*. Póster. Granada, septiembre 2015. Por otro lado, el segundo diseño experimental utilizó ratas HR-LR de la generación 43. El tratamiento crónico con cocaína durante la adolescencia (PND 33-39) indujo sensibilización motora en las ratas adolescentes HR (como se había mostrado ya para la rata adulta), pero no en las LRs. Sin embargo y de manera interesante, la administración previa de cocaína crónica durante la adolescencia incrementó la respuesta motora a cocaína en las ratas LR adultas hasta niveles de las ratas HR. Estos datos sugieren que en un fenotipo menos vulnerable a desarrollar una adicción a cocaína (LR), la exposición a la droga durante la adolescencia altera la posterior respuesta conductual en la rata adulta, induciendo una mayor sensibilización a cocaína. Además, los resultados moleculares mostraron que la exposición a cocaína durante la adolescencia indujo cambios a largo plazo en la expresión de ciertos marcadores epigenéticos (H3K9me3 y acH3K9) de manera específica para cada fenotipo y en ciertas regiones cerebrales (NAc core vs. shell, HC dorsal vs. ventral) relevantes para el desarrollo de una adicción. Estos resultados se han presentado en dos comunicaciones científicas: (1) Parsegian A, García-Fuster MJ, Chaudry S, Blandino P, Flagel SB, Akil H: Adolescent cocaine exposure alters acetylation and tri-methylation on histone 3 lysine 9 in the hippocampus and nucleus accumbens exclusively in selectively bred rats that are typically resilient to addiction. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Washington DC, November 2014, y (2) Parsegian A, García-Fuster MJ, Blandino P, Watson SJ, Flagel SB, Akil H: Adolescent cocaine experience differentially augments adult sensitization and alters nucleus accumbens epigenetic profiles in selectively bred rats that differ in addiction liability. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Chicago, November 2015. Los datos derivados de esta colaboración se publicarán en un artículo científico, actualmente en vías de preparación: Parsegian A, García-Fuster MJ, Blandino P, Watson SJ, Flagel SB, Akil H: Adolescent cocaine experience differentially augments cocaine sensitization and alters nucleus accumbens epigenetic profiles in selectively bred rats that differ in addiction liability (manuscrito, *In Preparation*).

Para abordar el estudio de las consecuencias de la administración de un paradigma de administración de cocaína



crónica durante la adolescencia (ventana de vulnerabilidad: PND 33-39) a nivel del posterior desarrollo de una comorbilidad psiquiátrica (ej., sintomatología depresiva) en la rata adulta se realizaron dos experimentos. En el primer experimento las ratas que se trataron con cocaína crónica (15 mg/kg, i.p., 7 días) de manera temprana durante la adolescencia (PND 33-39) y mostraron una tendencia no significativa a presentar cierta sintomatología depresiva (desespero conductual: mayor tendencia a la inactividad o inmovilidad en el test de natación forzada) en la rata adulta. Sin embargo, un segundo tratamiento con cocaína más prolongado (15 mg/kg, i.p., 14 días) durante la adolescencia (PND 33-46) no mostró de manera significativa la sintomatología depresiva esperada en la rata adulta, sugiriendo que la administración crónica de cocaína durante la adolescencia no conlleva a una posterior sintomatología del trastorno depresivo medido con el test de natación forzada (desespero conductual) en rata adulta. A pesar de no haber encontrado cambios claros a nivel conductual, se han estudiado las adaptaciones neuronales derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína (7 y 14 días) en el hipocampo (neurogénesis, marcadores celulares), así como en la corteza prefrontal y el estriado. Parte de estos resultados se han publicado en un artículo científico: García-Cabrerizo R, Keller B, García-Fuster MJ: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience* 304:302-315, 2015. Además, estos estudios han generado dos comunicaciones científicas: (1) García-Fuster MJ, Keller B: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during early adolescence: Implications for depression-like behavior in adulthood. *European College of Neuropsychopharmacology Annual Meeting*. Berlin, October 2014; y (2) García-Fuster MJ, García-Cabrerizo R, Keller B: Cocaine impairs cell genesis during adolescence: Implications for depression-like behavior in adulthood. *Presentación oral en el congreso de Patología Dual*. Barcelona, Abril 2015.

Los resultados alcanzados derivados de este Proyecto de Investigación sugieren que el inicio temprano en el consumo de cocaína durante la adolescencia (ventana de vulnerabilidad adolescente, PND 33-39) parece jugar un papel más importante en el desarrollo de una posible adicción en la rata adulta que en la manifestación de una comorbilidad psiquiátrica (sintomatología depresiva: desespero conductual).

**ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN:** Se adjuntará una separata de cada uno de ellos y se remitirá una copia en formato digital a [pndinvestigacion@msssi.es](mailto:pndinvestigacion@msssi.es) para el fondo documental de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.

La convocatoria regula en su artículo décimo, punto 3 que la producción científica derivada del proyecto financiado debe ser comunicada a la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas y en cualquier tipo de publicación a que dé lugar, incluso páginas web, **se hará constar expresamente, de forma visible y preferencial que el proyecto se ha realizado con financiación de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.**

De momento los datos obtenidos han producido los siguientes artículos directamente derivados del proyecto (o complementarios y necesarios para algunos de sus diseños experimentales) con mención explícita de financiación del Proyecto 2012/011, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad):

**Artículos publicados en revistas internacionales de revisión por pares:**

1. García-Cabrerizo R, Keller B, García-Fuster MJ: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience* 304: 302-315 (2015).
2. García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ: Opposite regulation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during early adolescence. *Neuroscience Letters* 615: 60-65 (2016).
3. García-Fuster MJ, García-Sevilla JA: Monoamine receptor agonists, acting preferentially at presynaptic autoreceptors and heteroreceptors, downregulate the cell fate adaptor FADD in rat brain cortex. *Neuropharmacology* 89: 204-214 (2015).

Este artículo científico financiado en parte por esta acción caracteriza, junto con otro manuscrito en fase de revisión (véase más adelante), la modulación monoaminérgica y de fármacos antidepresivos de FADD y p-FADD en relación al posible papel de estos marcadores en la sintomatología depresiva.

4. García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ: Chronic MDMA induces neurochemical changes in the hippocampus of adolescent and young adult rats: Down-regulation of apoptotic markers. *NeuroToxicology* 49: 104-113 (2015).

Este artículo científico financiado en parte por esta acción (ej, utilización del criostato financiado por este Proyecto) estudia los efectos de otra droga psicoestimulante, el MDMA, en inducir efectos neurotóxicos en el cerebro de rata adolescente y adulta.



**Artículos en vías de publicación y/o preparación:**

1. García-Fuster MJ, Parsegian A, Watson SJ, Akil H, Flagel SB: Adolescent cocaine exposure enhances goal-tracking behavior and impairs hippocampal cell genesis in adult bred rats typically resilient to addiction. *Under Revision* (March 2016).
2. Parsegian A, García-Fuster MJ, Blandino P, Watson SJ, Flagel SB, Akil H: Adolescent cocaine experience differentially augments cocaine sensitization and alters nucleus accumbens epigenetic profiles in selectively bred rats that differ in addiction liability. *In Preparation*.
3. García-Fuster MJ, García-Sevilla JA: Effects of antidepressant treatments on FADD and p-FADD protein in rat brain cortex: Enhanced neuroprotective p-FADD/FADD ratio after chronic desipramine and fluoxetine administration. *Under Revision* (February, 2016).
4. García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ: Comparative effects of MDMA, methamphetamine and d-amphetamine on hippocampal cell genesis in adolescent and young adult rats. *In Preparation*.

**Capítulo de libro publicado:**

1. García-Fuster MJ, Álvaro-Bartolomé M, García-Sevilla JA: The Fas receptor/Fas-associated protein and cocaine. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse*. Volume 2, Chapter 6. Editor: Dr. Victor R. Preedy. Academic Press (Elsevier) (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800212-4.000006-6>

**Comunicaciones científicas presentadas en congresos o reuniones científicas:**

1. García-Fuster MJ, Keller B: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescence vulnerability. *Reunión Científica de la Red de Trastornos Adictivos*. Presentación de póster y comunicación oral CO-18. Oviedo, 24-25 de Septiembre de 2013.
2. García-Fuster MJ, Parsegian A, Blandino P, Akil H, Flagel SB: Alterations in the propensity to sing- and goal-track and neurobiological correlates in selectively bred rats exposed to cocaine during adolescence. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Control number: 2013-S-7610-SfN. San Diego, 9-13 de Noviembre de 2013.
3. García-Fuster MJ, Keller B: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during early adolescence: Implications for depression-like behavior in adulthood. *European Neuropsychopharmacology* 24 (Suppl. 2): S679. Berlín, Germany, 18-21 October 2014.
4. García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ: Acute and chronic effects of MDMA on hippocampal cell fate markers in adolescent and adult rats. *European Neuropsychopharmacology* 24 (Suppl. 2): S682. Berlín, Germany, 18-21 October 2014.
5. Parsegian A, García-Fuster MJ, Chaudry S, Blandino P, Flagel SB, Akil H: Adolescent cocaine exposure alters acetylation and tri-methylation on histone 3 lysine 9 in the hippocampus and nucleus accumbens exclusively in selectively bred rats that are typically resilient to addiction. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Control number: 2014-S-4389-SfN. Washington DC, November 2014.
6. García-Fuster MJ, García-Cabrerizo R, Keller B: Cocaine impairs cell genesis during adolescence: Implications for depression-like behavior in adulthood. *IV International Congress of Dual Disorders*. Oral communication to be presented in Barcelona, Spain, 17-20 April 2015.
7. García-Fuster MJ, Parsegian A, Flagel SB, Akil H: Adolescent cocaine exposure alters the propensity to sign- and goal-track in selectively bred rats. *Reunión Científica de la Red de Trastornos Adictivos*. Póster. Granada, septiembre 2015.
8. Keller B, Álvaro-Bartolomé M, García-Fuster MJ, La Harpe R, Callado LF, Meana JJ, García-Sevilla JA: I1-imidazoline receptor protein is reduced in the prefrontal cortex of cocaine addicts. *Reunión Científica de la Red de Trastornos Adictivos*. Póster. Granada, septiembre 2015.
9. García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ: Comparative effects of MDMA and methamphetamine on hippocampal cell genesis in adolescent and young adult rats. *Sociedad Española de Neurociencias (SENC)*, Granada, September 2015.
10. Keller B, Álvaro-Bartolomé M, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA: Reduced I1-imidazoline receptor content in postmortem prefrontal cortex of cocaine addicts. *Sociedad Española de Neurociencias (SENC)*, Granada, September 2015.
11. García-Fuster MJ, García-Cabrerizo R: Opposite regulation of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the prefrontal cortex of rats treated with cocaine during early adolescence: Effects in adulthood. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Chicago, November 2015.
12. Parsegian A, García-Fuster MJ, Blandino P, Watson SJ, Flagel SB, Akil H: Adolescent cocaine experience differentially augments adult sensitization and alters nucleus accumbens epigenetic profiles in selectively bred rats that differ in addiction liability. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Chicago, November 2015.



13. García-Cabrerizo R, García-Fuster MJ: Prolonged methamphetamine withdrawal elicits voluntary drug consumption associated with enhanced negative affect. *The 10th FENS Forum of Neuroscience*. Abstract: FENS-0684. Copenhagen, Denmark, July 2016.

### OBJETIVOS

#### PLANTEADOS: (Transcribir los del proyecto original)

Como hipótesis general en el proyecto original se postuló que el inicio en el consumo de cocaína durante la adolescencia podría jugar un papel en las consecuencias posteriores en el adulto, tanto a nivel del desarrollo de una adicción a la cocaína como a su comorbilidad psiquiátrica con un trastorno depresivo (modelos animales).

Los objetivos específicos planteados en el proyecto fueron:

Como objetivo global se pretendía investigar, utilizando el modelo de rata adolescente, las consecuencias conductuales y adaptaciones neuronales (ej., neurogénesis en hipocampo, FADD y proteínas asociadas) derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína a nivel de los índices de adicción y comorbilidad psiquiátrica desarrollados en la rata adulta.

1. Estudiar las consecuencias de la administración de un paradigma de administración de cocaína crónica durante la adolescencia temprana a nivel del posterior desarrollo de una adicción a cocaína en rata adulta.
2. Estudiar las consecuencias de la administración de un paradigma de administración de cocaína crónica durante la adolescencia temprana a nivel del posterior desarrollo de una comorbilidad psiquiátrica (ej., trastorno depresivo) en rata adulta.
3. Estudiar los efectos del tratamiento antidepresivo entre la fase adolescente y la fase adulta sobre las consecuencias conductuales (ej., índices de adicción, comorbilidad psiquiátrica) y adaptaciones neuronales derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína.

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

Durante el desarrollo del Proyecto se han alcanzado los siguientes objetivos:

1. Estudiar las consecuencias de la administración de un paradigma de administración de cocaína crónica durante la adolescencia temprana a nivel del posterior desarrollo de una adicción a cocaína en rata adulta.

Para abordar el estudio de las consecuencias de la administración de un paradigma de administración de cocaína crónica durante la adolescencia (ventana de vulnerabilidad: PND 33-39) a nivel del posterior desarrollo de una adicción a cocaína en la rata adulta, la I.P. del proyecto ha realizado varias estancias en el Instituto de Neurociencias (Molecular & Behavioral Neuroscience Institute) de la Universidad de Michigan (Ann Arbor, EE.UU) en colaboración con las Drs. Huda Akil y Shelly B. Flagel (marzo-junio de 2013, julio-agosto de 2014 y octubre-noviembre de 2015). La vulnerabilidad individual al desarrollo de una adicción se puede estudiar en animales de experimentación mediante la caracterización inicial de su actividad motora en un nuevo ambiente, estableciéndose dos tipologías de ratas, las denominadas HR (high-responders, alta actividad) y las LR (low-responders, baja actividad). Los animales HR desarrollan una mayor sensibilización conductual así como una más rápida autoadministración de la droga en comparación con los LR. La Dra. Huda Akil lleva generando una colonia de ratas HR y LR por más de 43 generaciones. La colaboración, por tanto, se ha centrado en estudiar las consecuencias neurobiológicas (regulación del destino celular, cambios epigenéticos) derivadas de la experiencia adolescente (ventana de vulnerabilidad PND 33-39) y sus implicaciones para la adicción a cocaína en la rata adulta mediante la utilización de esta colonia HR-LR con diferente vulnerabilidad inicial a la adicción. Los resultados más interesantes de esta colaboración muestran como las ratas LR (ie, resistentes a desarrollar una adicción) incrementan sus índices adictivos en la edad adulta tras la administración repetida de cocaína durante la adolescencia (PND 33-39). Los índices adictivos se estudiaron a dos niveles. El primer nivel se centró en estudiar cómo la exposición a cocaína en la adolescencia (PND 33-39) afectaba a la respuesta conductual en la rata LR adulta (generación 38) de un paradigma condicionante de Pavlov (14 sesiones, PND 62-75) donde se asociaba un estímulo condicionado (palanca en caja operante) con un estímulo incondicionado (recompensa de un pellet de comida). Ante dicho test conductual, algunas ratas desarrollan una respuesta preferente hacia el estímulo incondicionado ("sign-trackers", ST) y otras hacia el estímulo condicionado ("goal-trackers", GT). Las ratas LR criadas en el MBNI muestran todas una respuesta GT con un 95-100% de probabilidad. La exposición a cocaína en la adolescencia incrementó esta predisposición a GT a la vez que disminuyó los índices de proliferación y supervivencia celular en el hipocampo de rata adulta (PND 77). Estos resultados demuestran la existencia de complicaciones (a nivel conductual y de neurotoxicidad hipocámpal) derivadas del consumo de cocaína durante la adolescencia en la rata adulta. Los datos derivados de este diseño experimental están actualmente en vías de publicación: García-Fuster MJ,



Parsegian A, Watson SJ, Akil H, Fligel SB: Adolescent cocaine exposure enhances goal-tracking behavior and impairs hippocampal cell genesis in adult bred rats typically resilient to addiction. *Under Revision* (March 2016). Además, estos resultados se presentaron en dos comunicaciones científicas: (1) García-Fuster MJ, Parsegian A, Blandino P, Akil H, Fligel SB: Alterations in the propensity to sign- and goal-track and neurobiological correlates in selectively bred rats exposed to cocaine during adolescence. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. San Diego, November 2013; y (2) García-Fuster MJ, Parsegian A, Fligel SB, Akil H: Adolescent cocaine exposure alters the propensity to sign- and goal-track in selectively bred rats. *Reunión Científica de la Red de Trastornos Adictivos*. Póster. Granada, septiembre 2015. Por otro lado, el segundo diseño experimental utilizó ratas HR-LR de la generación 43. El tratamiento crónico con cocaína durante la adolescencia (PND 33-39) indujo sensibilización motora en las ratas adolescentes HR (como se había mostrado ya para la rata adulta), pero no en las LR. Sin embargo y de manera interesante, la administración previa de cocaína crónica durante la adolescencia incrementó la respuesta motora a cocaína en las ratas LR adultas hasta niveles de las ratas HR. Estos datos sugieren que en un fenotipo menos vulnerable a desarrollar una adicción a cocaína (LR), la exposición a la droga durante la adolescencia altera la posterior respuesta conductual en la rata adulta, induciendo una mayor sensibilización a cocaína. Además, los resultados moleculares mostraron que la exposición a cocaína durante la adolescencia indujo cambios a largo plazo en la expresión de ciertos marcadores epigenéticos (H3K9me3 y acH3K9) de manera específica para cada fenotipo y en ciertas regiones cerebrales (NAC core vs. shell, HC dorsal vs. ventral) relevantes para el desarrollo de una adicción. Estos resultados se han presentado en dos comunicaciones científicas: (1) Parsegian A, García-Fuster MJ, Chaudry S, Blandino P, Fligel SB, Akil H: Adolescent cocaine exposure alters acetylation and tri-methylation on histone 3 lysine 9 in the hippocampus and nucleus accumbens exclusively in selectively bred rats that are typically resilient to addiction. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Washington DC, November 2014, y (2) Parsegian A, García-Fuster MJ, Blandino P, Watson SJ, Fligel SB, Akil H: Adolescent cocaine experience differentially augments adult sensitization and alters nucleus accumbens epigenetic profiles in selectively bred rats that differ in addiction liability. *Society for Neuroscience Annual Meeting*. Chicago, November 2015. Los datos derivados de esta colaboración se publicarán en un artículo científico, actualmente en vías de preparación: Parsegian A, García-Fuster MJ, Blandino P, Watson SJ, Fligel SB, Akil H: Adolescent cocaine experience differentially augments cocaine sensitization and alters nucleus accumbens epigenetic profiles in selectively bred rats that differ in addiction liability. *In Preparation*.

El objetivo 1, con modificaciones menores en el lugar de desarrollo de los diseños experimentales, se ha alcanzado al 100%. Además se ha ampliado con experimentos inicialmente no programados. Véase apartado de 'artículos publicados como consecuencia de la acción'.

2. Estudiar las consecuencias de la administración de un paradigma de administración de cocaína crónica (7 y 14 días) durante la adolescencia temprana a nivel del posterior desarrollo de una comorbilidad psiquiátrica (ej., trastorno depresivo) en rata adulta.

Para abordar el estudio de las consecuencias de la administración de un paradigma de administración de cocaína crónica durante la adolescencia (ventana de vulnerabilidad: PND 33-39) a nivel del posterior desarrollo de una comorbilidad psiquiátrica (ej., sintomatología depresiva) en la rata adulta se realizaron dos experimentos. En el primer experimento las ratas que se trataron con cocaína crónica (15 mg/kg, i.p., 7 días) de manera temprana durante la adolescencia (PND 33-39) y mostraron una tendencia no significativa a presentar cierta sintomatología depresiva (desespero conductual: mayor tendencia a la inactividad o inmovilidad en el test de natación forzada) en la rata adulta. Sin embargo, un segundo tratamiento con cocaína más prolongado (15 mg/kg, i.p., 14 días) durante la adolescencia (PND 33-46) no mostró de manera significativa la sintomatología depresiva esperada en la rata adulta, sugiriendo que la administración crónica de cocaína durante la adolescencia no conlleva a una posterior sintomatología del trastorno depresivo medido con el test de natación forzada (desespero conductual) en rata adulta. A pesar de no haber encontrado cambios claros a nivel conductual, se han estudiando las adaptaciones neuronales derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína (7 y 14 días) en el hipocampo (neurogénesis, marcadores celulares), así como en la corteza prefrontal y el estriado. Parte de estos resultados se han publicado en un artículo científico: García-Cabrero R, Keller B, García-Fuster MJ: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during periods of adolescent vulnerability: Consequences of cocaine exposure during adolescence on behavioral despair in adulthood. *Neuroscience* 304:302-315, 2015. Además, estos estudios han generado dos comunicaciones científicas: (1) García-Fuster MJ, Keller B: Hippocampal cell fate regulation by chronic cocaine during early adolescence: Implications for depression-like behavior in adulthood. *European College of Neuropsychopharmacology Annual Meeting*. Berlin, October 2014; y (2) García-Fuster MJ, García-Cabrero R, Keller B: Cocaine impairs cell genesis during adolescence: Implications for depression-like behavior in adulthood. *Presentación oral en el congreso de Patología Dual*. Barcelona, Abril 2015.

El objetivo 2 planteado inicialmente se ha alcanzado al 100%. Dado los resultados negativos obtenidos, se procedió a ampliar los objetivos con un diseño experimental inicialmente no programado (14 días de tratamiento crónico durante la adolescencia PND 33-46). Véase apartado de 'artículos publicados como consecuencia de la acción'.

3. Estudiar los efectos del tratamiento antidepressivo entre la fase adolescente y la fase adulta sobre las consecuencias conductuales (ej., índices de adicción, comorbilidad psiquiátrica) y adaptaciones neuronales derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína.

En primer lugar, y en relación a la posible comorbilidad psiquiátrica en el adulto derivada del consumo de cocaína en la adolescencia, se ha puesto a punto la técnica de 'natación forzada' (forced swim test) para evaluar el desespero



conductual, como una posible medida de la sintomatología depresiva inducida por el consumo de cocaína durante la adolescencia en la rata adulta. Además, se han realizado experimentos preliminares con diferentes fármacos antidepresivos (ej, desipramina, paroxetine) para escoger el fármaco a utilizar para una posible prevención de los efectos negativos del consumo de cocaína durante la adolescencia. Finalmente, en paralelo al experimento descrito anteriormente donde se administró durante 14 días cocaína en ratas adolescentes (PND 33-46) y se evaluó el test de natación forzada en la rata adulta, a otro grupo de ratas (control vs. cocaína en adolescencia) se les administró un tratamiento de desipramina (20 mg/kg, 3 dosis) entre el pre-test y el test de natación forzada en la rata adulta. Dado que la cocaína administrada durante la adolescencia no indujo consecuencias en la rata adulta en este test conductual, el efecto de la desipramina fue evaluado en vano.

En relación a la posible inducción de una adicción a cocaína en el adulto derivada del consumo de cocaína en la adolescencia, y dado el gran volumen de trabajo y diseños experimentales estudiados que no estaban inicialmente descritos en el Proyecto original (ej, experimentos con ratas HR-LR en EE.UU) por el momento aún no se ha podido abordar el estudio de un posible tratamiento antidepresivo entre la fase adolescente y la fase adulta para mejorar o prevenir los índices adictivos mediados por la experiencia adolescente en la rata adulta.

El objetivo 3 planteado inicialmente se ha alcanzado al 50%. Los resultados alcanzados hasta ahora sugieren que el inicio temprano en el consumo de cocaína durante la adolescencia parece jugar un papel más importante en el desarrollo de una posterior adicción en la rata adulta que en la manifestación de una comorbilidad psiquiátrica (sintomatología depresiva).

## METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

### PROYECTADO:

Para lograr los objetivos planteados se proyectó utilizar ratas macho Sprague-Dawley a PND 21 provenientes de los laboratorios Charles River. Una vez las ratas lleguen al estabulario de la UIB y tras el período de cuarentena se mantendrán en condiciones controladas y con libre acceso a comida y agua según mandan las directrices locales del Comité de Ética. Un primer grupo de ratas (P26, adolescencia temprana) serán tratadas con el análogo de timidina, BrdU ("Bromodeoxy Uridine", 50 mg/kg, i.p.) dos veces al día durante 3 días consecutivos para marcar las células de nueva proliferación en el hipocampo. Tras 4 días en reposo, tiempo necesario para que todo el BrdU se haya incorporado, la mitad de las ratas se utilizarán para el grupo control y serán tratadas con salino (0.9% NaCl, i.p., 7 días) y la otra mitad con cocaína de manera crónica (15 mg/kg, i.p., 7 días) (PND 33-P39). Este tratamiento induce sensibilización a la respuesta motora por cocaína. Una vez finalizado el tratamiento, las ratas de dejarán estabuladas hasta P60 (rata adulta) donde se estudiarán las consecuencias conductuales y las adaptaciones neuronales derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína.

### Plan de trabajo:

1. Puesta a punto de la detección de neurogénesis en hipocampo por técnicas inmunohistoquímicas. Caracterización preliminar de proteínas diana en cerebros de animales de experimentación.
2. Tratamientos con cocaína en rata adolescente y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conducta adictiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.
3. Tratamientos con cocaína en rata adolescente y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conducta depresiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.
4. Tratamientos con cocaína en rata adolescente, posterior tratamiento farmacológico (terapia antidepresiva) y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conductas adictiva y depresiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.
5. Análisis de las conductas adictivas y depresivas de los diversos tratamientos realizados.
6. Cuantificación del número de células de nueva proliferación (Ki-67) y de supervivencia (BrdU, microscopio Leica DMR), así como los índices de neurogénesis (microscopio confocal) de los diversos tratamientos realizados.
7. Cuantificación de la densidad de las proteínas diana en cerebros de los diversos tratamientos realizados.
8. Discusión de los resultados y mejora de los diseños experimentales (si procede).
9. Gestión general y coordinación del proyecto.
10. Responsabilidad de las publicaciones.



## EJECUTADO:

Durante estos tres años de consecución del Proyecto se ha trabajado en desarrollar el plan de trabajo proyectado utilizando la metodología descrita, con algunas modificaciones descritas en esta memoria y en las memorias anteriores en relación a los diseños experimentales (mejora de los mismos) y en el lugar de realización de los mismos (colaboración externa con el MBNI, Universidad de Michigan, EE.UU). A continuación se describe la ejecución del plan de trabajo punto a punto y se detallan las posibles modificaciones surgidas a lo largo de la consecución del Proyecto:

1. Puesta a punto de la detección de neurogénesis en hipocampo por técnicas inmunohistoquímicas. Caracterización preliminar de proteínas diana en cerebros de animales de experimentación.

Como se describió en la memoria anterior, gracias a la adquisición de un criostato con fondos del proyecto se finalizó la puesta a punto para la detección de marcadores de neurogénesis (Ki-67, BrdU) en el hipocampo por técnicas inmunohistoquímicas así como la caracterización preliminar de proteínas diana en distintas regiones cerebrales (hipocampo, corteza prefrontal, estriado) en los animales de experimentación.

2. Tratamientos con cocaína en rata adolescente y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conducta adictiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.

Como se ha descrito a lo largo de esta memoria, para abordar este objetivo del plan de trabajo se modificaron tanto el diseño experimental (véase detalles más abajo) como el lugar de realización de los experimentos (en vez de la UIB se realizaron en la Universidad de Michigan (MBNI, Ann Arbor, EEUU). Para evaluar las consecuencias de la administración temprana de cocaína en el posible desarrollo de una adicción en la rata adulta, se han realizado dos series experimentales con ratas HR-LR de la colonia de la Dra. Akil de la Universidad de Michigan (Ann Arbor, EE.UU). En el primer experimento se utilizaron 40 ratas macho de la generación 38 (20 HR y 20 LR). Para marcar las células de nueva proliferación en el hipocampo, las ratas fueron tratadas con un análogo de timidina, BrdU ("Bromodeoxy Uridine", 50 mg/kg, i.p.) dos veces al día durante 3 días (PND 26-28). Tras 4 días en reposo, tiempo necesario para que todo el BrdU se haya incorporado, la mitad de las ratas para cada fenotipo (HR, LR) se utilizaron para el grupo control y fueron tratadas de manera crónica con salino (0.9% NaCl, i.p., 7 días) y la otra mitad con cocaína (15 mg/kg, i.p., 7 días) (PND 33-39). La sensibilización a la respuesta motora por cocaína fue analizada en los días 1 y 7 del tratamiento. Posteriormente, se evaluaron las consecuencias de la administración temprana de cocaína en el posible desarrollo de una adicción en la rata adulta (PND 62-75). Para ello se utilizaron cajas conductuales "Med Associates" donde se realizaron sesiones diarias Pavlovianas de 25 ensayos cada una (PND 62-75). La presentación de una palanca retirable iluminada era seguida por la administración de una pellet de comida independientemente de la respuesta de los animales. La conducta dirigida hacia la palanca (lever, CS) o el lugar donde se administra el pellet de comida (food cup, US) se grabó como conductas "sign- o goal-tracking", respectivamente. Los resultados muestran que el tratamiento crónico con cocaína durante la adolescencia temprana induce sensibilización motora en las ratas adolescentes HR pero no en las LR. Además la administración temprana de cocaína no tiene efecto en la posterior tendencia de las ratas a mostrar la conducta "sign-tracking", pero altera la conducta "goal-tracking" para los dos fenotipos estudiados (HR y LR). La exposición de cocaína atenuó la conducta de "goal-tracking" en ratas HR y lo incrementó en ratas LR. Por tanto, los resultados más relevantes muestran que el nacer con una predisposición a "goal-track" (ratas LR), y estar expuesto a cocaína durante la adolescencia, incrementa esa tendencia en la rata adulta. Sin embargo, si se nace con una predisposición a "sign-track" (ratas HR), la exposición temprana a cocaína no tiene efecto alguno en la rata adulta. Posteriormente, se estudiaron las adaptaciones neuronales derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína en el hipocampo (neurogénesis: Ki-67, BrdU; marcadores celulares: FADD, p-FADD). Después de seccionar el tejido hipocámpal y preparar las muestras para la determinación de proteínas por el método de WB, el material se envió a Mallorca para poder realizar esta parte del diseño experimental en la UIB. Los resultados inmunohistoquímicos revelan una disminución de la proliferación celular (Ki-67) y de la supervivencia celular (BrdU) en el hipocampo de ratas LR adultas como consecuencia de la administración de cocaína durante la adolescencia, sugiriendo un menor número de neuronas activas en esta región cerebral y por tanto un daño neurotóxico. Además la disminución en la tasa de proliferación celular correlacionó de manera inversa con el efecto observado en la conducta (incremento en "goal-tracking") inducido por cocaína, sugiriendo un papel del hipocampo en mediar los efectos negativos a largo plazo de la cocaína. En estos animales no se observaron cambios en otros marcadores celulares (ej, FADD, p-FADD). Por otro lado, la administración de cocaína durante la adolescencia indujo cambios a largo plazo en la expresión de ciertos marcadores epigenéticos (H3K9me3 y aH3K9) de manera específica para cada fenotipo y en ciertas regiones cerebrales (NAc core vs. shell, hipocampo dorsal vs. ventral) relevantes para el desarrollo de una adicción. El estudio de estos marcadores epigenéticos no estaba inicialmente descrito pero se consideró relevante dado el papel recientemente descrito de la epigenética en las conductas adictivas.

En el segundo experimento se utilizaron por un lado 40 ratas macho de la generación 43 (20 HR y 20 LR) a las que se les administró cocaína crónica (15 mg/kg., 7 días, i.p.) o vehículo durante la adolescencia (PND 33-39) y fueron sacrificadas 24 h después de la última dosis (PND 40). Por otro lado, se utilizaron 80 ratas de la generación 43 (40 HR y 40 LR) a las que también se les administró cocaína crónica o vehículo (véase paradigma anterior) durante la adolescencia (PND 33-39) pero a las que se dejó en un período de abstinencia prolongada (38 días) hasta la edad adulta. Entonces se les administró un segundo paradigma de sensibilización a cocaína (15 mg/kg, 7 días, i.p.) (PND





78-84) y fueron sacrificadas 24 h después de la última dosis (PND 85). Los resultados de este segundo experimento replican el primer experimento en cuanto a que demuestran en otra generación de ratas HR-LR (generación 43 vs. 38) que el tratamiento crónico con cocaína durante la adolescencia temprana (PND 33-39) induce sensibilización motora en las ratas adolescentes HR pero no en las LR. Además, y como resultados más significativos, la experiencia previa de cocaína crónica durante la adolescencia incrementó la respuesta motora a cocaína en las ratas LR adultas hasta niveles de las ratas HR. Estos datos sugieren que en un fenotipo menos vulnerable a desarrollar una adicción a cocaína (LR), la exposición a la droga durante la adolescencia altera la posterior respuesta conductual en la rata adulta, induciendo una mayor sensibilización a cocaína. En estos animales no se observaron cambios en los marcadores celulares (ej, FADD, p-FADD) o epigenéticos evaluados en el hipocampo por experimentos de WB. Sin embargo, experimentos de inmunohistoquímica han mostrado que la administración de cocaína durante la adolescencia indujo cambios a largo plazo en la expresión de ciertos marcadores epigenéticos (H3K9me3 y acH3K9) de manera específica para cada fenotipo y en ciertas regiones cerebrales (NAc core vs. shell) relevantes para el desarrollo de una adicción.

3. Tratamiento con cocaína en rata adolescente y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conducta depresiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.

Para evaluar las consecuencias de la administración temprana de cocaína en el posible desarrollo de un trastorno depresivo en rata adulta, se utilizaron 18 ratas macho Sprague-Dawley. Para marcar las células de nueva proliferación en el hipocampo, las ratas fueron tratadas con un análogo de timidina, BrdU ("Bromodeoxy Uridine", 50 mg/kg, i.p.) dos veces al día durante 3 días. Tras 4 días en reposo, tiempo necesario para que todo el BrdU se haya incorporado, la mitad de las ratas se utilizaron para el grupo control y fueron tratadas de manera crónica con salino (0.9% NaCl, i.p., 7 días, n=9) y la otra mitad con cocaína (15 mg/kg, i.p., 7 días, n=9) (PND 33-P39). Este tratamiento induce sensibilización a la respuesta motora por cocaína. Una vez finalizado el tratamiento, las ratas de dejaron estabuladas hasta PND 61 (rata adulta) donde se evaluaron las consecuencias de la administración temprana de cocaína en el posible desarrollo de un trastorno depresivo mediante el test de natación forzada. Los resultados muestran que las ratas tratadas de manera temprana con cocaína expresan una tendencia no significativa a una mayor inactividad o inmovilidad como índice de una mayor sintomatología depresiva. Dada esta tendencia a incrementar el desarrollo depresivo en rata adulta posteriormente se realizaron experimentos con un tratamiento más prolongado con cocaína (15 mg/kg, i.p., 14 días) durante la adolescencia para ver si era capaz de incrementar de manera significativa la sintomatología depresiva en rata adulta. Los resultados conductuales fueron negativos. Por otro lado, tras haber seccionado los cerebros con el criostato se están estudiando las adaptaciones neuronales derivadas del inicio temprano en el consumo de cocaína en el hipocampo (neurogénesis: Ki-67, BrdU; marcadores celulares: FADD, p-FADD). Además se han estudiado en homogenados cerebrales (hipocampo, corteza prefrontal y estriado) los efectos de la administración de cocaína a largo plazo en la expresión de marcadores relacionados con el destino celular (ej, FADD, p-FADD, BDNF, véase García-Cabrero et al., 2015).

4. Tratamientos con cocaína en rata adolescente, posterior tratamiento farmacológico (terapia antidepresiva) y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conductas adictiva y depresiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.

Se utilizaron 32 ratas macho Sprague-Dawley para evaluar el posible efecto de un tratamiento farmacológico (antidepresivo desipramina) para intentar mejorar los efectos conductuales observados en la rata adulta tras exposición a cocaína en la adolescencia. Para marcar las células de nueva proliferación en el hipocampo, las ratas fueron tratadas con un análogo de timidina, BrdU ("Bromodeoxy Uridine", 50 mg/kg, i.p.) dos veces al día durante 3 días. Tras 4 días en reposo, tiempo necesario para que todo el BrdU se haya incorporado, la mitad de las ratas se utilizaron para el grupo control y fueron tratadas de manera crónica con salino (0.9% NaCl, i.p., 14 días, n=16) y la otra mitad con cocaína (15 mg/kg, i.p., 14 días, n=16) (PND 33-P46). Una vez finalizado el tratamiento, las ratas de dejaron estabuladas hasta PND 62-63 (rata adulta) donde se evaluaron las consecuencias de la administración temprana de cocaína en el posible desarrollo de un trastorno depresivo mediante el test de natación forzada. Los dos grupos experimentales (salino o cocaína) se dividieron en dos (n=8 por grupo final) y entre el pre-test (PND 62) y el test (PND 63) a un grupo se le administraron 3 dosis de desipramina (20 mg/kg, i.p.) y al otro 3 de salino. Los resultados conductuales fueron negativos.

5. Análisis de las conductas adictivas y depresivas de los diversos tratamientos realizados.

Se han analizado las conductas adictivas (sensibilización motora y "sign-tracking behavior" vs. "goal-tracking behavior") y depresivas (test de natación forzada) de los tratamientos realizados y propuestos en el proyecto.

6. Cuantificación del número de células de nueva proliferación (Ki-67) y de supervivencia (BrdU, microscopio Leica DMR), así como los índices de neurogénesis (microscopio confocal) de los diversos tratamientos realizados.

Se ha finalizado la cuantificación del número de células de nueva proliferación (Ki-67) y de supervivencia (BrdU) de los tratamientos realizados.



7. Cuantificación de la densidad de las proteínas diana en cerebros de los diversos tratamientos realizados.

Se han cuantificado y analizado las densidades de las proteínas diana descritas de los diversos tratamientos realizados en distintas regiones cerebrales: (1) marcadores celulares: FADD, p-FADD y otros inicialmente descritos, (2) marcadores epigenéticos: H3K9me3, H3K9me2, H3K9ac y H3 total (no descritos en el proyecto inicial).

8. Discusión de los resultados y mejora de los diseños experimentales (si procede).

A lo largo de la consecución del Proyecto se ha trabajado en la discusión de los resultados obtenidos, así como en la mejora y adaptación de los diseños experimentales a desarrollar, como se ha detallado en esta memoria.

9. Gestión general y coordinación del proyecto.

Durante la consecución del Proyecto se ha trabajado en la gestión general y coordinación del proyecto.

10. Responsabilidad de las publicaciones.

Durante la consecución de este Proyecto se han publicado 4 artículos científicos y 1 capítulo de libro derivados directamente del Proyecto (o complementarios y necesarios para algunos de sus diseños experimentales), así como hay 4 artículos más en vías de publicación y/o preparación. Además, se han presentado 13 comunicaciones científicas en congresos de índole nacional e internacional (véase apartado de 'Artículos publicados como consecuencia de la acción').

### ACTIVIDADES EXPERIMENTALES

#### PROYECTADAS:

1. Puesta a punto de la detección de neurogénesis en hipocampo por técnicas inmunohistoquímicas. Caracterización preliminar de proteínas diana en cerebros de animales de experimentación.
2. Tratamientos con cocaína en rata adolescente y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conducta adictiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.
3. Tratamientos con cocaína en rata adolescente y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conducta depresiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.
4. Tratamientos con cocaína en rata adolescente, posterior tratamiento farmacológico (terapia antidepresiva) y posteriores medidas conductuales en rata adulta (ej., conductas adictiva y depresiva). Preparación de muestras cerebrales para la detección de neurogénesis y la inmunodetección de proteínas.
5. Análisis de las conductas adictivas y depresivas de los diversos tratamientos realizados.
6. Cuantificación del número de células de nueva proliferación (Ki-67) y de supervivencia (BrdU, microscopio Leica DMR), así como los índices de neurogénesis (microscopio confocal) de los diversos tratamientos realizados.
7. Cuantificación de la densidad de las proteínas diana en cerebros de los diversos tratamientos realizados.
8. Discusión de los resultados y mejora de los diseños experimentales (si procede).
9. Gestión general y coordinación del proyecto.
10. Responsabilidad de las publicaciones.

#### EJECUTADAS:

Como se ha descrito en los apartados anteriores, se han ejecutado todas las actividades experimentales proyectadas (véase apartado de Plan de Trabajo proyectado y ejecutado) así como se han ejecutado actividades que no habían sido inicialmente descritas y que han aportado resultados muy relevantes a este estudio.

#### EN CASO DE FINANCIACIÓN DE ESTANCIA AVALADA POR EL NIDA, INDIQUE:

- **Objetivos alcanzados**
- **Actividades realizadas vinculadas con el proyecto**
- **Duración de la estancia**



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

Los resultados más relevantes de este Proyecto de Investigación demuestran que la administración repetida de cocaína durante una ventana de especial vulnerabilidad en la adolescencia (PND 33-39) tiene consecuencias a largo plazo a nivel conductual y neuroquímico. A nivel conductual incrementa los índices adictivos en la rata adulta, lo que apoya la literatura existente acerca del peligro de iniciar de manera temprana el consumo de drogas y las consecuencias que de ello derivan. Además, a nivel neuroquímico, se observa que la cocaína tiene consecuencias negativas en el cerebro adulto en varias regiones cerebrales, como son una inhibición de la neurogénesis hipocampal y por tanto una menor conectividad o funcionalidad de esta región, y una alteración de marcadores epigenéticos en el hipocampo y en el núcleo accumbens. Por otro lado, los resultados de este Proyecto no sugieren la inducción de una posible comorbilidad medida por el desespero conductual como sintomatología depresiva en la rata adulta como consecuencia de las complicaciones derivadas del consumo de cocaína en la adolescencia. No se descarta que otras medidas conductuales estén alteradas en referencia a la comorbilidad adicción-depresión, pero se requiere realizar otros experimentos para comprobar esta hipótesis. Por tanto, los resultados de este Proyecto han sido muy prometedores y fructíferos en cuanto a publicaciones derivadas del mismo, y abren una serie de nuevas hipótesis y diseños experimentales a realizar para completar y mejorar los resultados obtenidos.

**TRANSFERENCIA Y DIFUSIÓN DE RESULTADOS A LA CIUDADANÍA: ACCIONES LLEVADAS A CABO  
(en caso de memoria de segunda anualidad o de memoria final)**

Como se describió en la solicitud del proyecto el plan de difusión y de divulgación de los resultados del proyecto ha sido el habitual en todo trabajo científico; es decir, en forma de publicaciones en revistas primarias de difusión internacional que tienen como método la revisión "por pares" (4 artículos ya publicados, 4 en vías de revisión y/o en desarrollo) así como la presentación de resultados en congresos de índole nacional e internacional (13 presentaciones en total). Además los resultados más relevantes y de interés general para la ciudadanía se han presentado (véase en el apartado de resultados publicados la referencia: García-Fuster and Keller, 2013; García-Fuster et al., 2015) en la reunión científica de la RETICS-Red de Trastornos Adictivos (RTA) a la que pertenece el grupo de investigación. En todo momento se ha mencionado la financiación pública del proyecto por parte de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas.

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

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

**SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS  
(Organismo, convocatoria y cantidad)**

**OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR**

La Investigadora Principal de este Proyecto y los otros miembros del equipo investigador pertenecen a la RETICS-RTA (RD12/0028/0011), en la cual participan dentro del Programa "Adicción a Cocaína y Comorbilidad Psiquiátrica". Los resultados del presente Proyecto de Investigación han aportado datos relevantes para los objetivos propuestos en este Programa. Además, en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Marta Torrens estamos estudiando posibles biomarcadores en plaquetas humanas para comparar la depresión inducida por adicción y la adicción como auto-medicación en pacientes depresivos.

En esta fecha se remite también por correo electrónico a la dirección [pndinvestigacion@mssi.es](mailto:pndinvestigacion@mssi.es) la presente memoria.



En Palma de Mallorca a 14 de marzo de 2016

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

**M. Julia García Fuster**