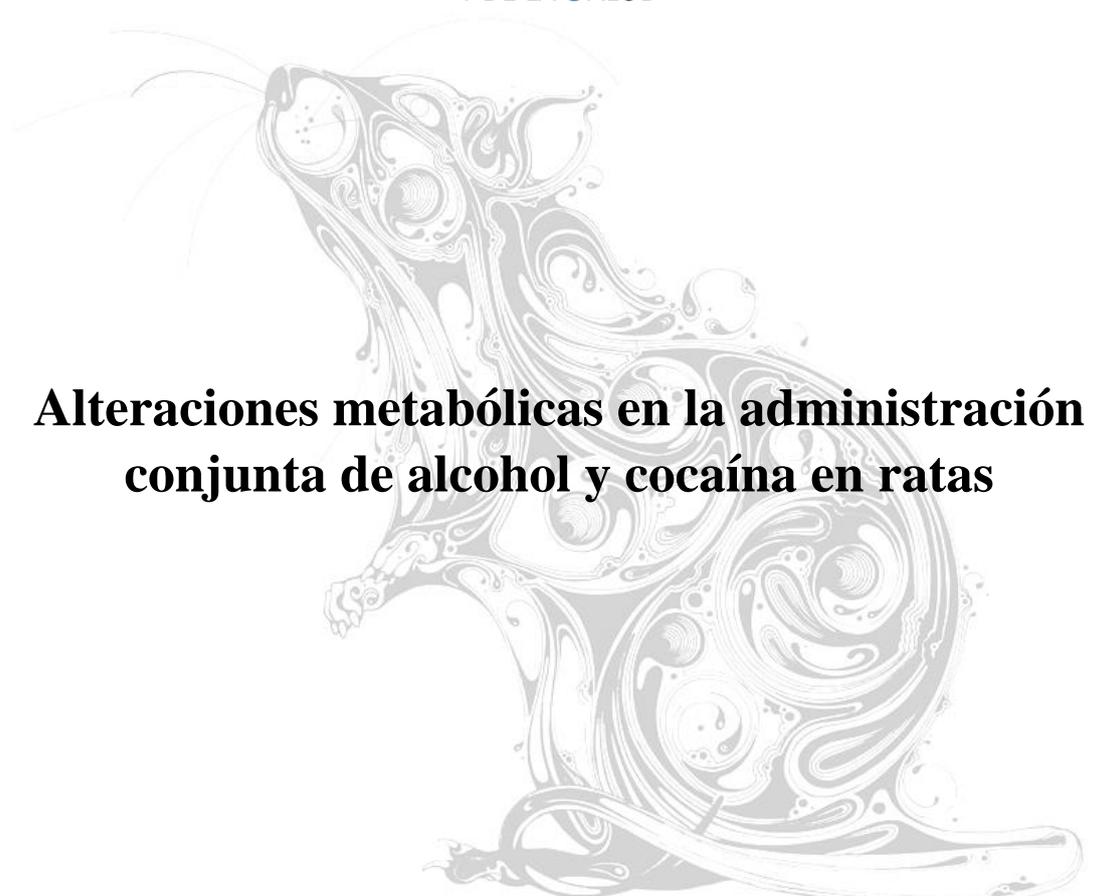




UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA

Facultad de Psicología

MÁSTER EN **M**ETODOLOGÍA DE LAS **C**IENCIAS DEL **C**OMPORTAMIENTO
Y DE LA **S**ALUD



**Alteraciones metabólicas en la administración
conjunta de alcohol y cocaína en ratas**

Trabajo Fin de Máster

Autora: Ana de Paz Regidor

Director: José Manuel Reales Avilés

Departamento de Metodología de las Ciencias del Comportamiento, UNED

Co-directores: Alberto Marcos Bermejo

Emilio Ambrosio Flores

Departamento de Psicobiología, UNED

Convocatoria: junio 2018

Este Trabajo de Fin de Máster ha sido financiado con fondos provenientes de los Proyectos de Investigación de Referencia 2012I057 (2013-2015) y Referencia 2016I073 (2016-2019) del Plan Nacional sobre Drogas (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad) IP: Emilio Ambrosio Flores. Además, la alumna D^a Ana María de Paz Regidor ha sido adjudicataria de una Beca de Colaboración del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (BOE de 9 de Julio de 2016; ID: 13130869) asignada al Departamento de Psicobiología de la UNED en el Curso 2016-17.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al catedrático Dr. Emilio Ambrosio su excelente labor docente e investigadora, así como la oportunidad que me ha brindado de participar en este proyecto para la elaboración de mi Trabajo Fin de Máster. Al Dr. José Manuel Reales por aceptar el reto, acompañándome y guiándome en la elaboración de este trabajo y a Alberto Marcos por su buena disposición para resolver siempre mis dudas y proporcionarme caminos para aprender. Al catedrático Dr. Ricardo Pellón, director del Departamento de Psicología Básica I, por propiciar esta colaboración, y al resto de profesores y alumnos del departamento, especialmente a Valeria Gutiérrez, por sus buenos consejos y el ánimo en los momentos duros, y a Pedro Vidal, con el que formo equipo de investigación. A las amigas que han confiado en mí y siempre estuvieron seguras de que lo conseguiría; Sara, Bea, Lourdes y Vanesa, y a mis chicas del grupo de la UNED, con las que empecé este camino; Carmen, Hortensia, Almudena y Esther. A mi pareja, Manu, que me cuida y me da fuerzas cuando trabajo sin descanso, y a toda su familia.

Dedico este trabajo con especial cariño a mis padres; a mi madre, que se fue y ya no puede verlo, ¡va por ti mamá!, a mi padre que me sigue apoyando y espero que lo haga por muchos años. A mis hermanos, sobrinas y a mi hijo Luis, que es mi mejor crítico y me ha enseñado muchas cosas de la vida que no están en los libros.

A tod@s,

¡Muchas gracias!

Tabla de contenido

	Pag.
Abreviaturas	5
Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	9
1.1. <i>Epidemiología del consumo de alcohol y cocaína</i>	9
1.2. <i>Policonsumo</i>	12
1.3. <i>Ontogenia del consumo de alcohol y cocaína y diferencias por sexo</i>	13
1.4. <i>Toxicidad</i>	15
1.5. <i>El enfoque de la metabolómica</i>	16
1.6. <i>Contextualización del estudio</i>	17
1.6.1. <i>Experimentos de administración pasiva</i>	18
1.6.1.1. <i>Análisis metabolómico no-dirigido</i>	19
1.6.1.2. <i>Análisis metabolómico dirigido</i>	20
1.6.2. <i>Experimentos de autoadministración</i>	21
1.7. <i>Objetivos e hipótesis</i>	22
2. Materiales y métodos	26
2.1. <i>Sujetos</i>	26
2.2. <i>Diseño experimental</i>	26
2.3. <i>Reactivos y productos químicos</i>	27
2.4. <i>Cirugía</i>	27
2.5. <i>Protocolo de administración de las drogas</i>	29
2.6. <i>Obtención del plasma sanguíneo</i>	30
2.7. <i>Cuantificación de los aminoácidos</i>	32
2.8. <i>Análisis estadísticos</i>	35
3. Resultados	36
3.1. <i>Análisis de datos exploratorios (ADE)</i>	36
3.1.1. <i>Análisis univariado y estadística descriptiva</i>	36
3.1.2. <i>Análisis bivariado</i>	47
3.1.3. <i>Análisis multivariado</i>	50
3.2. <i>Análisis Factorial Exploratorio (AFE)</i>	51
3.2.1. <i>Adecuación de los datos</i>	52

	Pag.
3.2.2. <i>Método de extracción de factores</i>	53
3.2.3. <i>Elección del número de factores</i>	53
3.2.4. <i>Rotación de los factores</i>	56
3.2.5. <i>Puntuaciones factoriales</i>	58
3.3. <i>Análisis de varianza (ANOVA)</i>	59
3.3.1. <i>ANOVA Factor 1</i>	60
3.3.2. <i>ANOVA Factor 2</i>	61
3.3.3. <i>ANOVA Factor 3</i>	61
3.3.4. <i>ANOVA Factor 4</i>	62
3.4. <i>Post-test de autoadministración de alcohol y cocaína</i>	62
4. Discusión	64
5. Referencias	69

Abreviaturas

AA	Aminoácido
ADE	Análisis de Datos Exploratorio
AFE	Análisis Factorial Exploratorio
AFC	Análisis Factorial Confirmatorio
AM	Análisis Multivariado
ANOVA	Análisis de Varianza
CE	Electroforesis capilar
CE-LIF	Electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser
CIBERMED	Centro de Investigación Biomédica en Red
DGPNSD	Delegación de Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas
EDADES	Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España
EMCDDA	<i>European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction</i>
ESTUDES	Encuesta sobre uso de drogas en Enseñanzas Secundarias en España
Gly	Glicina
IS	Estándar interno
kDa	Kilodalton
X/kg/p.v.	Dosis por kilogramo de peso vivo
KMO-MSA	Medida de adecuación de muestreo de Kaiser-Meyer-Olkin
Kv	Kilovoltio
L-Ala	L-alanina
L-Gln	L-glutamina
L-Glu	L-glutamato
L-Iso	L-isoleucina

L-Leu	L-leucina
L-Orn	L-ornitina
L-Pro	L-prolina
L-Ser	L-serina
L-Tre	L-treonina
MANOVA	Análisis de varianza multivariado
ML	Máxima Verosimilitud
MSA	Medida de adecuación de muestreo
MSSI	Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad
NBD-F	4-fluoro-7-nitrobenzofurazán
nm	nanómetros
mM	milimoles
OEDA	Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones
p/v	Porcentaje en volumen
PA	Análisis Paralelo
PCA	Análisis de Componentes Principales
pH	Medida de acidez o alcalinidad de una disolución
SNC	Sistema Nervioso Central
Tau	Taurina
ULS	Mínimos cuadrados no ponderados
v/v	Porcentaje volumen a volumen
× g	Equivalente a la fuerza de la gravedad
μM/l	Micromoles/litro
μm	Micras (10 ⁻⁶ m)

Uno de los problemas de salud más graves que enfrentan actualmente los países desarrollados es el elevado consumo de alcohol. Su combinación con la cocaína es un patrón cada vez más extendido, especialmente entre los adolescentes. Cuando el alcohol y la cocaína se consumen juntas se produce el metabolito cocaetileno, cuya toxicidad es superior a la producida por el consumo individual de cada una de estas drogas. Es preciso el desarrollo de nuevos estudios enfocados a descubrir otros posibles metabolitos y/o rutas metabólicas que podrían estar alterados cuando ambas drogas se consumen de forma combinada. Este trabajo se desarrolla en el marco de un proyecto en el que se investigan modelos animales de administración pasiva y autoadministración de alcohol y cocaína. Se han utilizado técnicas de química analítica para detectar metabolitos que pudieran ser relevantes. Los resultados hasta el momento apuntan a la implicación de los aminoácidos. En el presente estudio se utilizaron 90 ratas Wistar de ambos sexos en la etapa de la adolescencia y de adulto joven. Los sujetos se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos con administración intravenosa de las drogas: alcohol (2 g/kg-p.v.), cocaína (5 mg/kg-p.v.), alcohol + cocaína (2 g/kg-p.v. + 15 mg/kg-p.v.) y control salino (0,9% p/v de cloruro sódico). Mediante la técnica analítica de electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) y una metabolómica dirigida se midieron las concentraciones de 11 aminoácidos en el plasma sanguíneo de las ratas. El objetivo fue buscar una estructura más simple que permitiera explicar la variabilidad de estos aminoácidos en los grupos sometidos a diferentes tratamientos con las drogas. En un análisis factorial exploratorio (AFE) se extrajeron cuatro factores que explicaban el 62,55% de la varianza debida a los factores comunes entre las variables estudiadas. En sucesivos análisis de varianza factoriales (ANOVAs), con las puntuaciones de las ratas en cada dimensión como variable dependiente, se encontraron diferencias significativas en función del tratamiento recibido.

Palabras clave: alcohol, cocaína, metabolómica, modelos animales, análisis factorial exploratorio, AFE.

Abstract

One of the most serious health problems facing developed countries today is the high consumption of alcohol. Its combination with cocaine is an increasingly widespread pattern, especially among adolescents. When alcohol and cocaine are consumed together, the metabolite cocaethylene is produced, whose toxicity is higher than that produced by consumption of each of these drugs alone. It is necessary to develop new studies focused on discovering other possible metabolites and/or metabolic pathways that could be altered when both drugs are consumed in combination. This work is developed within the framework of a project in which animal models of passive administration and self-administration of alcohol and cocaine are being investigated. Analytical chemistry techniques have been used to detect metabolites that may be relevant. The results so far point to the involvement of amino acids. In the present study 90 Wistar rats of both sexes were used in adolescence and young adult stages. The subjects were randomly assigned to four groups with intravenous drug administration: alcohol (2 g/kg-pv), cocaine (5 mg/kg-pv.), alcohol + cocaine (2 g/kg-pv + 15 mg / kg-pv) and saline control (0.9% w/v sodium chloride). By means of the analytical technique of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence (CE-LIF) and a directed metabolomics the concentrations of 11 amino acids in the blood plasma of the rats were measured. The objective was to find a simpler structure that would explain the variability of these amino acids in the groups subjected to different treatments with drugs. In an exploratory factorial analysis (AFE), four factors were extracted that explained 62.55% of the variance due to the common factors among the variables studied. In successive factorial analyzes of variance (ANOVAs), with the scores of the rats in each dimension as a dependent variable, significant differences were found depending on the treatment received.

Key words: alcohol, cocaine, metabolomics, animal models, exploratory factor analysis, EFA.

1. Introducción

1.1. Epidemiología del consumo de alcohol y cocaína

El consumo de alcohol y otras sustancias psicoactivas ilegales es un grave problema social y sanitario a nivel global, tanto por su elevado coste económico, como por las devastadoras consecuencias que conlleva para las personas. En Europa, el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA, 2018) estima que poco más de la cuarta parte de la población de 15 a 64 años, más de 92 millones de personas, han probado drogas ilegales en algún momento de su vida. El consumo de drogas se concentra especialmente entre los adolescentes y adultos jóvenes entre 15 a 34 años (18,9 millones) y el número de hombres duplica al de mujeres. La cocaína es la droga estimulante ilegal más consumida. Se estima que la han consumido 17 millones de europeos alguna vez en su vida y, aunque su tendencia de consumo es estable, presenta signos de aumento. Entre los países de nuestro entorno, España se sitúa entre los que poseen una prevalencia¹ más elevada de consumo de alcohol a lo largo de la vida (93,5%) y es el segundo en consumo de cocaína (9,1%).

Las encuestas que se vienen realizando a nivel nacional por parte del Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA) sobre el consumo de drogas y otras adicciones arrojan datos preocupantes. La encuesta EDADES (2015), que recoge periódicamente datos en la población española de 15 a 64 años residente en hogares, destaca que el alcohol sigue siendo la sustancia psicoactiva más extendida, manteniendo una tendencia estable y en niveles altos desde hace décadas. En 2015, un 77,6% declaró haberla consumido en los últimos 12 meses, el 62,1% en los últimos 30 días y el 9,3% diariamente en los últimos 30 días. En el último año, el 16,8% de los españoles de 15 a 64 años se ha emborrachado. El 9,4% reconoce haber hecho botellón y el patrón de bebida en atracón² (*binge drinking*) ha aumentado su prevalencia, alcanzando el 17,9% en el tramo temporal del último mes.

¹ Cantidad de casos existentes (nuevos o viejos) de una característica o evento determinado (el consumo de las drogas) en individuos de un grupo o una población, en un momento o en un período determinado, en un lugar establecido y en un grupo social dado (Colimon, 1990).

² Consumo de 5 o más bebidas alcohólicas (si es hombre) o de 4 o más bebidas alcohólicas (si es mujer) en la misma ocasión, es decir, seguidas o en el intervalo de dos horas (EDADES, 2015).

En cuanto a la cocaína, continúa siendo la segunda droga ilegal de mayor consumo en España, por detrás del cannabis. Un 9,1% declara haberla consumido alguna vez en la vida, ya sea en polvo o base, el 2% de la población la ha consumido en los últimos 12 meses, y el 0,9% en los últimos 30 días. Aunque la prevalencia de consumo de cocaína se mantiene estable desde 2009, se ha observado una tendencia ligeramente ascendente en el número de personas que la consumen por primera vez, y que en 2015 ya suponía un 8,9%.

Por grupos de edad y sexo, el consumo de alcohol y de cocaína se encuentra más extendido entre los hombres. La encuesta EDADES (2015) sitúa la edad de comienzo de consumo del alcohol alrededor de los 16 años. El alcohol es más consumido por el grupo masculino tanto en los diversos tramos temporales contemplados como en todos los grupos de edad. En los últimos 12 meses, el 82,9% de los hombres había consumido bebidas alcohólicas frente al 76,1% de mujeres. Durante ese periodo la prevalencia en el grupo de hombres entre 25 a 34 años fue la más alta, un 86,1%, y si bien disminuye en los siguientes tramos de edad, el descenso no es tan acusado como en las mujeres. La diferencia con las mujeres en cuanto a prevalencia es menor en el grupo de 15 a 24 años, mientras que en el grupo de 55 a 64 años se registra la mayor diferencia. En cuanto al consumo diario de bebidas alcohólicas, este patrón se triplica en hombres, con un 14,5% respecto al 4,1% en las mujeres. Además, es un hábito que aumenta a medida que se incrementa la edad de la población. El grupo de hombres es también el que registra más borracheras, especialmente entre los 15 a 34 años, situándose en un 37,5% en los últimos 12 meses. La prevalencia de las borracheras en los últimos 30 días supone un 6,5% de la población, siendo mayor entre los jóvenes de 15 a 24 años: un 18,2% de los chicos y el 11,5% en las chicas. El grupo de 20-24 años es el que registra una mayor prevalencia de consumo en atracón y es un patrón más acusado entre el grupo de hombres, con una mayor diferencia respecto al colectivo de las mujeres en el grupo de 30 a 34 años.

La cocaína en polvo o base se consume por primera vez en torno a los 21 años. La prevalencia de consumo a los 15-24 años en los hombres es del 3,8% y aumenta al 5,2% entre los 25 a 34 años. En el resto de grupos de mayor edad el consumo va en descenso. En las mujeres su consumo está menos extendido. En ellas, se observa una prevalencia del 1,6% entre los 15 a 24 años, que va descendiendo con la edad.

Tanto en hombres como en mujeres, los mayores porcentajes de episodios de urgencia relacionada con el consumo de drogas son motivados por la cocaína (40,9%) y el alcohol (35,8%), aunque el alcohol se contabiliza únicamente cuando se presenta junto con otras drogas, por lo que solo se conoce su impacto de forma parcial. De nuevo son los hombres los que registran un mayor porcentaje. La cocaína sigue siendo la droga ilegal que causó un mayor número de admisiones a tratamiento (36,6% del total) y se sitúa en segundo lugar como causa de muerte por reacción aguda a drogas (49% de las muertes). Por otra parte, se ha detectado un aumento de su presencia en los análisis toxicológicos realizados a fallecidos.

Como se puede observar, el consumo de drogas es especialmente prevalente en la población más joven. La Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD) publica cada dos años una encuesta sobre Uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias de 14 a 18 años de toda España (ESTUDES). En el informe más reciente (ESTUDES, 2016) los resultados son similares a los encontrados por la encuesta EDADES 2015, pero nos ofrecen una fotografía más clara y dramática de la situación en este grupo de edad.

Entre los estudiantes de 14 a 18 años el inicio en el consumo de bebidas alcohólicas tiene lugar a los 14 años, sin diferencias por sexo, mientras que el consumo de cocaína comienza a los 15,1 años y hay una marcada diferencia por sexo, comenzando antes en los chicos. El 76,9% ha probado el alcohol alguna vez en la vida y la cocaína un 3,2%. En cuanto al consumo intensivo de alcohol, hay un marcado patrón de consumo en atracción o borrachera, constatándose un mayor porcentaje de ambos en las chicas más jóvenes (ver Figura 1).

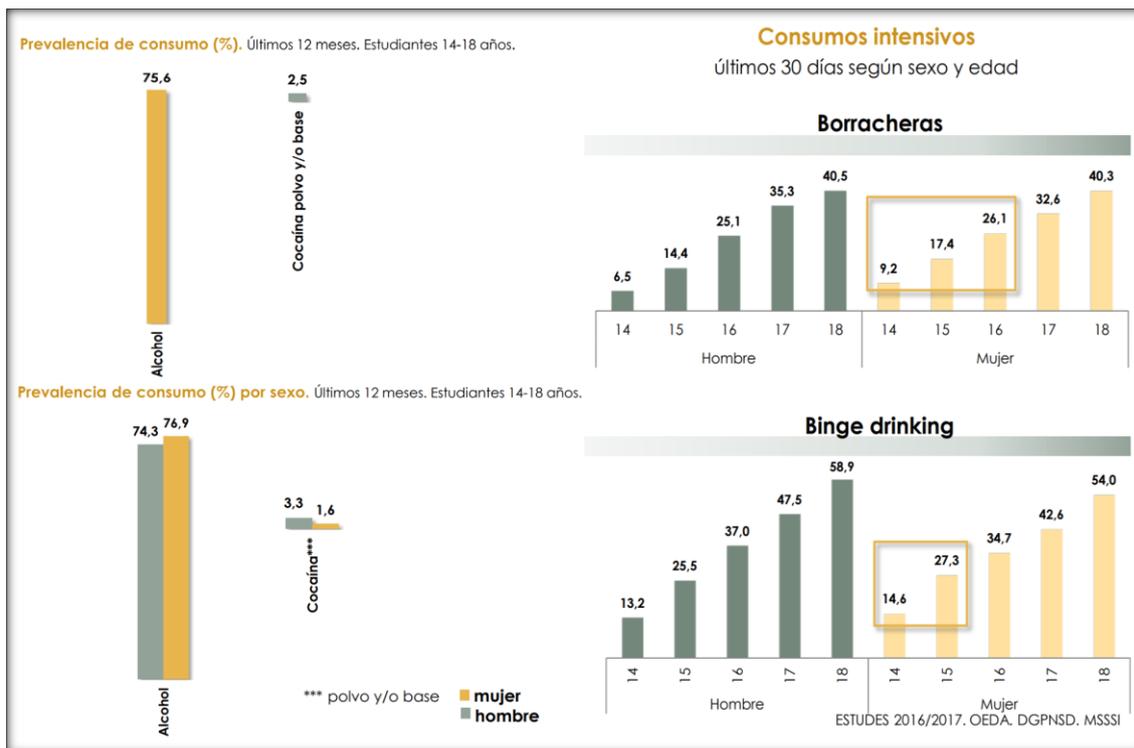


Figura 1. Porcentaje de prevalencia en el consumo de alcohol y cocaína en estudiantes de 14 a 18 años durante los últimos 12 meses y patrón de consumo intensivo (últimos 30 días y *binge drinking*) por sexo y edad. Reproducido del informe ESTUDES 2016/2017 (OEDA, DGPNSD, MSSSI).

1.2. Policonsumo

La Organización Mundial de la Salud define policonsumo como: “el consumo de más de una sustancia o tipo de sustancias, simultáneo o no, que produzca dependencia de, al menos, una de ellas”. El policonsumo de drogas (legales e ilegales) constituye un patrón cada vez más prevalente en la problemática de sustancias psicoactivas en los países desarrollados como España, tanto en la población general de 15 a 64 años, como entre los jóvenes de 14 a 18 años. El Plan Nacional sobre Drogas advierte que todo consumo implica riesgo, pero este patrón aumenta notablemente estos riesgos; potenciando los efectos de unas drogas sobre otras, reforzando la adicción, interfiriendo en el diagnóstico y dificultando el tratamiento.

Si se consideran en conjunto las drogas, tanto legales como ilegales, se ha encontrado que un 41,7% de la población entre 15 y 64 años ha realizado algún tipo de policonsumo en los 12 meses previos a la encuesta. Prácticamente la totalidad de los que consumieron dos sustancias psicoactivas en ese periodo consumió alcohol. En el tramo

temporal de los últimos 30 días, 1 de cada 3 individuos realizó policonsumo, de los cuales la mayoría consumió dos sustancias diferentes.

En general, el policonsumo es más prevalente entre los hombres en todos los grupos de edad, pero alcanza el máximo entre los 25 y los 34 años. Entre los consumidores de alcohol el policonsumo es más prevalente en el grupo que hizo botellón los últimos 12 meses. Más de la mitad de los jóvenes de 15 a 24 años que hicieron botellón en ese periodo (55,9%) consumieron al menos dos sustancias.

El consumo de alcohol y cocaína de forma concurrente está muy extendido. En la población de 15 a 64 años el 96,1% de los que consumen cocaína también consumen alcohol, mientras que un 2,5% de los consumidores de alcohol lo son también de cocaína. Este problema es especialmente acuciante entre los consumidores más jóvenes, habiéndose registrado un crecimiento en el número de estudiantes entre 15-18 años que empezaron a beber y a consumir cocaína (ESTUDES, 2016). Es posible que la combinación de alcohol y cocaína entre los consumidores esté tan extendida debido al efecto modulador que cada una de ellas ejerce sobre la otra. Los estudios clínicos muestran que el alcohol se consumiría para atenuar los efectos aversivos de la cocaína, como nerviosismo o insomnio, especialmente tras el cese de un consumo en atracón, disminuyendo de esta forma el malestar cuando los efectos de la cocaína desaparecen (Magura y Rosenblum, 2000). Inversamente, el consumo de la cocaína permitiría contrarrestar la embriaguez que produce el alcohol (McCance-Katz et al., 1993; Pennigs, Leccese y Wolf, 2002).

1.3. Ontogenia del consumo de alcohol y cocaína y diferencias por sexo

En el periodo de la adolescencia los jóvenes incrementan sus interacciones sociales y entre sus características conductuales destaca la búsqueda de sensaciones, la novedad y la recompensa, junto con la falta de juicio y control impulsivo. La aparición de estas conductas se asocia a un periodo evolutivo en el que los sujetos inician una trayectoria hacia la independencia, por lo que poseen un valor adaptativo. Estas características aparecen unidas a una respuesta alterada hacia los estímulos motivacionales, con un menor impacto de los estímulos con un valor de incentivo moderado, y una mayor sensibilidad a los acontecimientos estresantes (Spear, 2000).

En la etapa de transición hacia la madurez tienen lugar importantes cambios neuronales, especialmente en la corteza prefrontal, que sustenta habilidades cognitivas y

el control ejecutivo, así como en el sistema dopaminérgico mesolímbico, centro de la sensibilidad hacia la novedad y la recompensa. Estudios con humanos y animales sugieren que las especiales características de un cerebro en desarrollo pueden ser factores que predispongan a las conductas de riesgo, incluyendo el consumo de alcohol y otras drogas de abuso (Chambers, Taylor y Potenza, 2003; Spear, 2000, 2002 y 2013), por lo que esta vulnerabilidad durante la adolescencia podría estar, al menos en parte, determinada biológicamente. Además, la exposición al alcohol y a otras drogas durante la adolescencia tiene la capacidad potencial de producir alteraciones críticas en los procesos de un cerebro en desarrollo y desembocar en consecuencias a largo plazo. Así, existe evidencia que apunta a una relación entre el consumo temprano de alcohol y otras drogas con diversos trastornos neuropsiquiátricos, déficits cognitivos, agresividad y abuso de alcohol en etapas posteriores. Estos datos señalan la necesidad de realizar estudios experimentales que ayuden a desvelar los factores específicos responsables de la vulnerabilidad en el inicio y mantenimiento del consumo de alcohol y cocaína durante la adolescencia.

Por otra parte, se sabe que existen diferencias en el patrón de comportamiento adictivo en función del sexo. Aunque los estudios epidemiológicos sugieren que el abuso de drogas está más extendido entre los hombres parece que la prevalencia se está incrementando en las mujeres. Los estudios clínicos muestran que las mujeres difieren de los hombres en las respuestas biológicas y subjetivas a diferentes drogas. Así, se ha observado que las mujeres comienzan antes a consumir cocaína, muestran más signos de intoxicación que los hombres con dosis similares de alcohol, tardan menos en llegar a ser adictas a la cocaína y al alcohol, además de mostrar un hábito más severo y periodos más cortos de abstinencia una vez iniciado el consumo (Roth, Cosgrove y Carroll, 2004). Estas conclusiones han sido corroboradas por experimentos con animales, que indican que las ratas hembra desarrollan una respuesta más robusta durante la administración aguda de cocaína, con un efecto reforzante superior, una gran activación motora, presencia de estereotipias y mayor activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (Festa et al., 2004). Además, ratas y monos hembra han mostrado mayores niveles y mayor frecuencia de consumo de alcohol que los machos cuando tuvieron disponible bebida con etanol.

Aunque los mecanismos que median las diferencias sexuales en la respuesta conductual, neurológica y farmacológica del consumo de alcohol y cocaína son bastante desconocidos, diversos estudios clínicos y preclínicos señalan que estarían implicados los niveles de neurotransmisores, dopamina y serotonina principalmente, diferencias en el metabolismo de la cocaína (Festa et al, 2004) y las hormonas ováricas, particularmente el estrógeno (Lynch, Roth y Carrol, 2002), habiéndose demostrado que el patrón de consumo varía durante el ciclo estral. En conjunto estos datos sugieren que las mujeres son más vulnerables que los hombres a los efectos reforzantes de la cocaína y el alcohol durante las fases de inicio, mantenimiento y la recaída en la adicción (Lynch y Carroll, 2000), pero se precisan nuevas investigaciones que ayuden a desarrollar tratamientos apropiados para hombres y mujeres.

1.4. Toxicidad

La presencia de etanol en el organismo altera la biotransformación de la cocaína mediante una transesterificación que genera el metabolito cocaetileno, alteración que no está presente cuando la cocaína es administrada de forma individual (Harris, Everhart, Mendelson y Jones, 2003; Pennings, Leccese y Wolff, 2002; McCance-Katz et al., 1993). El cocaetileno tiene propiedades reforzantes positivas similares a las de la cocaína, habiéndose comprobado que ratas de laboratorio se la autoadministran en modelos animales de autoadministración intravenosa de drogas (Landry, 1992).

El cocaetileno intensifica los efectos eufóricos de la cocaína y está asociado con un mayor riesgo de muerte súbita que el uso único de la cocaína. La presencia en el organismo de cocaetileno se ha asociado con convulsiones, cardiotoxicidad, daño hepático, problemas en el sistema inmunitario (Pennings et al. 2002) y puede llegar a ser letal (Schechter y Meehan, 1995). Afecta también a la contractilidad del miocardio en mayor medida que la cocaína (Qiu y Morgan, 1993). El cocaetileno se comporta como un potente bloqueador de los canales de sodio en el miocardio, prolongando la cardiotoxicidad en mayor medida comparada con la generada por la cocaína o el alcohol por separado. Por otro lado, otros estudios encuentran que los usuarios dependientes de alcohol y cocaína tienen problemas psicológicos más graves que los consumidores de cocaína que no son alcohólicos y presentan una mayor pérdida de memoria a corto plazo, a largo plazo y una menor habilidad motora (Pennings, et al. 2002). Los consumidores de cocaína con dependencia del alcohol presentan patologías propias de la combinación de

ambas sustancias, lo que con frecuencia conlleva un agravamiento de los síntomas psiquiátricos (Roy, 2001).

De los diferentes estudios revisados se desprende que los efectos tóxicos del cocaetileno que se genera tras la administración conjunta de alcohol y cocaína estarían potenciados e irían más allá de los efectos aditivos de la administración de ambas drogas por separado. Se constata por tanto la necesidad de desarrollar estudios enfocados a descubrir otros posibles metabolitos y/o rutas metabólicas que podrían estar alterados cuando ambas drogas se consumen de forma combinada.

1.5. El enfoque de la metabolómica

El metaboloma es el conjunto de moléculas de pequeño tamaño presentes en un organismo (metabolitos), ya sean sintetizados por el propio organismo o incorporados desde el exterior. La metabolómica permite captar el efecto de un estímulo externo sobre el metaboloma endógeno, entendido este como la totalidad de pequeñas moléculas que están implicadas en diferentes rutas metabólicas necesarias para el mantenimiento, crecimiento y funcionamiento normal de la célula.

Según la definición del Centro de Investigación Biomédica en Red para las enfermedades metabólicas del Instituto de Salud Carlos III (CIBERMED), *“La metabolómica es la ciencia encargada del estudio sistemático del perfil metabolómico de un proceso biológico. La metabolómica estudia los perfiles metabólicos en muestras biológicas (fluidos, tejidos, cultivos celulares, etc.) con la finalidad de descubrir enfermedades y factores de riesgo y determinar biomarcadores”*. En el campo de la psicobiología de las adicciones, aunque de implantación reciente, la metabolómica se presenta como una herramienta en la detección de biomarcadores que podrían servir como indicadores de toxicidad o de susceptibilidad al consumo compulsivo de alcohol y/o cocaína en humanos y en modelos animales (Harrigan, Maguire y Boros, 2008; Pedraza et al., 2015; Zaitsev et al., 2014). Frente a otras ciencias “ómicas” (genómica, transcriptómica y proteómica) la metabolómica es la más cercana al fenotipo³ (Figura 2) permitiendo una visión global y en tiempo real de los efectos bioquímicos y fisiológicos del consumo de drogas. Por ello es una técnica poderosa no solo para complementar los

³ Conjunto de caracteres visibles que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo y el medio.

datos derivados de la genómica, transcriptómica y proteómica, sino también para investigar los cambios fenotípicos causados por estímulos exógenos de forma más predictiva que otros enfoques “ómicos”. Además, aunque es difícil extrapolar completamente los resultados obtenidos con animales a los humanos tiene como ventaja que el metaboloma es muy similar entre especies.

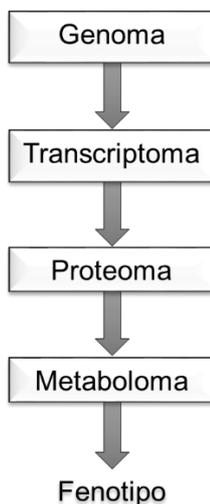


Figura 2. En la figura se representa la cascada de las ciencias “ómicas” y se aprecia que el metaboloma está situado en la parte inferior, siendo el más cercano al fenotipo (Basada en Zaitzu, Hayashi, Kusano, Tsuchihashi y Ishii, 2016).

1.6. Contextualización del estudio

Los experimentos y los datos que se presentan en este Trabajo Fin de Máster (TFM) forman parte de un proyecto de investigación más amplio financiado por la DGPNSD y que se lleva a cabo actualmente en el Departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la UNED. La dirección de estos trabajos está a cargo del catedrático Dr. Emilio Ambrosio y se han realizado en colaboración con el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Alcalá de Henares. El Laboratorio de Psicobiología es pionero en el desarrollo de estudios sobre las posibles alteraciones metabólicas inducidas por el consumo conjunto de alcohol y cocaína. Dicha investigación tiene como objetivo principal estudiar el efecto que la exposición crónica a cocaína y/o alcohol, mediante administración pasiva o por autoadministración, pueda tener sobre el metaboloma de dos importantes sistemas como son el plasma y el tejido encefálico en estructuras cerebrales que están implicadas en el proceso de adicción a drogas.

1.6.1. Experimentos de administración pasiva

En el primer proyecto, titulado “*Efectos del consumo conjunto de alcohol y cocaína en la adolescencia sobre las concentraciones plasmáticas de aminoácidos y sobre el sistema inmunitario*” se desarrolló un modelo de administración pasiva de alcohol y cocaína en ratas por vía intravenosa. Es cierto que los modelos animales no son similares en todos los aspectos a la complejidad que manifiesta el comportamiento humano, pero cada uno de ellos emula un conjunto de características que son centrales para los trastornos, eliminando factores socioculturales que podrían oscurecer las conclusiones de los estudios clínicos. Por ello, los modelos animales que utilizan roedores para el estudio de los factores conductuales y neurobiológicos asociados a la adicción a las drogas están ampliamente aceptados. En este estudio se realizaron experimentos con un control riguroso de las variables que podrían afectar al metabolismo y que no sería posible controlar en la investigación con humanos, como el historial de consumo de drogas, la dieta o los ritmos circadianos.

En este primer estudio, los experimentos incluyeron ratas macho y hembra con dos edades diferenciadas, 51 y 95 días de vida al inicio del tratamiento. En humanos 51 días corresponderían con la etapa de adulto joven, en torno a los 21-24 años (Spear, 2000), mientras que los 95 días corresponderían a un adulto pleno. Este último grupo de ratas adultas se incluyó para contar con datos de este grupo de edad. Como vimos anteriormente, sexo y edad son variables que podrían tener una influencia diferencial en las alteraciones metabólicas derivadas de la administración de las drogas.

Aunque las vías más comunes de administración del alcohol y la cocaína en humanos son oral e inhalada respectivamente, la ventaja de la administración intravenosa es que permite un control más efectivo de variables farmacológicas, especialmente las farmacocinéticas. Se evita la aversión que los animales muestran ante la administración oral de alcohol, los efectos de la absorción en el tracto digestivo y se consigue una exposición cerebral más rápida, resultando en un control más preciso de la exposición a la droga (Windisch, Kosobud y Czachowski, 2014).

Puesto que en este proyecto las ratas recibían pasivamente las sustancias, la cantidad de cocaína suministrada en cada sesión se estableció tomando como referencia estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación. Así, se controló que los animales recibieran una cantidad igual a la que las ratas se autoadministraron bajo un

programa de reforzamiento en el estudio de Miguéns et al. (2008) y con un patrón similar. Para determinar la cantidad de alcohol se tuvieron en cuenta las cantidades reportadas por Kozawa et al. (2007) en un estudio sobre los efectos metabólicos de diferentes dosis de alcohol.

Los análisis realizados sobre las muestras de plasma se llevaron a cabo siguiendo diferentes enfoques, uno metabolómico no-dirigido y un análisis metabolómico dirigido (ver Figura 3).

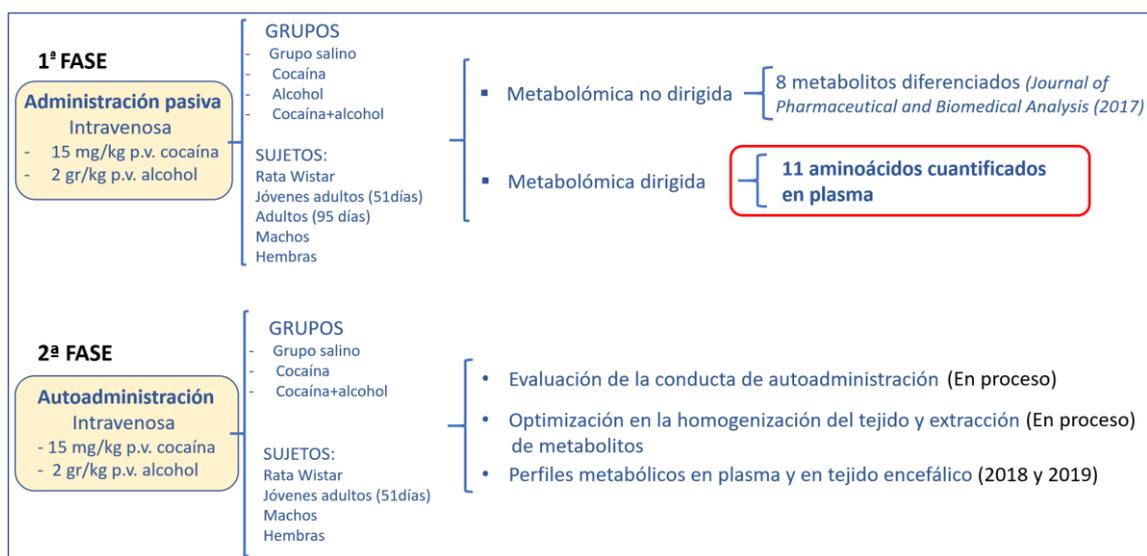


Figura 3. Esquema de los procedimientos experimentales desarrollados por el equipo de investigación del Departamento de Psicología de la UNED para el estudio del consumo conjunto de alcohol y cocaína desde una aproximación metabolómica. Se indican las fases de cada uno de ellos y se remarca en rojo la fase a la que corresponden principalmente los datos que se analizan en este TFM.

1.6.1.1. Análisis metabolómico no-dirigido

Sobre las muestras de plasma obtenidas en ratas tratadas de forma pasiva se llevó a cabo un análisis mediante metabolómica no-dirigida, es decir, centrándose en todos los metabolitos que pudieran ser detectados por las técnicas empleadas. Que conozcamos, este trabajo supone el primer estudio de tipo metabolómico sobre la administración combinada de alcohol y cocaína y los resultados han sido publicados recientemente (Sánchez-López et al. 2017). Brevemente, se encontraron diferencias significativas en los patrones de metabolitos entre cada grupo de estudio (alcohol, cocaína, alcohol + cocaína y control salino). Del subgrupo de variables que mejor diferenciaba los grupos, 120

correspondían a compuestos de origen endógeno, principalmente aminoácidos y derivados, dipéptidos y poliaminas. Se identificaron inequívocamente un total de ocho metabolitos (carnosina, espermidina, metionina, cistationina, ácido argininosuccínico, trans-4-hidroxi prolina, N-ε-acetil-L-lisina y serotonina), que estaban principalmente relacionados con el metabolismo de diferentes aminoácidos. La tendencia más común fue que cuando había diferencias entre la administración separada de alcohol y cocaína respecto al grupo control salino, también había diferencias entre el grupo de administración conjunta de las drogas y el grupo control, comportándose igual que las drogas administradas independientemente. Las diferencias significativas en la mayoría de los metabolitos se encontraron entre cocaína y alcohol suministradas individualmente vs. la administración combinada. Asociando los cambios observados con las vías metabólicas implicadas, se concluyó que procesos como el estrés oxidativo pueden estar afectados por el consumo crónico de las drogas.

1.6.1.2. Análisis metabólico dirigido

Con las mismas muestras de plasma del estudio anterior se realizó, también, un análisis de perfil de metabolómica dirigida donde se midió un conjunto específico de metabolitos que abarcaba 11 aminoácidos. Los experimentos que se describen en este TFM y los datos analizados corresponden a esta fase (Figura 3).

Utilizando técnicas de química analítica, se midieron las concentraciones plasmáticas de los aminoácidos L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-ornitina, L-glutamina, L-alanina, L-treonina, glicina, L-serina, taurina y L-glutamato. Por lo que sabemos, la única investigación que existe sobre los efectos de la administración conjunta de alcohol y cocaína sobre el metaboloma es la realizada por el Departamento de Psicobiología, ya comentada anteriormente. Por tanto, en el muestreo de las variables que podrían ser relevantes para este estudio se tuvo en consideración la importancia que los aminoácidos mostraron tener en dicho estudio.

El consumo de drogas puede influir en la aparición de otros trastornos neuropsicológicos en los que distintos aminoácidos neurotransmisores estarían alterados. Por ello se revisó la literatura en la que se han reportado análisis metabólicos en diferentes trastornos neuropsiquiátricos y en los que se han encontrado desequilibrios en el balance de aminoácidos relevantes para el funcionamiento normal del sistema nervioso central (SNC) (Altamura, Mauri, Ferrara y Moro, 1993; Lorenzo, Villaseñor,

Ramamoorthy y Garcia, 2013; Wu, 2009). Sería el caso de los trastornos de ansiedad, depresión mayor (Altamura, Maes, Dai y Meltzer, 1995; Mauri et al., 1998; Mitani et al., 2006; Lu et al., 2014), el trastorno bipolar, el autismo (Aldred, Moore, Fitzgerald y Waring, 1983; Frustaci et al., 2012), el déficit de atención con hiperactividad (Zavala et al., 2001) y la esquizofrenia o la epilepsia (Huxtable, Laird, Lippincott y Walson, 1983), que sabemos tienen una alta comorbilidad con la adicción a las drogas.

1.6.2. Experimentos de autoadministración

El segundo proyecto que se está llevando a cabo actualmente en el Laboratorio de Psicobiología se titula “*Estudio metabólico del consumo conjunto de alcohol y cocaína*” y se encuentra en fase de desarrollo. En diversos estudios se han encontrado efectos neuroquímicos diferenciados en función de que la administración de las drogas fuera contingente a las respuestas del individuo o no contingente (Crespo et al, 2003, 2002 y 2001a; Miguens et al., 2008). Es decir, en función de que los sujetos se autoadministraran la droga o la recibieran pasivamente. Los modelos animales de autoadministración intravenosa de drogas, además de su abundante presencia en la literatura científica, han mostrado su validez para predecir el potencial de abuso de las sustancias con efectos psicoactivos (Griffiths y Balster, 1979). Por esta razón, parece de gran interés establecer comparaciones entre el procedimiento de administración pasiva de las drogas y el de autoadministración mediante programas de refuerzo respecto a las posibles alteraciones metabólicas que la administración combinada de alcohol y cocaína puedan producir.

Este estudio no incluye grupos de animales con autoadministración de alcohol de forma individual dado que en la literatura existe evidencia de que la metodología de autoadministración intravenosa no permite superar completamente las propiedades aversivas que el etanol tiene para las ratas (Windisch et al, 2014).

Como novedad, en este TFM se expondrán a título informativo resultados preliminares sobre la conducta de autoadministración que vienen a apoyar la cantidad y distribución de las dosis que se administraron a las ratas de forma pasiva en los experimentos del proyecto anterior, confirmando mayor consistencia a aquellos resultados.

1.7. Objetivos e hipótesis

En el contexto de los proyectos descritos anteriormente se pretende estudiar el efecto que la exposición crónica a cocaína y/o alcohol pueda tener sobre el metaboloma mediante la administración pasiva de las drogas a ratas de laboratorio jóvenes y adultas de ambos sexos. La complejidad de un estudio metabolómico, en el que múltiples variables deben ser recogidas, con muchos factores relevantes que pueden estar influyendo y en el que las variables pueden estar correlacionadas entre sí en diferentes grados, requiere un enfoque mediante técnicas que permitan su análisis simultáneo. Las técnicas de análisis multivariado (AM) son especialmente adecuadas en áreas de investigación en las que se requiere simplificar la estructura del fenómeno estudiado, permitiendo una interpretación más fácil, la creación de grupos de variables similares entre sí, el estudio de la relación de dependencia entre las variables o la construcción de modelos que conduzcan a generar hipótesis sobre los fenómenos estudiados que puedan ser sometidas a contraste (Arias, 2008).

Los estudios metabolómicos generan grandes conjuntos de datos que suponen un gran desafío para el análisis. Cuando se lleva a cabo un estudio de este tipo se persiguen principalmente objetivos como visualizar diferencias globales, tendencias y relaciones entre las muestras y las variables, discernir qué metabolitos son responsables de esos cambios y la construcción de modelos para la predicción de los efectos biológicos en nuevas muestras. La metabolómica ha hecho un uso extensivo de técnicas de AM en diferentes ámbitos de la salud, especialmente las técnicas de análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante, análisis de conglomerados o escalamiento multidimensional entre otras. Sin embargo, en este ámbito, existe la necesidad de evaluar muchos otros métodos en cuanto a su capacidad de reducir la dimensionalidad de los datos, la clasificación y la creación de conglomerados (Lindon, Nicholson y Holmes, 2011).

El análisis factorial exploratorio (AFE) es un procedimiento matemático-estadístico destinado a reducir la información relativa a un conjunto de variables obteniendo un grupo más reducido de ellas, pero capaz de explicar la variabilidad común en el conjunto de variables iniciales (Jiménez, Flores y Gómez, 2000). En AFE cada una de las variables medidas se considera una combinación de factores comunes y un factor único. Los factores comunes son variables latentes que influyen a más de una variable y explican las correlaciones que existen entre ellas, mientras que el factor único en una

variable latente que solo influye a cada variable individualmente y consta de una parte sistemática y una parte debida al error de medida. Se trata por tanto de una técnica multivariada que permite estudiar las dimensiones subyacentes a las relaciones entre variables y su éxito radica en que puede ser aplicada al estudio de la dimensionalidad en cualquier dominio de contenido, ya se trate de fenómenos físicos, fisiológicos, psíquicos o sociales (Yela, 1997).

Dado el carácter novedoso de las investigaciones que se están llevando a cabo en nuestro laboratorio y a la escasez de estudios que nos guíen, esta técnica nos puede permitir desarrollar estructuras y modelos con la única hipótesis previa de que existen factores comunes que explican la presencia de correlaciones entre las variables, sin precisar el número de factores, ni la relación de estos con las variables analizadas. El balance en las concentraciones de aminoácidos como el glutamato y la glutamina o la serina y la glicina está relacionado. Las alteraciones en estos balances se han asociado con trastornos neurodegenerativos (Coyle y Puttfarcken, 1993), la depresión o la esquizofrenia (Altamura, Mauri, Ferrara y Moro, 1993; Mitani et al., 2006), que en muchos casos se dan concurrentemente con el consumo crónico de las drogas, proporcionándonos un marco teórico de partida.

Por todo ello, el objetivo principal de este trabajo se centrará en la evaluación de la técnica AFE como herramienta útil para encontrar patrones que expliquen la variabilidad común en los datos y que permitan avanzar en el conocimiento de los efectos que la administración conjunta de alcohol y/o cocaína puedan ejercer sobre las concentraciones plasmáticas de un conjunto de 11 aminoácidos; L-prolina, L-isoleucina, L-leucina, L-ornitina, L-glutamina, L-alanina, L-treonina, glicina, L-serina, taurina y L-glutamato.

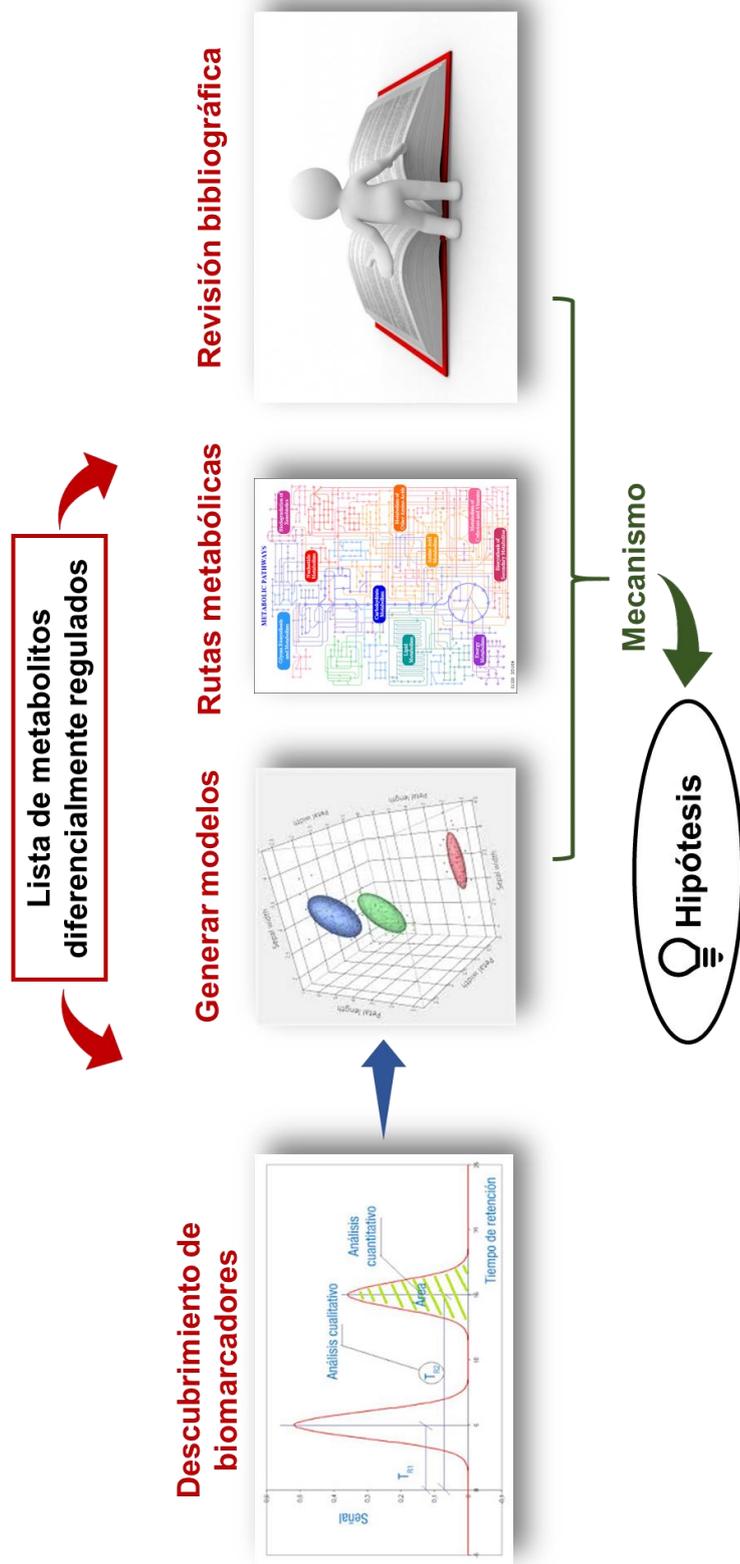
Una vez se hayan explorado y resumido los datos, determinaremos la estructura dimensional de los mismos mediante AFE. Se plantea que será posible reducir las variables (11 aminoácidos) a una estructura factorial más simple sin pérdida apreciable de información. A partir de los factores y las puntuaciones factoriales que se obtengan se realizarán comparaciones por sexo, edad y grupo de administración (salino, alcohol, cocaína y alcohol + cocaína), hipotetizando que habrá diferencias significativas en las diferentes dimensiones en función de estas variables.

El propósito es localizar patrones en estos aminoácidos, que se ha considerado que podrían ser relevantes y que estarían alterados cuando el alcohol y la cocaína se

consumen combinadas, identificando dimensiones de variabilidad conjunta que posteriormente sería posible asociar a vías metabólicas importantes para los procesos fisiológicos y neurobiológicos de un organismo (ver Figura 4).

Los aminoácidos cumplen un papel regulador en vías metabólicas clave, por ello deben mantener un balance adecuado como aspecto crucial para la homeostasis. El descubrimiento de los factores que darían cuenta de las variaciones en los niveles de estos aminoácidos a través de los grupos de administración nos puede ayudar a mejorar el diagnóstico y a desarrollar tratamientos más efectivos para la adicción a estas drogas.

Figura 4. Ilustración de las fases de una investigación metabolómica típica. En nuestro caso enfocada al descubrimiento de biomarcadores de toxicidad y vulnerabilidad al consumo compulsivo de alcohol y/o cocaína en humanos y en modelos animales. El desarrollo de modelos y la ubicación de las vías metabólicas alteradas en cada caso puede ayudar a generar hipótesis para explicar la adicción que podrán ser sometidas a contraste, contribuyendo a predecir y tratar este trastorno.



2. Materiales y métodos

2.1. Sujetos

Se emplearon 90 ratas de la cepa Wistar, 45 machos y 45 hembras, criadas en el animalario de la Facultad de Psicología de la UNED. Los progenitores fueron adquiridos en *Charles River Laboratories* (Lyon, Francia), cruzando las hembras siempre con los mismos machos a fin de obtener mayor homogeneidad genética. Los animales se alojaron en grupos separados por sexo con temperatura controlada a $21 \pm 2^\circ\text{C}$, humedad relativa del 60% y un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, comenzando el periodo de luz a las 8:00 a.m. Se mantuvo el acceso al agua y alimentación *ad libitum* durante todo el experimento (A04, *Scientific Animal Food & Engineering*, Augy, Francia). Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la directiva de bienestar animal 2010/63/EU y fueron aprobados previamente por el Comité de Bioética de la UNED.

2.2. Diseño experimental

Cada camada se dividió aleatoriamente en dos mitades, destinando una primera mitad a los grupos de adultos jóvenes, con inicio del tratamiento a los 51 días de vida (50 ratas), y la segunda mitad a los grupos de adultos, que iniciaron el tratamiento a los 95 días de vida (40 ratas) (Figura 5 c). Para cada uno de estos dos grupos se equilibró el número de sujetos de cada sexo (ver Tabla 1).

Los tratamientos se administraron por vía intravenosa durante 21 días, estableciéndose un diseño experimental con cuatro grupos según las drogas administradas:

- a) alcohol (2 g/kg-p.v.)
- b) cocaína (15 mg/kg-p.v.)
- c) alcohol + cocaína (2 g/kg-p.v. + 15 mg/kg-p.v.)
- d) control salino (0,9% p/v de cloruro sódico)

Los animales fueron asignados aleatoriamente a los tratamientos.

Tabla 1. Tamaño muestral de cada grupo en función del tratamiento, el sexo y la edad de las ratas al comienzo de la administración de las drogas ($N = 90$).

		Edad	
		Joven	Adulto
	Tratamiento		
Macho	Alcohol	n = 7	n = 5
	Cocaína	n = 5	n = 5
	Alcohol + Cocaína	n = 6	n = 6
	Salino	n = 6	n = 5
Hembra	Alcohol	n = 7	n = 5
	Cocaína	n = 7	n = 4
	Alcohol + Cocaína	n = 6	n = 5
	Salino	n = 6	n = 5

2.3. Reactivos y productos químicos

El etanol al 96% (v/v), apto para uso como excipiente, los patrones de los 11 aminoácidos cuantificados (L-prolina 99%, L-isoleucina 99%, L-leucina, L-ornitina 98,5%, L-glutamina 99%, L-alanina 99%, L-treonina 99%, glicina 99%, L-serina, taurina y L-glutamato 99%), ácido bórico, ácido L-2-aminodípico, metanol (grado analítico), β -ciclodextrina y NBD-F (4-fluoro-7-nitrobenzofurazán) fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Alemania). El porcentaje en cada producto indica su grado de pureza. La cocaína (clorhidrato de cocaína) fue suministrada por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Todas las disoluciones se realizaron con agua purificada mediante el sistema de purificación *Milli-Q Plus* (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.).

2.4. Cirugía

Para la administración intravenosa de las drogas se implantó un catéter de polivinilcloruro (1 mm de diámetro externo y 0,5 mm de diámetro interno) cuyo extremo de silicona se insertaba en la vena yugular derecha, profundizando hasta el atrio. Durante la cirugía se empleó como anestésico gas isoflurano al 2,5% (La Bouvet, Francia) (Figura 5 a). El catéter se condujo de forma subcutánea hasta su salida en la zona escapular media (Figura 5 b). La cirugía se realizó a los 42 días de vida en el caso de las ratas adultas jóvenes y a los 86 días de vida en el caso de las adultas (Figura 5 c), estableciéndose un

periodo de recuperación mínimo de 5 días. Tras la intervención las ratas se alojaron en cajas-hogar individuales, donde permanecieron el resto de días que duró el experimento.

La funcionalidad de la vía se comprobó el primer y último día de tratamiento mediante una infusión de tiopental sódico (10 mg/kg). El catéter se considera funcional si se advierte descoordinación motora manifiesta entre 2-5 segundo después de la infusión. Los catéteres se mantuvieron operativos mediante una infusión diaria de 0,2 ml de suero salino que contenía 100 unidades de heparina (anticoagulante) para evitar obstrucciones y 0,10 mg/ml de gentamicina (antibiótico) para evitar infecciones.

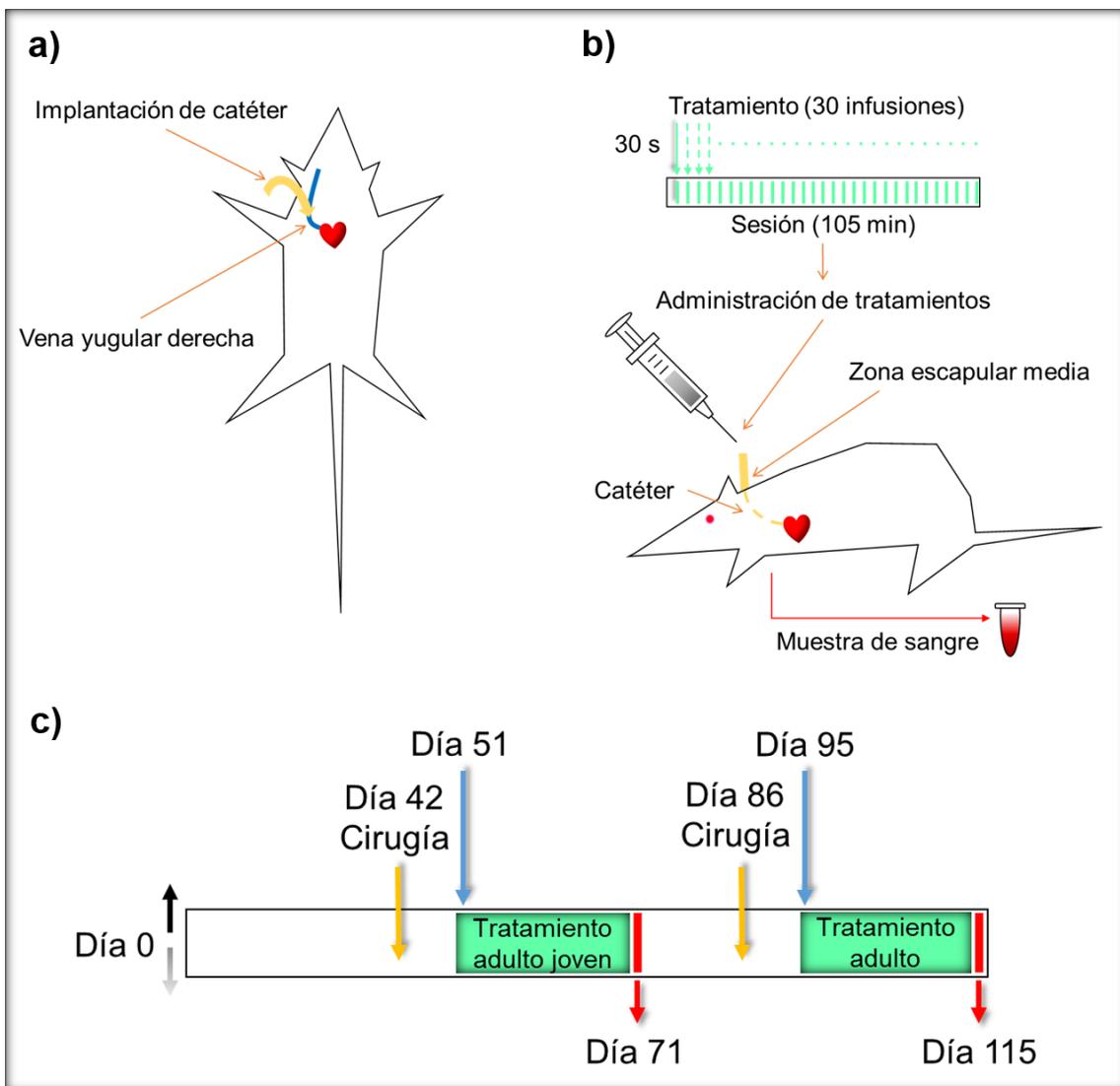


Figura 5. a) Cirugía para la implantación del catéter, b) situación de la vía y esquema del procedimiento de administración intravenosa de los tratamientos durante cada sesión (30 infusiones de 30 segundos cada una), c) cronograma del experimento.

2.5. Protocolo de administración de las drogas

En cada una de las 21 sesiones que duró el tratamiento, las ratas recibieron de forma pasiva 30 infusiones de 30 segundos a intervalos regulares durante un tiempo de 105 minutos (Figura 5 b). Las drogas se disolvieron en el mismo medio que el grupo control salino (0,9% p/v de cloruro sódico), ajustando las dosis suministradas cada 3 días en función del peso de cada rata. La principal ventaja de la administración intravenosa es que proporciona un mejor control de las variables farmacocinéticas. La sustancia llega directamente al torrente sanguíneo sin necesidad de mecanismos de absorción.

La administración de los tratamientos se llevó a cabo en cajas de Skinner (*Coulbourn Instruments*, Allentown, PA, EE. UU.). El sistema de administración consistió en una bomba (*Harvard 22, Harvard Apparatus*, Holliston, MA, EE. UU.) conectada a una interfaz que era controlada mediante un programa realizado *ad hoc* con el software MED-PC para Windows (*Med Associates Inc.*). Una vez en el interior de la caja, cada rata era conectada a la bomba de administración de modo que las sustancias pudieran fluir hacia el torrente sanguíneo (ver Figura 6). Al inicio de cada sesión, la luz de la caja se encendía, señalando el inicio del programa de administración, y se apagaba transcurridos 105 minutos.

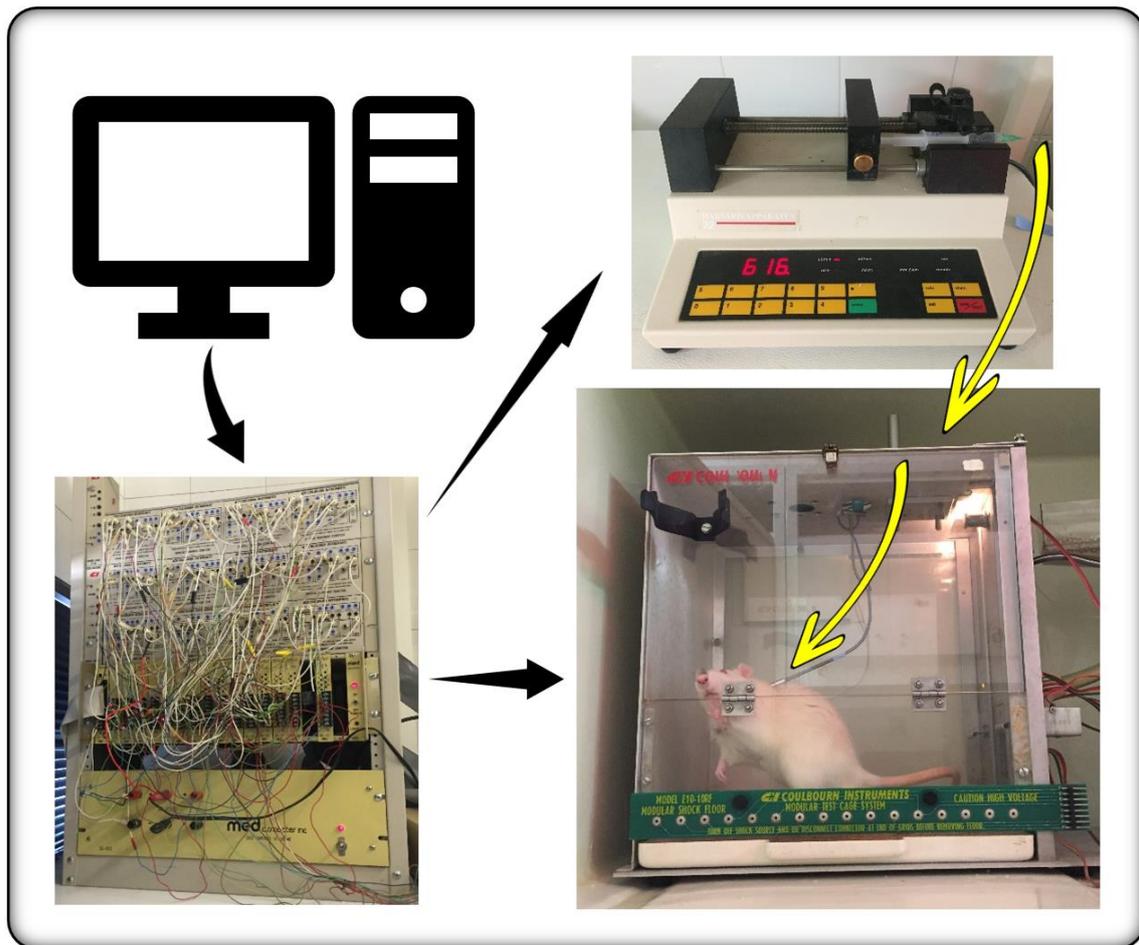


Figura 6. Esquema del sistema de administración de los tratamientos. El software controla una interfaz conectada a la bomba y a la caja de Skinner para iniciar y finalizar el programa de administración. La rata recibe el tratamiento a través de un catéter conectado a la vía. El catéter está protegido contra mordeduras y dispone de un tornillo giratorio para evitar que se enrolle impidiendo fluir las sustancias.

2.6. Obtención del plasma sanguíneo

El día 21 del tratamiento, 15 minutos después de finalizar la sesión, las ratas se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron 2 ml de sangre de cada sujeto en tubos *ependorf* previamente heparinizados y se centrifugaron a $1500 \times g$, $4^\circ C$, durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y quedó almacenado a $-70^\circ C$. Las proteínas plasmáticas fueron extraídas mediante un aparato de ultrafiltración (*Centrifree, Merck Millipore*, Irlanda) utilizando un filtro de 30 kDa.

2.7. Cuantificación de los aminoácidos

Las muestras de plasma previamente filtradas fueron utilizadas para la cuantificación de los aminoácidos utilizando como técnica analítica electroforesis capilar con detección mediante fluorescencia inducida por láser (*Capilar Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence*, CE-LIF). La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación muy versátil empleada en diferentes áreas de investigación que permite separar diversos analitos. La separación se basa en la diferente movilidad que produce un campo eléctrico sobre moléculas cargadas eléctricamente (iones) confinadas en un fino capilar relleno de un medio conductor (Figura 7). Se utiliza con frecuencia para detectar cambios en los perfiles metabólicos de fluidos corporales. El método analítico empleado ha sido optimizado y validado recientemente por Lorenzo et al. (2013) para la detección de aminoácidos en muestras de plasma.

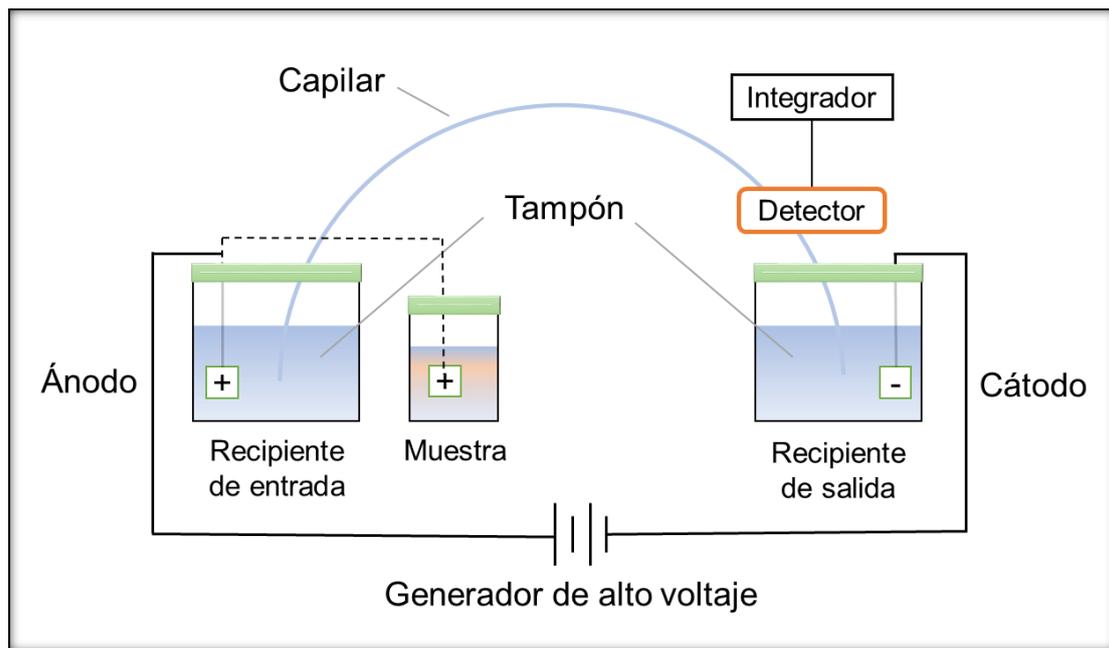


Figura 7. Representación de los elementos de un sistema de CE. Dos recipientes llenos de disolución tampón conectan los extremos de un capilar que contiene una solución electrolítica y que, por tanto, permite el paso de la corriente eléctrica. Ambos extremos, ánodo (+) y cátodo (-), albergan electrodos conectados a un generador de alto voltaje. Situando una muestra en el extremo anódico y aplicando un campo eléctrico a través del líquido los iones de la muestra migrarán a diferentes velocidades en función de las relaciones carga/masa hasta el extremo catódico, donde está situado el detector. Adaptado de Blanco (1998).

La electroforesis capilar es una técnica de análisis químico que permite el empleo de múltiples factores de separación físicos y químicos combinados con diversas técnicas de detección. Entre las ventajas de esta técnica cabe destacar el mínimo consumo de muestras y reactivos, sensibilidad a pequeñas cantidades de aminoácidos, alta eficacia en las separaciones, excelente resolución, permite modificar múltiples variables analíticas y los tiempos de análisis son muy rápidos, oscilando entre 5-60 minutos (Blanco, 1998, Doroteo, 2012; Lorenzo et al., 2013).

El equipo utilizado fue un PA 800 Plus (*Beckman Coulter Inc.*) que disponía de un capilar de sílice fundida de 60,2 cm de longitud total, con un diámetro interno de 75 μm . En este capilar se produjo la separación de los componentes de la muestra al aplicar una elevada diferencia de potencial (+21 kV). Las muestras fueron derivatizadas añadiendo el marcador fluorescente (fluoróforo) NBD-F (4-fluoro-7-nitrobenzofurazán) en un medio alcalino formado por tampón borato (concentración 10 mM, Ph 10) en presencia de metanol y ciclodextrina. En esta disolución el NBD-F se une a los grupos amino de los aminoácidos (ver Figura 8).

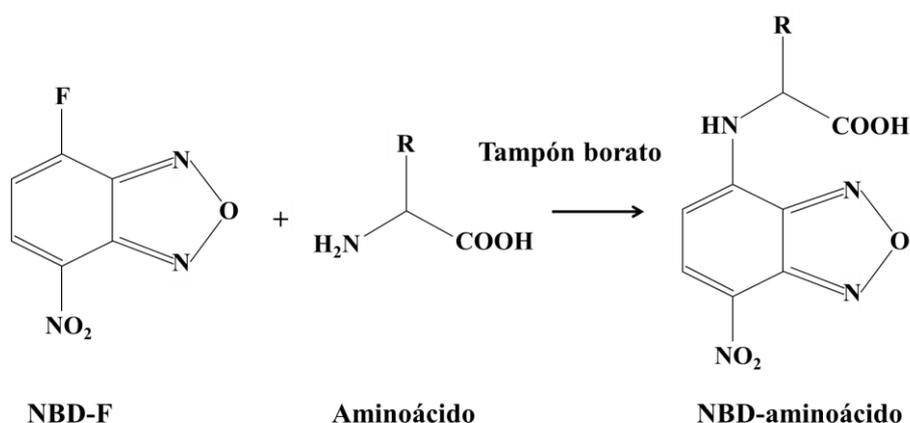


Figura 8. Esquema de la reacción de marcado de los aminoácidos con el agente fluoróforo NBD-F.

La técnica de detección empleada fue la de fluorescencia inducida por láser (LIF) con una longitud de onda de 488 nm. El resultado de la unión del NBD-F con los aminoácidos es excitado por la luz del láser incorporado en el equipo, emitiendo una onda de luz en una longitud de onda superior. La onda es detectada mediante un fotomultiplicador generando una señal en forma de pico que es proporcional a la concentración del aminoácido correspondiente. En cada electroferograma se reflejan gráficamente los resultados del análisis mediante un pico para cada uno de los 11

aminoácidos cuantificados: L-prolina (L-Pro), L-isoleucina (L-Iso), L-leucina (L-Leu), L-ornitina (L-Orn), L-glutamina (L-Gln), L-alanina (L-Ala), L-treonina (L-Tre), glicina (Gly), L-serina (L-Ser), taurina (Tau) y L-glutamato (L-Glu). Las propiedades particulares de cada aminoácido le proporcionan un tiempo de migración específico que permite su identificación (ver Figura 9).

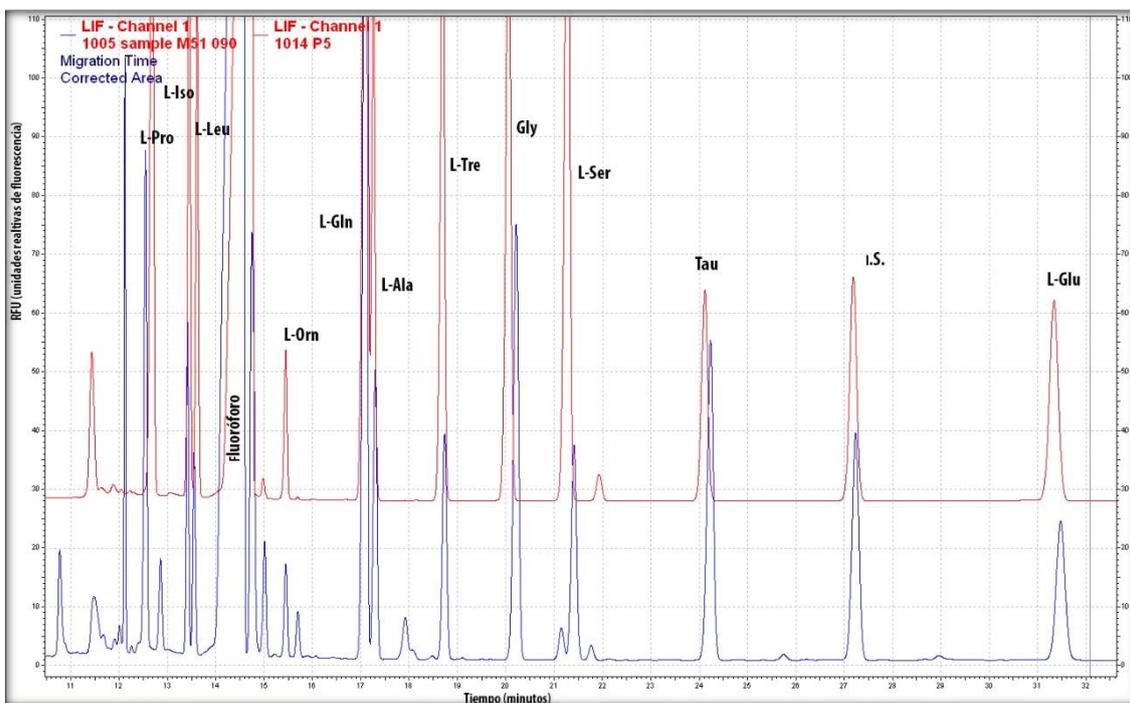


Figura 9. Imagen correspondiente a la superposición de dos electroferogramas. El superior, en rojo, muestra uno de los ocho patrones externos empleados en la confección de las rectas de calibrado. Abajo en azul se muestra el electroferograma de una muestra real. El eje de abscisas refleja el tiempo de migración de cada una de las moléculas en minutos y el eje de ordenadas se expresa en unidades relativas de fluorescencia (RFU).

Tanto en las muestras como en los patrones externos de los aminoácidos se añadió un estándar interno (IS). Su función es servir como referencia de normalización, pues acusa de igual forma que los aminoácidos presentes en muestras, o patrones, cualquier variación de las variables fisicoquímicas de la preparación de las muestras o durante el proceso de análisis. Como IS se empleó el ácido aminodípico por ser una molécula con propiedades similares a los aminoácidos, que no tiene un carácter endógeno y por lo tanto no está presente en el plasma de forma natural. Además, tiene un tiempo de migración que no interfiere con ninguno de los picos que aparecen en un electroferograma del plasma como se puede observar en la Figura 9.

El área del pico correspondiente a cada aminoácido se obtuvo mediante el software 32 Karat (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Para obtener una mejor reproducibilidad se utilizó el “área corregida”, que es una normalización de la geometría del pico que compensa posibles solapamientos parciales con otros picos o interferencias. Utilizando ocho sets de patrones para cada aminoácido (AA_x) se construyó una recta de calibrado mediante una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando la hoja de cálculo Excel (Figura 10). En el eje de abscisas se asignó el valor de la concentración de cada aminoácido en micromoles/litro y en el de ordenadas la señal medida con la siguiente normalización:

$$\frac{\text{Área corregida AA}_x / \text{Tiempo de migración AA}_x}{\text{Área corregida IS} / \text{Tiempo de migración IS}}$$

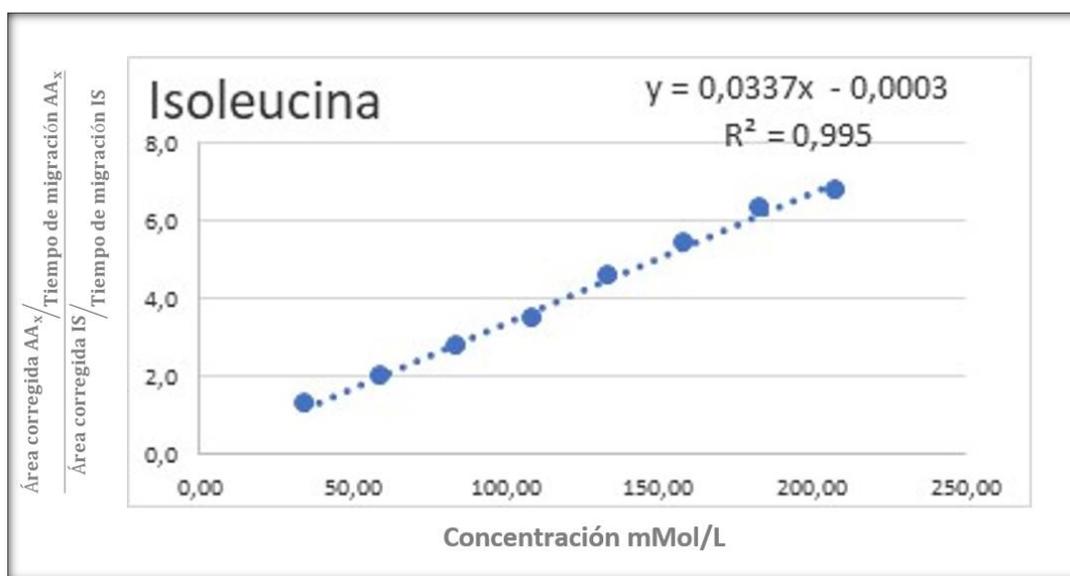


Figura 10. Recta de calibrado para el set de ocho patrones del aminoácido L-isoleucina.

Al dividir el área del pico entre su tiempo de migración se compensa el sesgo derivado de las posibles variaciones en el tiempo de migración de las moléculas entre diferentes electroferogramas. La inclusión en el denominador de la misma ratio aplicada con anterioridad al IS tiene como objetivo compensar, según indicamos, las posibles oscilaciones en las variaciones fisicoquímicas o sesgos en la manipulación de la muestra. Los resultados se expresaron como concentración micromoles/litro ($\mu\text{M/l}$).

2.8. Análisis estadísticos

Como paso previo a la aplicación de otras técnicas, se llevó a cabo un análisis exploratorio de los datos (ADE). Siguiendo las pautas que establece este método se observaron detenidamente los índices de centralidad, dispersión y forma, incluyendo estadísticos resistentes, se evaluaron los casos atípicos, se consideró la reexpresión de los datos y se inspeccionaron los gráficos, especialmente los de los residuos (Velleman y Hoaglin, 2012).

Mediante un análisis factorial exploratorio (AFE) se determinó la estructura dimensional de los datos tras constatar el cumplimiento de los supuestos que requiere este método.

A continuación, se trabajó con los factores y las puntuaciones factoriales que se obtuvieron para determinar posibles diferencias en la variabilidad de los datos en función del sexo, la edad y el grupo de administración de las drogas. Para este fin se llevaron a cabo sucesivos análisis factoriales de varianza (ANOVA's) en los que se incluyeron como variables dependientes las puntuaciones factoriales de cada sujeto y como factores el sexo, la edad de las ratas (jóvenes/adultas) y el grupo de tratamiento, con cuatro niveles: alcohol, cocaína, alcohol + cocaína y control salino, constituyendo un diseño 2 x 2 x 4.

Para los contrastes se fijó un nivel de significación $\alpha = .05$.

Los datos se analizaron utilizando el software de análisis estadístico SPSS 24, R y la hoja de cálculo Excel.

3. Resultados

3.1. Análisis de datos exploratorio (ADE)

3.1.1. Análisis univariado y estadística descriptiva

En el análisis de datos exploratorio (ADE) se computaron e inspeccionaron los estadísticos descriptivos de centralidad, dispersión y los índices de forma (asimetría y curtosis) respecto a las distribuciones de los 11 aminoácidos cuantificados, incluyendo índices resistentes de localización y variabilidad, menos influenciados por los valores extremos.

No se observaron diferencias importantes entre la media, la mediana y la media recortada al 5%, ni intervalos de confianza de la media demasiado amplios en relación al rango de valores obtenidos, excepto para la variable L-glutamina, donde se apreció un mayor discrepancia entre la media y la mediana y un intervalo de confianza ligeramente más amplio. Los valores de los M Estimadores robustos para esta variable, que ponderan los casos en función de su proximidad o alejamiento de la mediana de la distribución, no diferían sustancialmente de la media, pero sí de la mediana. Por ello, la media se puede considerar en general un buen índice para describir la tendencia central de las concentraciones de aminoácidos en nuestra muestra (ver Tabla 2).

La desviación típica y la desviación cuartílica, ambas como medidas de desviación, mostraron diferencias algo más marcadas en las variables L-glutamina, L-alanina, glicina y taurina. En cuanto a los índices de forma, no se encontraron problemas graves de asimetría y curtosis, excepto en la distribución de la variable L-ornitina, que presentó una asimetría positiva pronunciada y junto con L-glutamato mostró también un mayor apuntamiento. Todos estos aspectos se confirmaron mediante criterios gráficos, observando los histogramas y los diagramas de tallo y hojas para cada variable. En el caso de L-glutamina, estos gráficos parecían sugerir una distribución bimodal. No obstante, esto no se confirmó al inspeccionar el diagrama de caja y bigotes, ya que no mostraba una caja excesivamente larga y unos bigotes muy cortos, como cabría esperar en este tipo de distribuciones, pero los datos en esta variable no se pueden considerar homogéneos.

Los gráficos de caja y bigotes revelaron un total de 11 casos atípicos (*outliers*), de los cuales uno era un caso extremo en las variables L-ornitina y L-glutamina, variables

donde ya se habían señalado problemas de simetría y apuntamiento anteriormente. Este caso extremo se correspondía con un macho adulto que había sido sometido a tratamiento conjunto de alcohol y cocaína. De los casos moderados en atipicidad, se encontraron cuatro ratas adultas, dos machos y dos hembras, que habían recibido tratamiento con alcohol y cocaína. A cuatro se les administró solo cocaína; un macho adulto y tres jóvenes: dos hembras y un macho. Los dos casos restantes correspondieron a un macho y a una hembra jóvenes del grupo control salino.

El test de Kolmogorov-Smirnov (utilizando la corrección de Lilliefors), con valores de $p > .05$, confirmó la normalidad de las distribuciones, salvo para la variable L-ornitina ($p = .01$). Estos resultados coinciden con los observados a través de los gráficos de probabilidad normal o gráficos Q-Q, donde la inspección de los residuos mostró que el caso atípico extremo que se había detectado anteriormente coprometía la normalidad de la variable. En consecuencia, se procedió a la eliminación de este caso extremo y se reanalizaron los datos. Los índices y estadísticos de centralidad, dispersión y forma tras la eliminación del caso se resumen en la Tabla 2.

Los índices se compararon con los obtenidos mediante la reexpresión de los datos aplicando una transformación logarítmica (Ln). Este tipo de transformación permite comprimir los valores altos y expandir los pequeños, por lo que sería apropiada para corregir la asimetría a la izquierda que mostraba la mayoría de las distribuciones.

El filtrado de los datos, eliminando el caso con valores extremos, se mostró superior en todos los aspectos a la reexpresión de los valores en escala logarítmica en el sentido de que consiguió mejorar notablemente la forma de la distribución en todas las variables y corrigió la asimetría y el apuntamiento de la variable L-ornitina, así como el apuntamiento en L-glutamato (ver Figura 11 A). En esta última variable también se cumplió la normalidad ($p > .05$ en el estadístico Kolmogorov-Smirnov). Solo se rechazó que la distribución de la variable taurina se ajustara a la normal ($p = .042$). Este resultado se acercó a la aceptación de la hipótesis de normalidad, por lo que, en el resto de los análisis se realizaron sobre la muestra una vez eliminado el caso atípico.

Tabla 2. Estadísticos descriptivos correspondientes a los 11 aminoácidos cuantificados, incluyendo índices resistentes de centralidad (mediana) y de dispersión (rango intercuartílico). $N = 89$.

	<i>Media</i>	$\pm SEM$	<i>IC (95%)</i>	<i>Mediana</i>	<i>SD</i>	<i>IQR</i>	<i>Asimetría</i>	<i>IC</i>	<i>Curtosis</i>	<i>IC</i>
L-prolina	156,73	3,91	(148,97;164,50)	157,95	36,84	49,05	0,73	(0,22;1,24)	1,02	(0,01;2,03)
L-isoleucina	70,85	1,29	(68,29;73,41)	70,84	12,15	16,25	0,35	(-0,16;0,86)	-0,19	(-1,21;0,82)
L-leucina	116,82	2,24	(112,38;121,27)	114,00	21,10	25,34	0,50	(-0,01; 1,01)	0,82	(-1,84;0,19)
L-ornitina	34,33	1,09	(32,16;36,50)	34,02	10,30	15	0,56	(0,05;1,07)	-0,01	(-1,02;1)
L-glutamina	747,33	9,90	(729,66;767)	763,26	93,37	133,75	-0,11	(-0,62;0,4)	-0,45	(-1,46;0,56)
L-alanina	303,73	6,97	(289,88;317,58)	293,33	65,75	88,83	0,86	(0,35;1,37)	1,06	(0,05;2,17)
L-treonina	216,32	6,62	(203,18;229,47)	212,55	62,41	75,15	0,55	(0,04;1,06)	1,75	(0,74;2,76)
Glicina	298,20	6,90	(284,50;311,91)	293,06	65,07	93,01	0,41	(-0,07;0,92)	-0,33	(-1,34;0,68)
L-serina	211,81	4,37	(203,13;220,49)	208,60	41,22	56,15	0,79	(0,29;1,31)	0,42	(-0,59;1,43)
Taurina	223,99	6,95	(210,18;237,79)	211,58	65,54	93,54	0,72	(0,21; 1,23)	0,83	(-0,18;1,84)
L-glutamato	122,68	2,99	(116,75;128,62)	120,22	28,19	38,80	0,47	(-0,04;0,98)	0,28	(-0,73;4,1,30)

Nota: $\pm SEM$: error típico de la media; *IC 95%*: intervalo de confianza de la media al 95%; *SD*: desviación estándar; *IQR*: rango intercuartil o desviación cuartílica.

Valores de asimetría (*A*) y curtosis (*K*) igual a 0 indican distribuciones simétricas y mesocúrticas, $A < 0$ asimetría negativa, $A > 0$ asimetría positiva; $K < 0$ platocúrtica, $K > 0$ leptocúrtica; *IC*: intervalos de confianza de la asimetría y la curtosis. Las distribuciones se consideran simétricas y sin problemas de apuntamiento si los intervalos contienen el 0.

Resultados (media, mediana, *IC* de la media, *SD* y *IQR*) expresados en micromoles/litro ($\mu M/l$).

En la Figura 11 se reflejan las concentraciones medias de los aminoácidos en la muestra analizada.

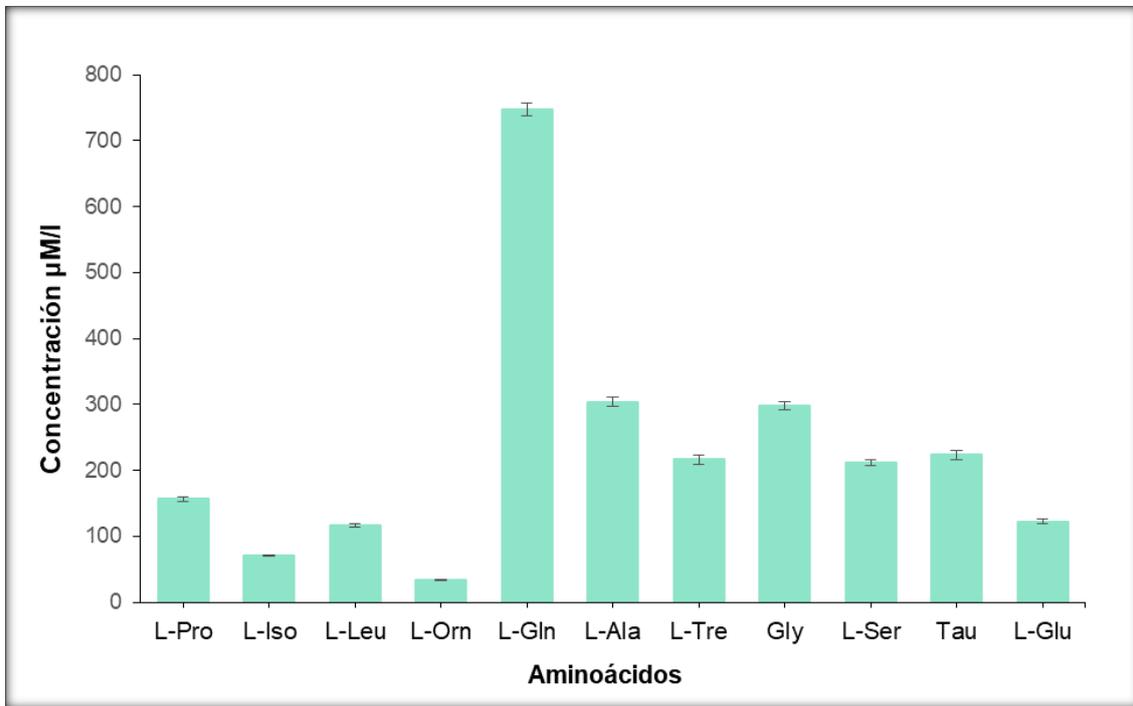


Figura 11. Media ($\pm SEM$) de la cantidad absoluta de los aminoácidos cuantificados en el estudio tras el filtrado de los datos ($N = 89$). Los resultados están expresados en concentración $\mu M/l$.

El resumen gráfico de la posición, dispersión y forma de las variables se muestra en la Figura 12, complementando y apoyando los resultados estadísticos comentados previamente. En la Figura 12 B se pueden observar los *outliers*, que fueron casos moderados, y el desplazamiento de la mediana en L-glutamina (en la parte alta de la escala) y taurina (en la parte baja de la escala). También se aprecia el ligero desplazamiento de los puntos de la diagonal en los gráficos Q-Q de la Figura 12 C, principalmente en la parte alta de la escala, mostrando la diferencia entre los valores observados y esperados bajo una distribución normal. Se decidió mantener estos casos dado que podrían ser significativos en relación a la población de origen.

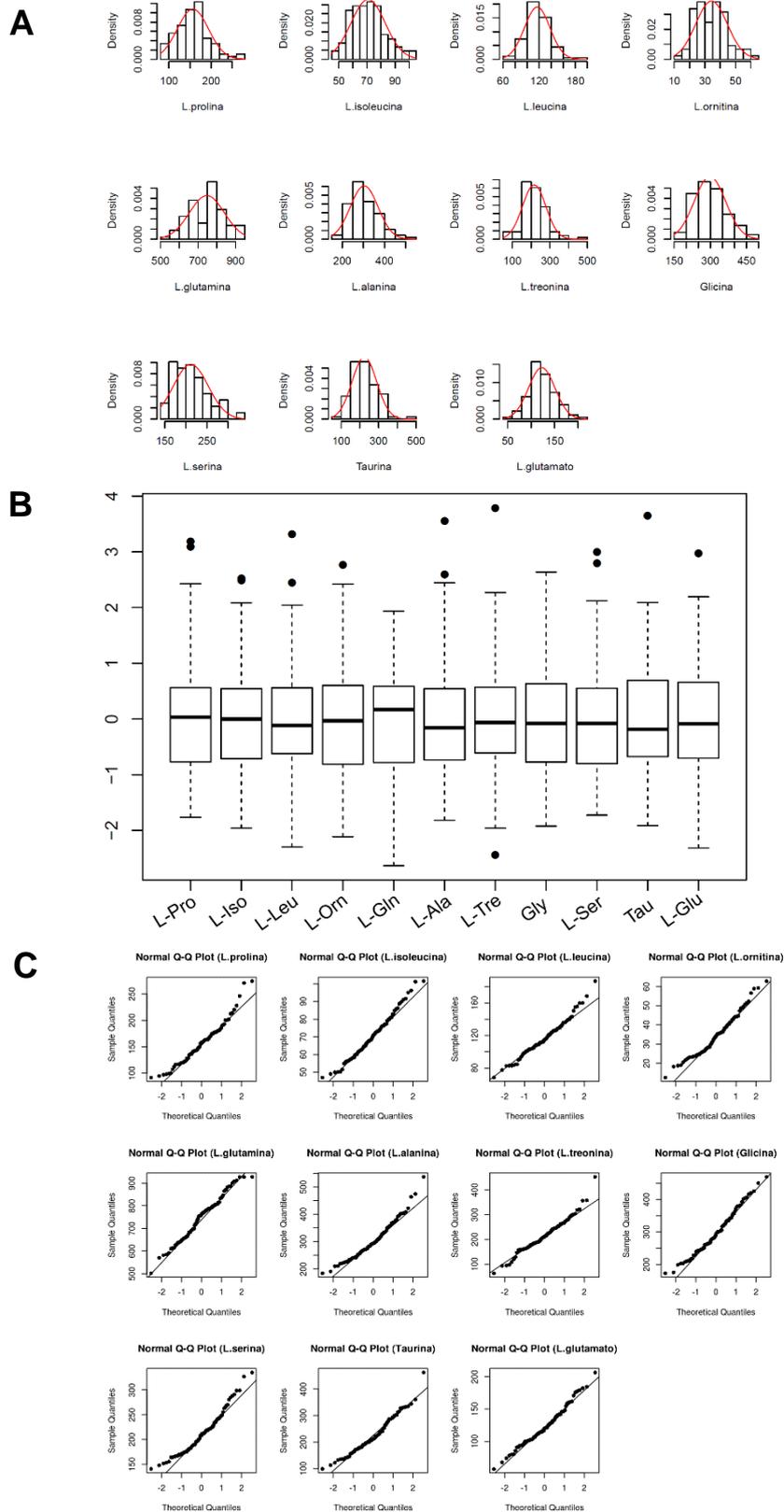


Figura 12. **A.** Histogramas de las variables con la curva normal superpuesta, **B.** Diagramas de caja y bigotes; se muestra la mediana, el percentil 25 y 75 y los casos atípicos (datos estandarizados, centrados y escalados); **C.** Gráficos de normalidad Q-Q sin tendencia. Cuando la variable se distribuye normalmente los puntos se sitúan sobre la diagonal.

La media de la cantidad de aminoácidos en función del sexo de las ratas se puede observar en la Figura 13. El estadístico Shapiro-Wilk, para muestras con $n \leq 50$ sujetos mostró que la distribución de las variables se ajustaba a la normal en hembras. En los machos se cumplió este supuesto a excepción de las variables, L-prolina, L-alanina, L-serina, taurina y L-glutamato ($p < .05$). La inspección de los gráficos de normalidad indicó la existencia de una mayor número de puntos que se desplazaban con respecto a la diagonal en el grupo de machos que en el grupo de hembras.

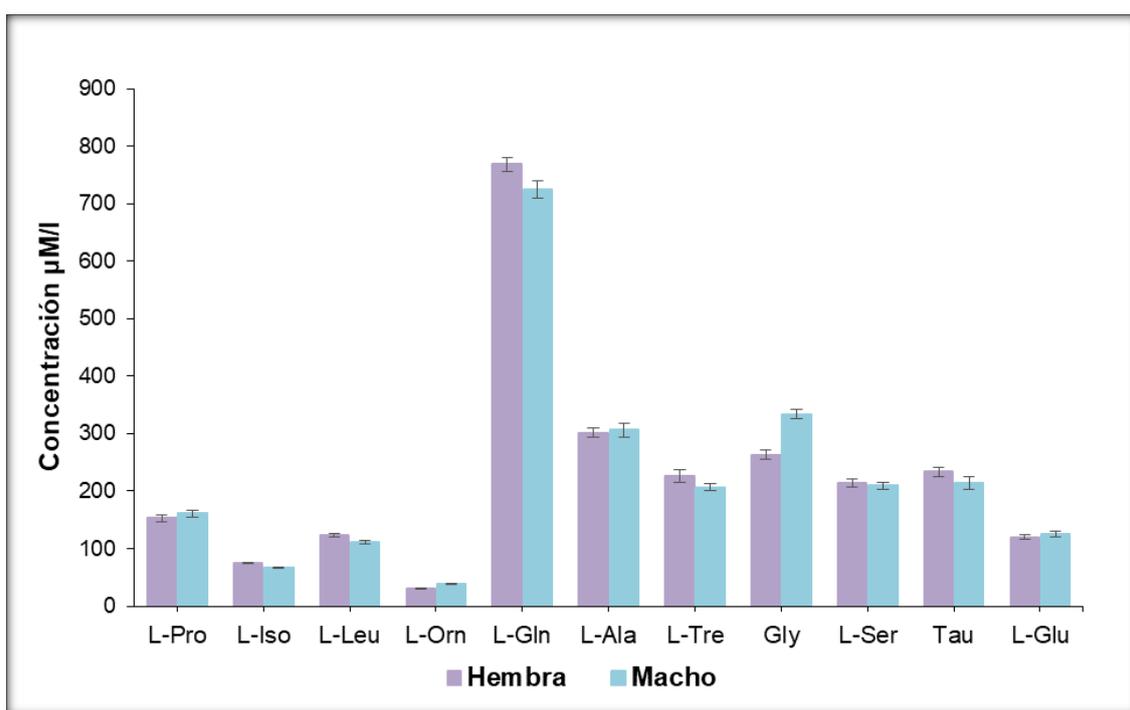


Figura 13. Media ($\pm SEM$) de la concentración de los aminoácidos medidos en el estudio en función del sexo de las ratas (Hembra: $n = 45$; Macho: $n = 44$). Los resultados están expresados en concentración $\mu M/l$.

En la prueba de homogeneidad de varianzas, el estadístico de Levene fue significativo para L-treonina ($p < .05$), por lo que se rechazó la hipótesis de igualdad de varianzas en esta variable en función del género. El gráfico de caja y bigotes indicaba una mayor variabilidad en el grupo de hembras, con un caja mas alta y unos bigotes más prolongados con respecto a los machos. Se compararon las medias mediante la prueba t de Student para muestra independientes, encontrándose diferencias significativas por sexo en L-isoleucina [$t(87) = 3,28$; $p < .01$], L-leucina [$t(87) = 2,62$; $p < .05$] y L-glutamina [$t(87) = 2,23$; $p < .05$], con valores mayores en el grupo de hembras, y en

L-ornitina [$t(87) = -3,91; p < .001$] y glicina [$t(87) = -6,06; p < .001$], con una media superior en el grupo de machos (Tabla 3).

Tabla 3. Estadísticos media (*M*), desviación típica (*SD*) y error típico de la media (*SEM*) de las variables cuantificadas en función del sexo de los animales (Hembra: $n = 50$, Macho: $n = 49$).

	<i>Sexo</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>SEM</i>
L-prolina	Hembra	152,63	35,84	5,34
	Macho	160,94	37,79	5,70
L-isoleucina	Hembra	74,82*	12,55	1,87
	Macho	66,80*	10,39	1,57
L-leucina	Hembra	122,42*	21,01	3,13
	Macho	111,09*	19,83	2,99
L-ornitina	Hembra	30,42*	8,15	1,21
	Macho	38,34*	10,81	1,63
L-glutamina	Hembra	768,64*	84,93	12,66
	Macho	725,53*	97,46	14,69
L-alanina	Hembra	301,53	56,65	8,44
	Macho	305,98	74,51	11,23
L-treonina	Hembra	226,06	78,15	11,65
	Macho	206,36	39	5,88
Glicina	Hembra	263,34*	51,93	7,74
	Macho	333,86*	57,73	8,70
L-serina	Hembra	214,17	42,69	6,36
	Macho	209,39	40,01	6,03
Taurina	Hembra	233,66	56,30	8,39
	Macho	214,09	73,14	11,03
L-glutamato	Hembra	119,96	27,56	4,11
	Macho	125,47	28,87	4,35

Resultados expresados en $\mu\text{M/l}$.

* $p < .05$

En la Figura 14 se muestra la media de los aminoácidos cuantificados en el estudio en función de la variable edad. La prueba de normalidad Shapiro-Wilk fue significativa para el grupo de jóvenes en L-treonina, L-serina y taurina ($p < .05$), y para el grupo de adultos en L-alanina ($p < .05$), indicando problemas de normalidad, también detectables mediante criterio gráfico. El estadístico de Levene no fue significativo, confirmando la hipótesis de igualdad de varianzas entre jóvenes y adultos en todas las variables.

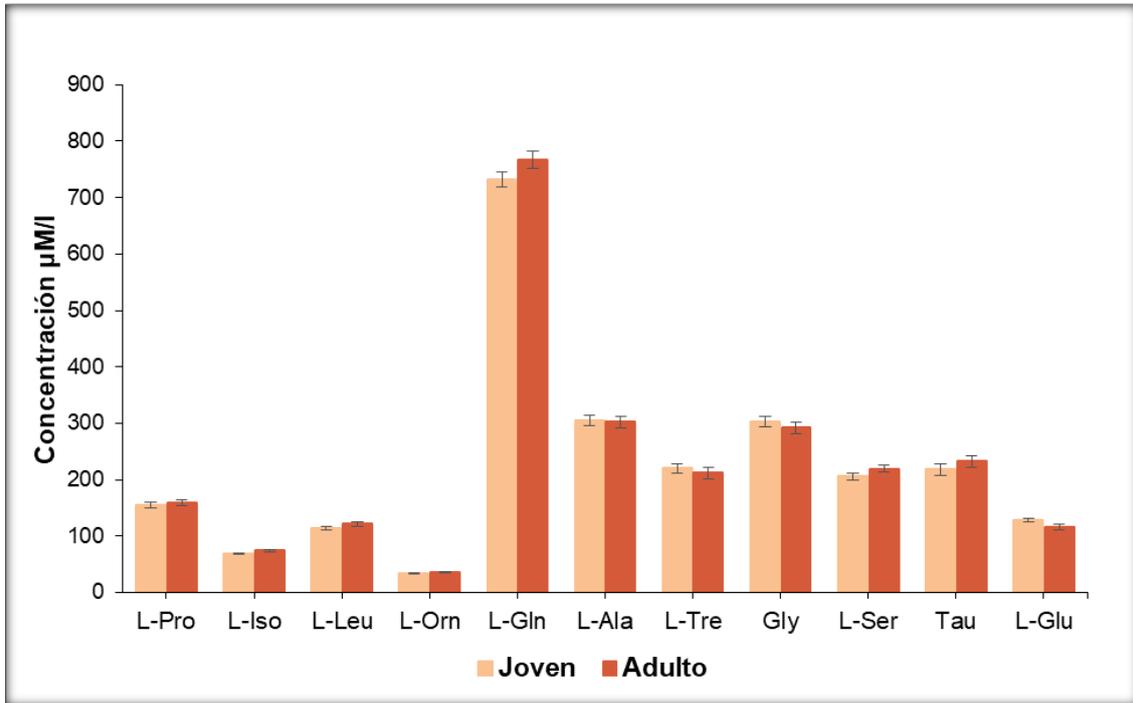


Figura 14. Media (\pm SEM) de la concentración de aminoácidos en función de la edad de las ratas al comienzo de la fase de administración de las drogas (Joven: $n = 50$; Adulto: $n = 39$). Resultados expresados en concentración μ M/l.

La prueba de t mostró diferencias significativas entre la media del grupo de jóvenes y de adultos en L-isoleucina [$t(87) = -2,29$; $p < .05$], que fue superior en los adultos, y L-glutamato [$t(87) = 2,18$; $p < .05$], con una mayor concentración en los sujetos jóvenes (Tabla 4).

Tabla 4. Estadísticos media (*M*), desviación típica (*SD*) y error típico de la media (*SEM*) agrupados en función de la edad de las ratas (Joven: *n* = 50, Adulto: *n* = 39).

	<i>Edad</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>SEM</i>
L-prolina	Joven	155,05	38,01	5,38
	Adulto	158,90	35,66	5,71
L-isoleucina	Joven	68,31*	10,55	1,49
	Adulto	74,12*	13,38	2,14
L-leucina	Joven	113,33	19,40	2,74
	Adulto	121,29	22,57	3,61
L-ornitina	Joven	33,37	10,56	1,49
	Adulto	35,57	9,97	1,60
L-glutamina	Joven	732,03	90,95	12,86
	Adulto	766,94	93,91	15,04
L-alanina	Joven	304,82	66,30	9,38
	Adulto	302,33	65,87	10,55
L-treonina	Joven	220	61,79	8,74
	Adulto	211,62	63,69	10,20
Glicina	Joven	302,88	64,74	9,16
	Adulto	292,21	65,84	10,54
L-serina	Joven	206,03	42,49	6,01
	Adulto	219,22	38,81	6,21
Taurina	Joven	217,62	66,73	9,44
	Adulto	232,15	63,91	10,23
L-glutamato	Joven	128,31*	26,86	3,80
	Adulto	115,47*	28,56	4,57

Resultados expresados en $\mu\text{M/l}$.

* $p < .05$

Considerados los datos por grupo de tratamiento, las medias de los 11 aminoácidos se muestran en la Figura 15. La distribución de L-ornitina y L-treonina en el grupo control salino y de L-prolina en el grupo con administración de cocaína no se ajustaba a la normal en la prueba Shapiro-Wilk ($p < .05$). El test de Levene indicó homogeneidad de varianzas para todos los grupos de administración.

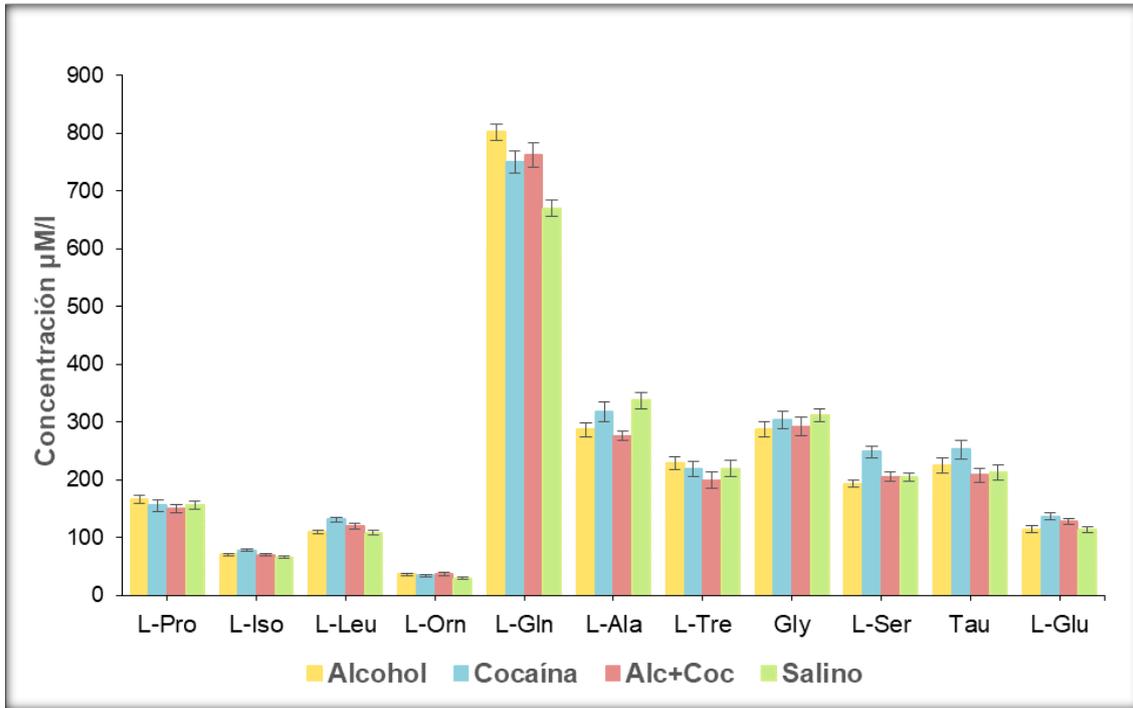


Figura 15. Media ($\pm SEM$) de la concentración de aminoácidos por grupo de tratamiento (Alcohol: $n = 24$; Cocaína: $n = 21$; Alcohol + Cocaína: $n = 22$; Salino: $n = 22$). Los resultados están expresados en concentración $\mu M/l$.

Se llevaron a cabo sucesivos análisis de varianza (ANOVA) unifactoriales, con el grupo de tratamiento como factor de efectos fijos, para comparar la media de los grupos en cada variable. El estadístico F es robusto frente al incumplimiento del supuesto de normalidad, como sucede en los casos señalados anteriormente. El supuesto de homocedasticidad se verificó.

Los resultados indicaron diferencias significativas en L-isoleucina [$F(3,85) = 4,12$; $p < .01$; $\eta_p^2 = .13$; $1 - \beta = .83$], L-leucina [$F(3,85) = 6,63$; $p < .001$; $\eta_p^2 = .19$; $1 - \beta = .97$], L-glutamina [$F(3,85) = 10,51$; $p < .001$; $\eta_p^2 = .27$; $1 - \beta = .99$], L-alanina [$F(3,85) = 4,64$; $p < .05$; $\eta_p^2 = .14$; $1 - \beta = .98$], L-serina [$F(3,85) = 9,9$; $p < .001$; $\eta_p^2 = .26$; $1 - \beta = .99$] y L-glutamato [$F(3,85) = 3,73$; $p < .05$; $\eta_p^2 = .12$; $1 - \beta = .79$] (ver Tabla 5).

Tabla 5. Estadísticos media (M), desviación típica (SD) y error típico de la media (SEM) por grupo de tratamiento. Alcohol: $n = 24$, Cocaína: $n = 21$, Alcohol + Cocaína: $n = 22$, y Salino: $n = 22$.

	<i>Tratamiento</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>SEM</i>
L-prolina	Alcohol	165,76	33,44	6,83
	Cocaína	154,98	48,22	10,52
	Alc+Coc	149,47	32,87	7,01
	Salino	155,82	31,89	6,80
L-isoleucina	Alcohol	70,25	10,24	2,09
	Cocaína	77,91*	12,55	2,74
	Alc+Coc	69,88	11,63	2,48
	Salino	65,74*	11,86	2,53
L-leucina	Alcohol	109,64*	14,59	2,98
	Cocaína	131,43*	18,25	3,98
	Alc+Coc	119,21	24,05	5,13
	Salino	108,33*	19,58	4,17
L-ornitina	Alcohol	36,46	10,32	2,11
	Cocaína	34,39	9,62	2,10
	Alc+Coc	36,69	12,10	2,58
	Salino	29,60	7,70	1,64
L-glutamina	Alcohol	801,99*	71,27	14,55
	Cocaína	750,58*	88,85	19,39
	Alc+Coc	761,78*	98,34	20,97
	Salino	670,14*	62,40	13,30
L-alanina	Alcohol	286,33*	58,42	11,93
	Cocaína	317,69	78,89	17,21
	Alc+Coc	275,74*	37,83	8,07
	Salino	337,37*	66,86	14,25
L-treonina	Alcohol	228,62	57,77	11,79
	Cocaína	217,72	60,72	13,25
	Alc+Coc	198,97	63,99	13,64
	Salino	218,93	67,55	14,40
Glicina	Alcohol	286,95	62,52	12,76
	Cocaína	303,19	68,75	15
	Alc+Coc	292,10	76,24	16,26
	Salino	311,82	52,38	11,17
L-serina	Alcohol	192,72*	30,90	6,31
	Cocaína	248,20*	44,73	9,76
	Alc+Coc	205,27*	37,45	7,98
	Salino	204,43*	30,38	6,48
Taurina	Alcohol	224,61	64,85	13,24
	Cocaína	252,06	77,12	16,83
	Alc+Coc	207,95	56,20	11,98
	Salino	212,55	58,09	12,39
L-glutamato	Alcohol	113,83*	30,25	6,17
	Cocaína	136,60*	29,91	6,53
	Alc+Coc	127,72	24,41	5,20
	Salino	114,03*	22,19	4,73

Resultados expresados en $\mu\text{M/l}$. * $p < .05$

Se llevaron a cabo comparaciones *a priori* para el contraste de las medias entre los grupos que habían mostrado diferencias significativas en el *post hoc* con la prueba de Tukey. Se encontraron diferencias en L-isoleucina entre el tratamiento con cocaína y el control salino, con una media mayor en el grupo con cocaína [$t(85) = 3,45; p < .001$]; en L-leucina entre cocaína vs. salino y alcohol, la media fue superior en el tratamiento con cocaína vs salino [$t(85) = 3,92; p < .001$] y en cocaína vs. alcohol [$t(85) = 3,77; p < .001$]; en L-glutamina entre salino vs. alcohol, cocaína y alcohol + cocaína la media fue mayor en los grupos con administración de drogas respecto al salino: cocaína vs. salino [$t(85) = 3,15; p < .05$], alcohol vs. salino [$t(85) = 5,51; p < .001$] y alcohol + cocaína vs salino [$t(85) = 3,75; p < .001$]; en L-alanina entre salino vs. alcohol y alcohol + cocaína la media fue significativamente menor en los grupos que recibieron alcohol solo [$t(85) = -2,79; p < .05$] o en combinación con cocaína [$t(85) = -3,3; p < .001$] respecto al grupo salino; en L-serina entre cocaína vs. salino, alcohol y alcohol + cocaína, con una media mayor en el grupo que recibió solo cocaína: cocaína vs salino [$t(85) = -3,97; p < .001$], cocaína vs. alcohol [$t(85) = -5,14; p < .001$] y cocaína vs. alcohol + cocaína [$t(85) = -3,90; p < .001$]; y en L-glutamato entre cocaína vs. salino y alcohol, con una concentración media mayor en el grupo con tratamiento de cocaína: cocaína vs. salino [$t(85) = -2,74; p < .05$] y cocaína vs. alcohol [$t(85) = -2,83; p < .05$].

3.1.2. Análisis bivariado

El grado de relación entre las variables se evaluó a través del coeficiente de Pearson (Tabla 6). La mayoría de los coeficientes fueron estadísticamente significativos (63,6%) y estuvieron comprendidos entre $r = .82$ y $r = .22$. Una pequeña parte de las correlaciones significativas no fue muy elevada, no superando .30 en valor absoluto. Este factor debe tenerse en cuenta si se desea realizar predicciones utilizando dos o más variables ya que estos resultados indican que existe colinealidad entre las variables.

Tabla 6. Correlaciones de *Pearson* entre las variables analizadas, indicando su significación estadística.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 L-prolina	1										
2 L-isoleucina	.32**	1									
3 L-leucina	.25*	.82**	1								
4 L-ornitina	.39**	.22*	.19	1							
5 L-glutamina	.32**	.51**	.38**	.48**	1						
6 L-alanina	.70**	.28**	.20	.14	-.04	1					
7 L-treonina	.44**	.36**	.13	.16	.24*	.35**	1				
8 glicina	.35**	.06	.06	.49**	.02	.27**	.11	1			
9 L-serina	.24*	.50**	.53**	.38**	.34**	.23*	.35**	.40**	1		
10 taurina	.13	.36**	.26*	.21	.32**	.18	.02	.22*	.34**	1	
11 L-glutamato	.02	.12	.16	.22*	.18	.14	.00	.38**	.36**	.57**	1

** $p < .01$, * $p < .05$
 Determinante = 0,005

La dirección de la relación fue positiva en todos los casos excepto entre la variable L-alanina y L-glutamina (-.04), muy baja y no significativa, y entre L-glutamato y L-treonina, con una relación también próxima a cero, indicando que concentraciones mayores en cada aminoácido se corresponden con concentraciones también mayores en el resto de aminoácidos. En todo caso, no se descartó que la relación entre las variables se pudiera ajustar a otro tipo de función (cuadrática, cúbica o exponencial). Dado que la representación gráfica juega un papel central en el análisis exploratorio de dos variables, la forma y fortaleza de las relaciones se contrastó a través de los diagramas de dispersión bivariados (Figura 16). Estos gráficos mostraron que, en general, las relaciones bivariadas se ajustaban a una relación lineal y que los valores de cada variable se distribuyeron relativamente de forma homogénea a lo largo de los valores de las otras variables, sin que se observara una marcada acumulación de puntos en áreas concretas.

Si bien los estadísticos y gráficos univariados no mostraron desviaciones graves de la distribución normal, no ocurrió así cuando se analizaron las relaciones bivariadas. El diagnóstico de asimetría y curtosis a través del estadístico de Mardia y la evaluación de la normalidad bivariada con el test de Henze-Zirkler y el de Royston, mostró que solo 15 de las 55 relaciones bivariadas se ajustó a una distribución normal bivariada. En estos casos, hubo acuerdo entre los tres estadísticos, que no fueron significativos ($p > .05$).

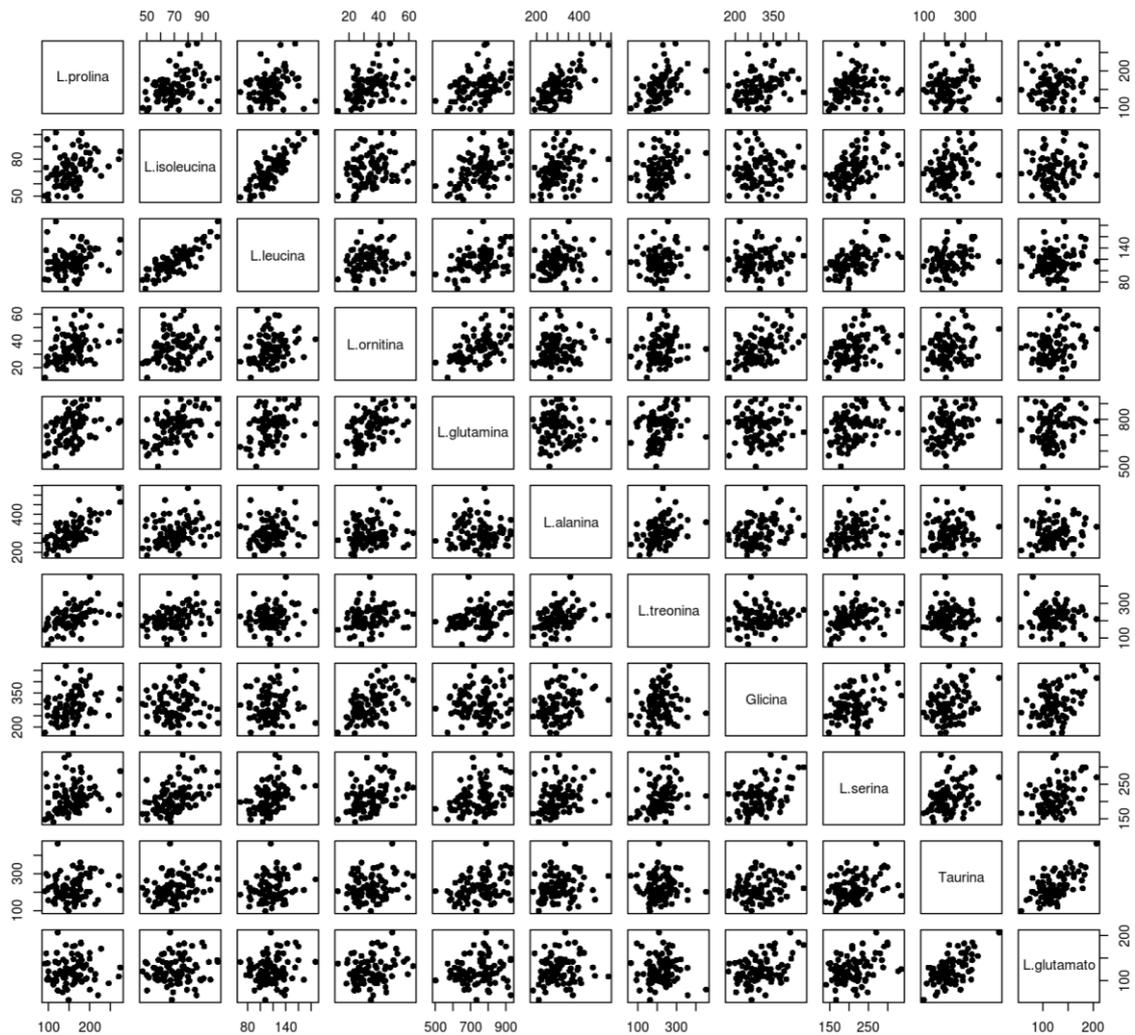
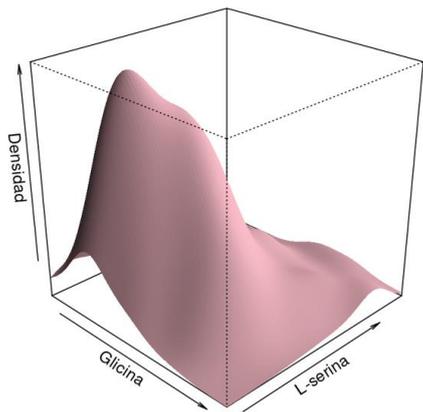


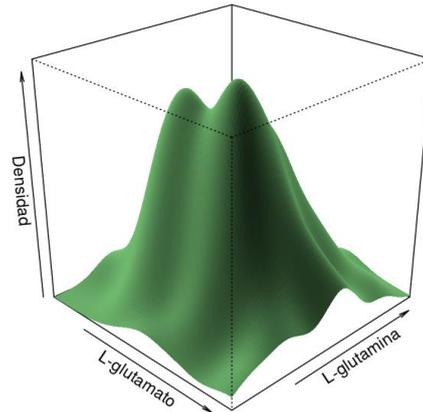
Figura 16. Matriz de gráficos de dispersión para la evaluación de la fuerza, la forma y la dirección de la relación entre las variables analizadas.

En los restantes casos, no se observaron problemas importantes de curtosis, pero sí de simetría, por lo que el test de Mardia apuntaba problemas de normalidad. En 23 de las relaciones bivariadas no fue posible rechazar la normalidad con el test de Henze-Zirkler, utilizado para muestras grandes, mientras que el estadístico de Royston para muestras pequeñas ($n < 50$) con estas mismas relaciones bivariadas fue significativo ($p < .05$). Estas conclusiones se compararon con la revisión de los gráficos de perspectiva y contorno, que confirmaron un limitado número de relaciones en las que se podría asumir una distribución normal bivariada (ver ejemplos en la Figura 17), de acuerdo con los resultados obtenidos en los tres estadísticos evaluados.



Test		p
Mardia		
Asimetría	12,63	.01
Curtosis	-0,43	.67
Henze-Zirkler	1,38	.00
Royston	10,33	.00

* $p < .05$



Test		p
Mardia		
Asimetría	7,67	.10
Curtosis	-0,67	.53
Henze-Zirkler	0,68	.24
Royston	2,71	.26

* $p < .05$

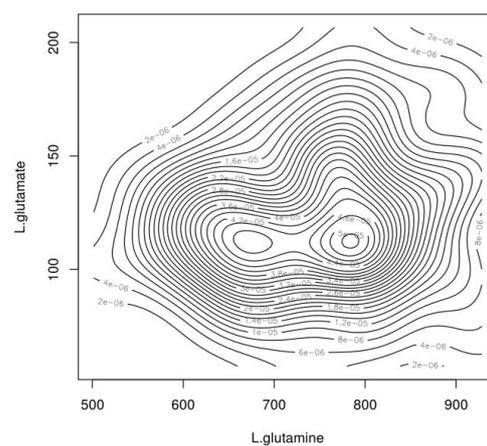
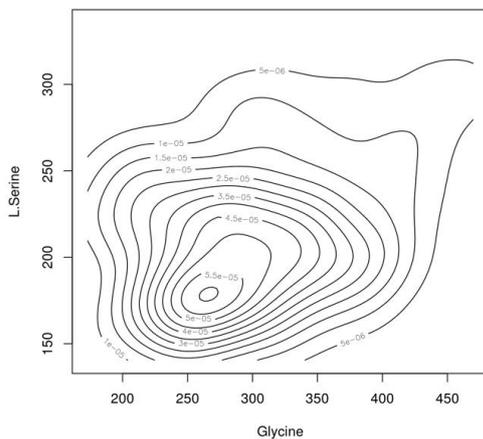


Figura 17. Gráficos de perspectiva (arriba) y de huella (abajo). Para que exista normalidad bivariada el gráfico de perspectiva debe mostrar una forma acampanada y el de huella distribirse de forma homogénea a lo largo de la diagonal. A la izquierda se muestra la relación bivariada entre glicina y L-serina, que fue significativa, por lo que se rechazó la normaliad bivariada, y a la derecha la relación entre L-glutamato y L-glutamina, que no fue significativa, observandose que cumple los criterios gráficos y estadísticos de normalidad bivariada.

3.1.3. Análisis multivariado

Para la aplicación de la mayoría de técnicas paramétricas multivariadas, asumir el supuesto de normalidad multivariada es crucial, ya que su incumplimiento disminuye notablemente las cualidades de estas técnicas y proporcionan resultados poco fiables (Kass, Eden y Brown, 2014). Los procedimientos gráficos y estadísticos utilizados para

evaluar la normalidad univariada y bivariada son indicadores necesarios, pero no suficientes de la normalidad multivariada (Burdenski, 2000). Además, diversos autores han señalado que si un grupo de variables en estudio sigue una distribución normal univariada, esto no implica que tengan una distribución normal multivariada (Kass et al., 2014; Stevens, 2012).

Como vimos, en los datos de los 11 aminoácidos se pudo constatar la normalidad univariada. Sin embargo, este supuesto de normalidad solo se confirmó en un reducido grupo de relaciones bivariadas. El valor de los estadísticos multivariados condujo también al rechazo de la hipótesis de normalidad multivariada en los datos (Tabla 7), lo cual condicionó los subsiguientes análisis.

Tabla 7. Valores y significación de los estadísticos de normalidad multivariada. $N = 89$.

Test		p
Mardia		
Asimetría	22,19	.004
Curtosis	142,1	.800
Henze-Zirkler	1,01	.008
Royston	46,25	.000

* $p < .05$

La violación del supuesto se suele relacionar con la presencia de casos atípicos multivariados, lo cual se refleja en el incumplimiento de la simetría en el test de Mardia y la significación en el test de Henze-Zirkler y el de Royston, sin que se den problemas de apuntamiento. Mediante la distancia de Mahalanobis se localizaron 13 *outliers* que, no obstante, no se eliminaron ya que podrían tener implicaciones para la teoría.

3.2. Análisis Factorial Exploratorio (AFE)

En el análisis factorial exploratorio (AFE) la reducción de la dimensionalidad de los datos mediante la extracción de factores comunes descansa en las relaciones que las variables mantienen entre sí. Dado que los factores extraídos ayudarán a explicar las correlaciones inicialmente observadas en el conjunto de aminoácidos, el primer paso para la realización de un AFE es calcular y explorar la matriz de correlaciones (ver Tabla 6). Como vimos, las correlaciones bivariadas fueron mayoritariamente significativas, gran

parte de ellas (27 de 35) a un nivel de significación de $p < .001$. Correlaciones altas entre varias variables indican que probablemente las variables se agruparán en un mismo factor. Se encontraron dos correlaciones altas, entre L-isoleucina y L-leucina ($r = .82$) y entre L-prolina y L-alanina ($r = .70$). Las restantes correlaciones significativas fueron medias o bajas. El valor del determinante de la matriz de correlaciones fue mayor de 0,0001 ($det = 0,005$). Este valor es importante ya que si fuera muy próximo a cero la colinealidad sería demasiado elevada y si fuera cero no se podría encontrar una solución factorial. No obstante, para decidir si el procedimiento de factorización es apropiado para la matriz de correlaciones observadas se contrastaron diversos indicadores de su adecuación.

3.2.1. Adecuación de los datos

La prueba de esfericidad de Bartlett contrasta la hipótesis de que las variables no correlacionan en la población de la que procede la muestra y que las correlaciones distintas de cero se deben al azar. Se obtuvo un valor de chi cuadrado alto y significativo [$\chi^2(55, N = 89) = 448,39; p < .001$], por lo que se rechazó que la matriz de correlaciones fuera una matriz identidad, considerándose por tanto adecuada para la factorización.

La medida de adecuación de muestreo de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO-MSA) es otro indicador de la fuerza de la relación entre las variables. Los coeficientes de correlación parcial, como estimadores de los factores únicos, deben ser pequeños en comparación con los coeficientes de correlación observados. Así, valores altos de KMO apoyarían la corrección del proceso de factorización. Se obtuvo un índice $KMO = .60$ que según la caracterización de Kaiser (1974) se clasifica como mediocre. Además de este índice de adecuación global, se analizó la medida de adecuación de muestreo (MSA) para cada variable individual. Los coeficientes en la diagonal principal de la matriz de correlación anti-imagen, que contiene los negativos de los coeficientes de correlación parcial, estuvieron comprendidos entre .50 (bajos) y .75 (medianos). Estos índices están en el límite de la aceptabilidad, por lo que el modelo factorial obtenido se puede interpretar, pero hemos de hacerlo con cautela.

3.2.2. Método de extracción de factores

Se llevó a cabo un análisis mediante el método de extracción de mínimos cuadrados no ponderados (ULS). Hemos de considerar que los diferentes métodos de extracción de factores difieren en los supuestos distribucionales y la estrategia para estimar los parámetros del modelo. El método ULS no requiere el supuesto de normalidad multivariada y es muy robusto, por lo que es preferible especialmente en muestras pequeñas. Su objetivo es buscar los parámetros que minimicen los residuos, es decir, la suma de cuadrados de las diferencias entre las correlaciones observadas y la matriz de correlaciones predicha (Abad, Olea, Ponsoda y García, 2011).

3.2.3. Elección del número de factores

En la fase de extracción se determinó el número de factores comunes necesarios para reproducir las correlaciones entre los aminoácidos. Se utilizó una combinación de procedimientos que sirvieron para determinar la importancia de cada factor basándose en la proporción de varianza total explicada por cada uno. Entre estos procedimientos, la regla K1 de Kaiser, el gráfico de sedimentación y el análisis paralelo (PA) se basan en el estudio de la cuantía de los autovalores de la matriz de correlaciones. Los autovalores constituyen una transformación de la proporción de varianza común explicada por cada factor y su número es igual al número de variables analizadas. Si un factor explica toda la varianza de una única variable y no explica nada de las restantes, su autovalor será 1.

La regla K1 utiliza el criterio de retener los factores que expliquen al menos la varianza de una variable. En consecuencia, se retienen los factores cuyos autovalores sean mayores que 1. Con esta regla, y tras seis iteraciones, se extrajeron cuatro factores, dado que el quinto autovalor era menor que 1 (0,81) (ver Tabla 8).

En el gráfico de sedimentación se representan los autovalores de la matriz de correlaciones en orden descendente de mayor a menor. La forma de determinar el número de factores a retener a partir de este gráfico fue propuesta por Cattell (1966) y se basa en trazar una línea desde el autovalor más pequeño, observando en qué punto cambia de tendencia. El cambio en la inclinación sirve para identificar el último descenso sustancial en la magnitud de los autovalores. Este cambio representa la existencia de unos pocos factores mayores que explican la mayor parte de la varianza y un grupo de factores menores que dan cuenta de la varianza restante (Fabrigar, Wegener, MacCallum y

Strahan, 1999; Hayton, Allen y Scarpello, 2004). En la Figura 18, se aprecia que el número de factores a extraer según este criterio sería cuatro, con un cambio de inclinación de la línea en el quinto autovalor aproximadamente, pero muy próximo al cuarto.

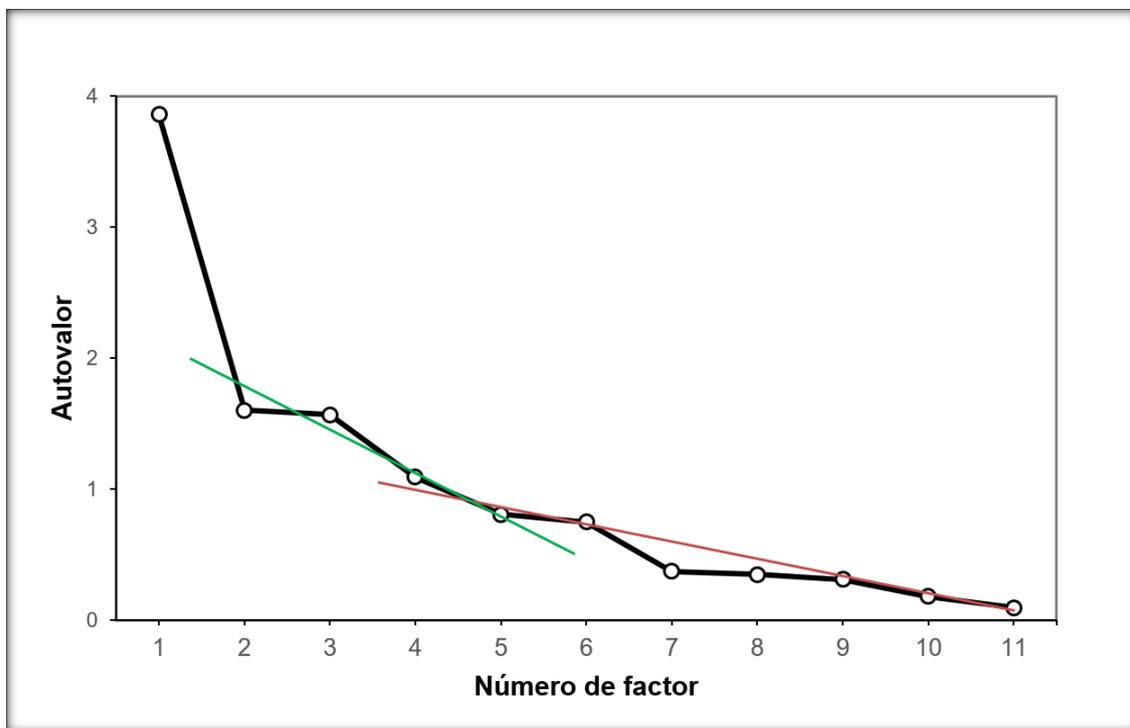


Figura 18. El gráfico de sedimentación representa la cuantía de los autovalores correspondientes a la matriz de correlaciones de los 11 aminoácidos. Si las variables no guardaran relación y no hubiera factores comunes, se podría trazar una única línea que pasara por todos los puntos. La línea verde representa el escalón en la tendencia marcada por la línea roja, que se produce alrededor del factor 5.

Estos procedimientos tienden a sobreestimar el número de factores y no están exentos de subjetividad en la elección del punto de corte para incluir un factor o determinar si hay una caída importante en los autovalores, pudiendo ser arbitraria.

El PA se ha señalado como uno de los procedimientos más precisos y en la mayoría de los casos el más correcto para establecer el número de factores (Fabrigar et al., 1999; Hayton et al., 2004; Matsunaga, 2010). Con este método se simuló mediante el método de Monte Carlo un total de 100 matrices de datos aleatorios de orden igual a la muestra y cuyas variables se generaron como independientes, con distribución normal similar a las variables originales (O'Connor, 2000). El promedio y el percentil 95 de los autovalores en los datos aleatorios se compararon con los autovalores de la matriz de correlaciones de nuestro estudio.

Los autovalores se obtuvieron mediante un análisis de componentes principales (PCA) ⁴. El primer autovalor en la muestra con una cuantía menor que el percentil 95 en los datos aleatorios se considera que no es significativo y determina el número de factores que sería útil extraer. En la Tabla 8 se comprueba que el autovalor que cumple este criterio es el cuarto, con un valor de 1,09, inferior al percentil 95 (1,25) y también a la media (1,17) de los autovalores en las matrices de datos simulados. El número de factores a extraer según el PA sería tres.

Tabla 8. Autovalores iniciales obtenidos en la muestra y media y percentil 95 de los autovalores de 100 muestras generadas aleatoriamente.

Factor	<i>Muestra</i>		<i>Datos aleatorios</i>	
	Total	Media	Percentil 95	
1	3,86	1,61	1,78	
2	1,60	1,43	1,54	
3	1,57	1,29	1,38	
4	1,09	1,17	1,25	
5	0,81	1,07	1,14	
6	0,75	0,97	1,03	
7	0,37	0,87	0,94	
8	0,35	0,79	0,86	
9	0,31	0,70	0,77	
10	0,18	0,61	0,68	
11	0,10	0,51	0,59	

Método de extracción componentes principales (PCA)

Dada la discrepancia entre los procedimientos de identificación del número de factores a retener encontrada en los métodos anteriores, se compararon diferentes modelos con la solución de tres y cuatro factores y se observaron los residuos. En el

⁴ El análisis de componentes principales (PCA) no es una técnica de AFE adecuada, a pesar de estar muy extendida como método de extracción de factores. PCA no diferencia entre factores comunes y factores únicos y su objetivo es determinar la combinación lineal de las variables medidas reteniendo el máximo de información. Sin embargo, se considera útil a la hora de determinar el número de factores que se debe retener, por lo que a menudo se utiliza como paso previo a la aplicación de otros métodos de AFE (Abad et al., 2011; Fabrigar, et al., 1999).

modelo de tres factores el número de residuos mayores de 0,05 en valor absoluto fue de 23 (41%), un número muy elevado frente a los 10 (18%) que se encontraron en el modelo de cuatro factores. Además, las comunalidades tras la extracción fueron más bajas en el modelo de tres factores, excepto en la variable L-treonina, que fue baja en ambos modelos (.26).

En conjunto, la solución inicial de cuatro factores mostró un mejor ajuste, explicando un 62,55% de la varianza debida a los factores comunes entre las variables estudiadas (ver Tabla 9). La contribución del cuarto factor a la explicación de la varianza común fue de un 7,28%. Siendo un factor menor, no obstante, se consideró necesaria su inclusión en el modelo ya que la variable L-ornitina mostró un peso alto en este factor y al excluirlo cargaba en los otros factores, distorionando el peso de las variables que realmente pesaban en ellos (ver Wood, Tataryn y Gorsuch, 1996).

3.2.4. Rotación de los factores

El modelo de AFE no tiene una única solución, existen infinitas alternativas que dependerán de la orientación de los factores en el espacio multidimensional. La solución inicial se rotó para seleccionar aquella lo más parecida posible a la estructura simple propuesta por Thurstone (1947), de forma que los factores fueran distinguibles y la solución más interpretable.

Se aplicó una rotación oblicua, *oblimin directo* ($\delta = 0$), que permite la correlación entre los factores. Esta solución se comparó con una rotación ortogonal mediante el método *varimax normalizado*, en el que se asume que los factores no correlacionan y se busca maximizar la varianza consiguiendo que para cada factor unas variables tengan pesos altos y otras tengan un peso bajo o igual a cero. La matriz de correlaciones entre los factores en la rotación oblicua mostró coeficientes bajos, por debajo de 0,30 en valor absoluto, por lo que ambas soluciones fueron muy similares. La rotación ortogonal suele ser más clara y sencilla de interpretar, mientras que la solución oblicua proporciona una representación más precisa y realista sobre cómo se relacionan los factores (Fabrigar et al., 1999). Se decidió mantener la solución ortogonal por ser más parsimoniosa y no diferir sustancialmente de la solución oblicua. Los pesos de las variables en los factores rotados que fueron mayores de .40 y el porcentaje de varianza común explicada por cada uno de ellos se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Matriz de pesos factoriales para cada variable en los cuatro factores extraídos tras rotar la solución inicial mediante el método *varimax normalizado*. Se muestra la comunalidad de cada variable, los autovalores y el porcentaje de varianza común explicada por cada uno de ellos.

<i>Variables</i>	<u>Pesos factoriales</u>				<i>Comunalidad</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	
L-prolina		.78			.74
L-iso-leucina	.97				.99
L-leucina	.76				.63
L-ornitina				.82	.75
L-glutamina	.52			.46	.49
L-alanina		.91			.88
L-treonina		.41			.26
glicina			.42	.41	.44
L-serina	.45				.47
taurina			.58		.42
L-glutamato			.89		.80
Autovalores	3,86	1,60	1,57	1,10	
% de varianza	32%	11,90%	11,36%	7,28%	

Los pesos < .40 se han excluido

En los cuatro factores extraídos pesaron entre tres y cuatro variables obteniéndose un primer factor (F1), en el que las variables L-iso-leucina y L-leucina tuvieron pesos altos (.97 y .76 respectivamente) y L-glutamina (.52) y L-serina (.45) tuvieron saturaciones medias. En el Factor 2 (F2) L-alanina es la que tuvo un peso más alto (.91) seguida de L-prolina (.78) y L-treonina (.41). En el Factor 3 (F3) la variable de mayor peso fue L-glutamato (.89), mientras que taurina (.58) y glicina (.42) tuvieron pesos más bajos. Finalmente, en el Factor 4 (F4) pesaba principalmente L-ornitina (.82), mientras que L-glutamina (.46) y glicina (.41) tenían un peso menor y además estas variables también tuvieron pesos medios en el Factor 1 y el Factor 3 respectivamente, por lo que había cierto solapamiento entre los factores (ver Figura 19).

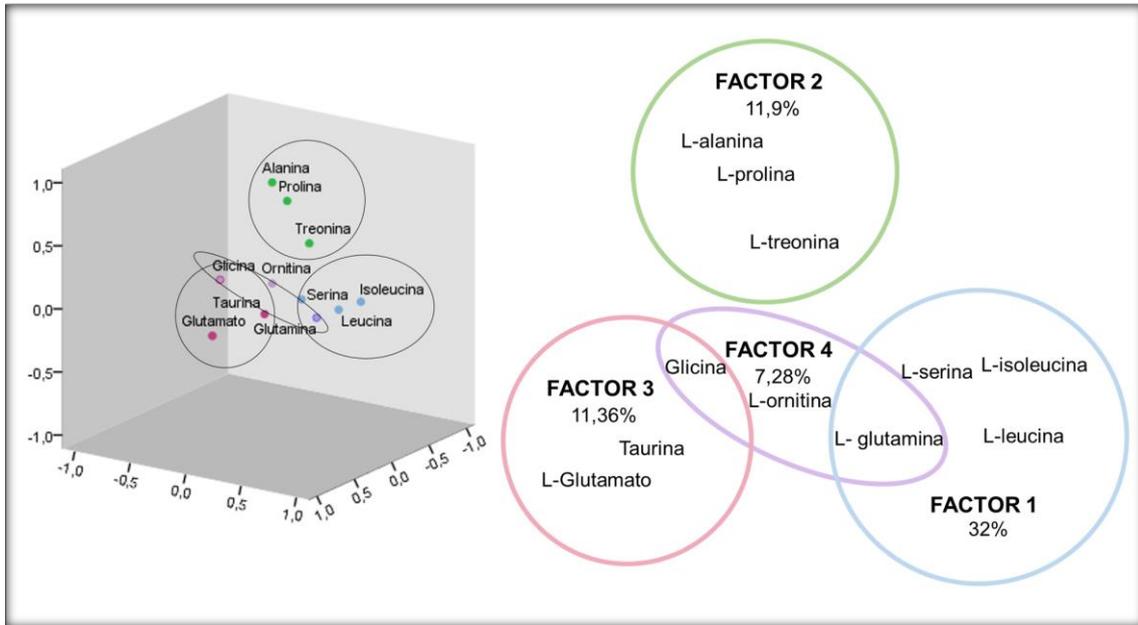


Figura 19. Gráfico de factores en el espacio de factores rotados, a la izquierda, y representación de la estructura factorial obtenida, a la derecha, incluyendo la proporción de varianza común explicada por cada factor. Se observa que el modelo se acercaba a la solución simple, con un factor independiente (Factor 2), mientras que el resto de factores se solapaba parcialmente.

3.2.5. Puntuaciones factoriales

Partiendo de la matriz de pesos de ponderación de las variables, se calculó la puntuación factorial de cada rata en cada una de las cuatro dimensiones. Se utilizó el método de regresión, que es el más recomendable ya que maximiza el coeficiente de validez. En este método cada variable es predictora, los factores son las variables criterio y se buscan los pesos que minimizan los errores de predicción a través de los individuos. Este método permitió establecer el grado de indeterminación factorial calculando la desviación típica de las puntuaciones factoriales. La desviación típica de las puntuaciones calculadas con este método coincide con el coeficiente de validez máxima. Los valores obtenidos estuvieron por encima de 0,7 en los cuatro factores, por lo que las estimaciones no estaban afectadas por un error importante.

Las puntuaciones correspondientes a las cuatro dimensiones se sometieron a un ADE para comprobar el cumplimiento de los supuestos para la aplicación de técnicas multivariadas que permitieran las comparaciones en función de la edad, el sexo y el tratamiento con las drogas.

No se encontraron problemas graves de asimetría y curtosis. Las distribuciones en las dimensiones se ajustaron a la normal, tanto mediante criterios gráficos como estadísticos. Solo en la variable F2 el estadístico de Kolmogorov-Smirnov fue significativo ($p = .037$), con una leve asimetría positiva que se pudo comprobar mediante el histograma y el diagrama de tallos y hojas. El gráfico de caja y bigotes mostro que el incumplimiento de la normalidad en esta variable era debido a tres casos atípicos en la parte alta de la escala, aunque fueron moderados. Todos ellos correspondieron a ratas macho, dos de ellas con tratamiento de cocaína, una rata joven y una adulta. El último caso se trataba de un sujeto joven con tratamiento salino. El estadístico de Levene no fue significativo ($p > .05$), por lo que se asumió homogeneidad de varianzas.

En las relaciones bivariadas las correlaciones fueron próximas a cero entre los factores, como cabía esperar dado que así se había establecido en la rotación ortogonal. Los test de Mardia, Henze-Zirkler y Royston condujeron al rechazo de la normalidad bivariada excepto entre F1 y F4, con $p > .05$ en los tres estadísticos.

No se pudo constatar la normalidad multivariada, la asimetría en el test de Mardia y los estadísticos Henze-Zirkler y Royston fueron significativos ($p < .05$), solo se descartaron problemas de apuntamiento en el test de Mardia ($p > .05$). Dado que, como ya se comentó, este supuesto condiciona la aplicación de la mayoría de las técnicas multivariadas, no fue posible realizar las comparaciones entre las cuatro dimensiones en función de la edad, el sexo y el grupo de tratamiento mediante un análisis multivariado de varianza (MANOVA), por lo que se procedió analizar la varianza univariada mediante sucesivos ANOVAs.

3.3. *Análisis de Varianza (ANOVA)*

Las puntuaciones factoriales calculadas anteriormente en cada una de las cuatro dimensiones identificadas (F1, F2, F3 y F4) se introdujeron como variables dependientes en sucesivos ANOVAs mediante un diseño factorial univariado de efectos fijos completamente aleatorizados con tres factores, *sexo*, *edad* (joven y adulto) y *tratamiento*, este último con cuatro niveles que correspondían a los grupos salino, alcohol, cocaína y alcohol + cocaína.

3.3.1. ANOVA Factor 1

En el ANOVA de F1 se encontraron diferencias significativas por *sexo* [$F(1,73) = 26,31; p < .001; \eta_p^2 = .27; 1 - \beta = .99$], *edad* [$F(1,73) = 14,14; p < .001; \eta_p^2 = .16; 1 - \beta = .96$], *tratamiento* [$F(3,73) = 9,28; p < .001; \eta_p^2 = .28; 1 - \beta = .99$] y en la interacción doble entre *sexo* \times *tratamiento* [$F(3,73) = 3; p < .05; \eta_p^2 = .11; 1 - \beta = .67$] (Ver Tablas 10, 11, 12 y Figura 20). La interacción doble entre *edad* \times *tratamiento* y *sexo* \times *edad* no fueron significativas, como tampoco lo fue la interacción triple entre *sexo* \times *edad* \times *tratamiento*.

Tabla 10. Media por sexo en el Factor 1.

<i>Sexo</i>	<i>M</i>
Hembra	0,39
Macho	-0,40

Tabla 11. Media por grupo de edad en el Factor 1.

<i>Edad</i>	<i>M</i>
Adulto	0,31
Joven	-0,24

Tabla 12. Media por tratamiento en el Factor 1.

<i>Tratamiento</i>	<i>M</i>
Salino	-0,56
Cocaína	0,59
Alcohol	0
Coc+Alc	0

<i>Tratamiento</i> \times <i>Sexo</i>		<i>M</i>
Salino	Hembra	0,02
	Macho	-1,15
Cocaína	Hembra	1,16
	Macho	-0,04
Alcohol	Hembra	0,34
	Macho	-0,33
Coc+Alc	Hembra	0,05
	Macho	-0,05

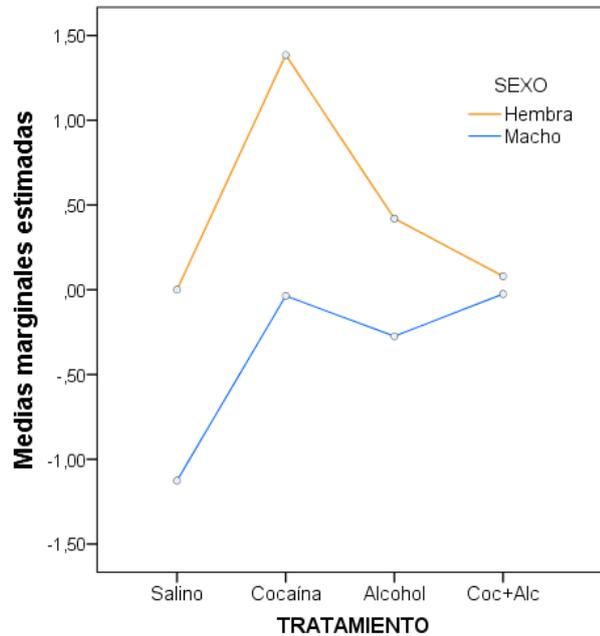


Figura 20. Interacción *Sexo* \times *Tratamiento* en el Factor 1.

En las comparaciones por pares con la corrección de Bonferroni se estudiaron los efectos simples en la interacción *sexo* y *tratamiento*. En las hembras hubo diferencias significativas entre cocaína vs. salino ($p < .001$), cocaína vs. alcohol ($p < .05$) y cocaína vs. alcohol + cocaína ($p = .001$). En los machos las diferencias significativas de observaron entre salino vs. cocaína ($p < .05$) y entre salino vs. cocaína + alcohol ($p < .05$). Salino vs. alcohol tendía a la significación ($p = .057$). Entre machos y hembras hubo diferencias significativas en salino ($p < .05$), cocaína ($p < .05$) y en el grupo alcohol tendía a la significación ($p < .056$). Sin diferencias entre machos y hembras en cocaína + alcohol (Figura 20 y Tabla 13).

3.3.2. ANOVA Factor 2

El ANOVA para F2 arrojó resultados significativos en función del *tratamiento* [$F(3,73) = 3,38; p < .05; \eta_p^2 = .12; 1 - \beta = .74$]. No hubo efectos principales de *edad*, *sexo*, ni interacciones dobles entre *sexo* × *edad*, *sexo* × *tratamiento* y *edad* × *tratamiento*. La interacción triple entre *sexo* × *edad* × *tratamiento* tampoco fue significativa. En el análisis *post hoc* con la prueba de Tukey se encontraron diferencias significativas entre el grupo salino vs. cocaína + alcohol, en el contraste de medias [$t(85) = 3,23; p < .05$]. La media de la puntuación en esta dimensión fue superior en el grupo salino ($M = 0,48$) frente al grupo cocaína + alcohol ($M = -0,41$), este último grupo puntuaba alto, pero en sentido negativo.

3.3.3. ANOVA Factor 3

En F3 se encontró un efecto principal de *tratamiento* [$F(3,73) = 5,23; p < .05; \eta_p^2 = .18; 1 - \beta = .91$]. En el *post hoc* con la prueba de Tukey las diferencias significativas se observaron entre el grupo con administración de cocaína vs. alcohol [$t(85) = 3,58; p < .001$]. Ambos grupos obtuvieron puntuaciones similares, pero en sentido opuesto; positivo en el grupo de cocaína ($M = 0,52$) y negativo en el grupo con alcohol ($M = -0,41$). En cuanto al factor *edad*, tendía a la significación [$F(1,73) = 3,93; p = .05; \eta_p^2 = .05; 1 - \beta = .50$]. En las ratas adultas se obtuvo una media de $M = -0,20$ y en las jóvenes de $M = 0,16$. No se encontraron diferencias significativas en función del *sexo* y tampoco hubo interacciones dobles o triples.

3.3.4. ANOVA Factor 4

Las comparaciones en F4 mostraron que había diferencias significativas en función de *sexo* [$F(1,73) = 16,21; p < .001; \eta_p^2 = .18; 1 - \beta = .98$], con $M = -0,34$ en las hembras y $M = 0,35$ en los machos, y en función de *tratamiento* [$F(1,73) = 5,81; p < .05; \eta_p^2 = .19; 1 - \beta = .94$]. La prueba de Tukey mostró que las diferencias se encontraban entre el grupo salino vs. alcohol [$t(85) = 3,47; p = .001$], $M = -0,50$ en el grupo salino y $M = 0,37$ en la condición alcohol; y entre salino vs. alcohol + cocaína [$t(85) = 2,90; p < .05$], $M = 0,24$ en el grupo alcohol + cocaína. Sin efecto principal de *edad* ni interacciones significativas.

3.4. Post-test de autoadministración de alcohol y cocaína

Aunque los datos objeto de análisis pertenecen a un estudio donde la administración de las drogas se realizó de forma pasiva, a la realización de este TFM se cuenta ya con datos de conducta de autoadministración pertenecientes a la segunda etapa de esta amplia investigación. Como se expuso al inicio de este trabajo, se consideró conveniente evaluar si la conducta de las ratas en el procedimiento de autoadministración apoya la cantidad y distribución de las dosis que se administraron a las ratas de forma pasiva. Brevemente, hay que indicar que para su obtención se implementó un programa de razón fija 1 (RF1) específico para las cajas de condicionamiento operante, que suministraba por cada presión de la palanca activa una infusión de cocaína, cocaína + alcohol o solución salina, hasta un máximo de 15 infusiones por sesión, mientras que la presión de la palanca alternativa no tenía ningún efecto.

Como se puede observar en la Figura 21:

- Tanto para el grupo de cocaína como para el de cocaína + alcohol el número de respuestas se acerca al número máximo de 15 presiones de palanca en los primeros días de tratamiento.
- Hay un número de respuestas comparable entre los sujetos del grupo cocaína con los del grupo cocaína + alcohol.
- Alcanzando el máximo de 15 presiones de palanca cada rata obtenía 15 mg/ kg-p.v. de cocaína y/o 2 g/kg-p.v. de alcohol, que son las mismas dosis que las empleadas en el protocolo de administración pasiva, el cual ha sido objeto de este estudio.

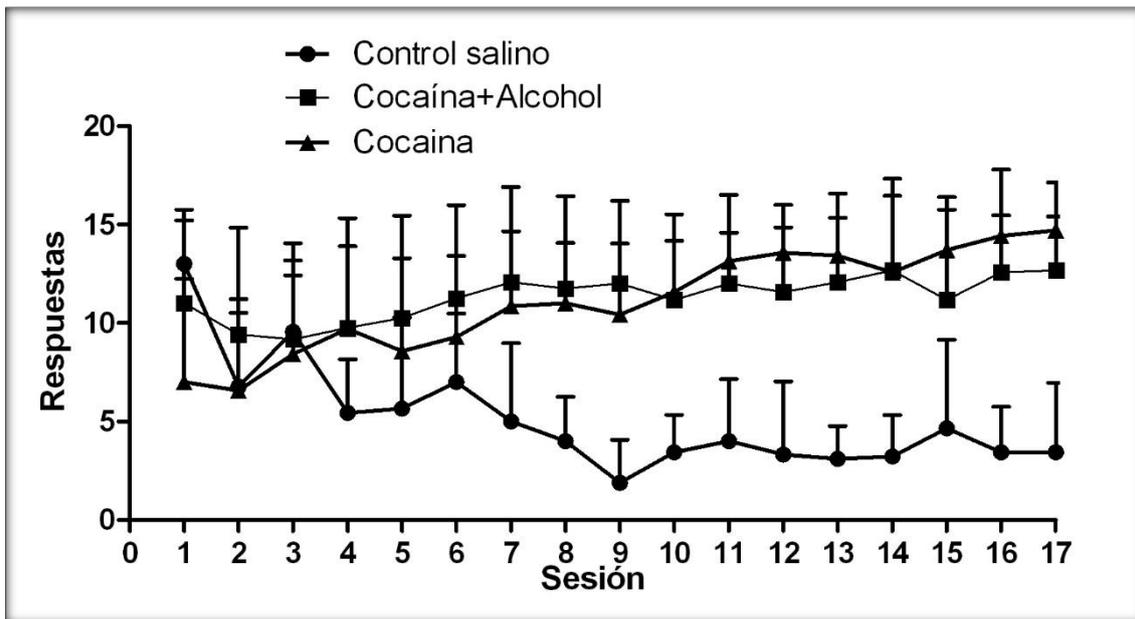


Figura 21. Promedio ($\pm SD$) de respuestas válidas (presiones de la palanca operativa) durante los 17 primeros días de autoadministración (3 días de adaptación + 14 días). Se implementó un programa RF1, que suministraba una infusión de cocaína, alcohol + cocaína o solución salina por cada pulsación de la palanca activa hasta un máximo de 15 infusiones durante 20 segundos, (Salino: $n = 14$, Cocaína: + Alcohol: $n = 16$ y Cocaína: $n = 15$).

En este experimento, no se incluyó un grupo de autoadministración de alcohol porque, recordemos, la autoadministración intravenosa puede presentar problemas al no evitar las propiedades aversivas que el etanol tiene para las ratas (Windisch, et al., 2014).

4. Discusión

En este trabajo se ha desarrollado un modelo de administración pasiva de alcohol y/o cocaína en ratas de laboratorio y se han estudiado los posibles efectos de la administración de estas drogas sobre las concentraciones plasmáticas de 11 aminoácidos. Los aminoácidos son pequeñas moléculas que cumplen un papel esencial en vías metabólicas implicadas en el mantenimiento de los procesos fisiológicos de un organismo y de manera muy relevante en la neurotransmisión en el SNC, por lo que pueden servir como biomarcadores de la vulnerabilidad asociada al consumo crónico de alcohol y/o cocaína en humanos y en modelos animales. Nos propusimos como objetivo encontrar patrones que dieran cuenta de la variación conjunta en los niveles de dichos aminoácidos utilizando como técnica de análisis el Análisis Factorial Exploratorio (AFE).

La exploración inicial de los datos es un requisito básico para obtener unos buenos resultados, especialmente en las técnicas multivariadas por la complejidad de los datos que tratan y por los supuestos que requieren, por lo que debería ser una parte ineludible en cualquier análisis (Arias, 2008, Velleman y Hoaglin, 2012). En el análisis exploratorio de los datos (ADE) que se ha llevado a cabo en este TFM se han seguido los cinco principios básicos de esta técnica: inspección de los gráficos, observación de los estadísticos resistentes y de los residuos, reexpresión de los datos e iteración (Velleman y Hoaglin, 2012). Así, se ha podido comprobar la existencia de leves desviaciones en la forma de las distribuciones y se han localizado los casos atípicos más relevantes. Solo se ha procedido a eliminar uno de estos casos, el más extremo. Los restantes casos atípicos, situados principalmente en la parte alta de la escala, se han mantenido en los siguientes análisis dado que en la literatura se han reportado niveles alterados de aminoácidos como el glutamato, la serina, la taurina, la alanina o la glicina en diferentes trastornos neuropsiquiátricos que poseen una elevada comorbilidad con la adicción a las drogas (Altamura et al, 1995; Mauri et al, 1998; Mitani et al, 2006; Zavala, et al, 2001), aunque estos estudios difieren en algunas de sus conclusiones.

En el análisis descriptivo se ha podido comprobar en mayor profundidad las tendencias presentes en los datos. Se constata que el aminoácido con una concentración mayor en el plasma de las ratas es la L-glutamina que, como sabemos, es el aminoácido más abundante en el plasma de los mamíferos. Por grupo de edad se observan diferencias

en L-glutamato, con una concentración significativamente superior en las ratas jóvenes en relación con las adultas. El glutamato es el principal aminoácido excitatorio en el SNC, pudiendo ser utilizado hasta en un 40% de las sinapsis (Coyle y Puttfarcken, 1993). Sabemos que durante la adolescencia tienen lugar cambios importantes en diferentes sistemas cerebrales, especialmente los relacionados con la sensibilidad a los estresores y la modulación en la percepción de los estímulos reforzantes (Spear, 2002), por lo que esta mayor concentración de L-glutamato podría ser indicativa de una mayor actividad en el cerebro de las ratas jóvenes.

Todos los grupos de administración (alcohol, cocaína y alcohol + cocaína) presentan una concentración significativamente mayor de L-glutamato y L-serina que el grupo de control salino. Niveles altos de estos aminoácidos se han observado en pacientes con trastornos psicóticos, esquizofrenia, epilepsia, manía, paranoia, depresión unipolar o depresión psicótica (Altamura et al, 1995; Huxtable et al., 1983; Mauri et al, 1998; Zavala, et al., 2001). Además, el grupo con cocaína muestra un nivel significativamente mayor de L-glutamato, L-isoleucina y L-leucina comparado con el grupo salino. Respecto a estos dos últimos aminoácidos, los resultados contrastan con los reportados en estudios clínicos con pacientes autistas en los que se han encontrado valores disminuidos de isoleucina y leucina especialmente asociados a la presencia de hiperactividad y convulsiones (Zavala, et al, 2001).

Tras comprobar que los datos son adecuados para la aplicación de un AFE ha sido posible reducir las variables iniciales a un número menor de factores capaces de explicar la varianza compartida entre ellas. Se propone una estructura factorial de cuatro factores. El principal factor (F1) da cuenta de la mayor parte de la varianza compartida entre las variables (32%) y en él pesan los aminoácidos L-isoleucina, L-leucina, L-glutamato y L-serina. Los tres factores restantes son factores menores. El Factor 2 (F2) es el único factor independiente debido a que no se solapa con el resto de los factores. En él se aglutinan los aminoácidos L-alanina, L-prolina y L-treonina, explicando el 11,9% de la varianza. El Factor 3 (F3) tiene aproximadamente la misma importancia que F2, con un 11,36% de varianza explicada. La variable de mayor peso en este factor es L-glutamato, sin embargo, también tienen un peso importante taurina y glicina. La taurina y la glicina, se sabe que actúan como neurotransmisores inhibidores y algunas investigaciones apuntan a que estarían aumentados en pacientes esquizofrénicos y en episodios psicóticos (Altamura,1995). Finalmente, el Factor 4 (F4) está mayormente representado por L-

ornitina mientras que L-glutamina y glicina tienen un peso menor en F4 y también pesan en F1 y en F3 respectivamente, por lo que hay cierto solapamiento entre los factores, ofreciendo información redundante. El modelo propuesto explica en total el 62,55% de la varianza compartida entre las variables (ver Figura 19). En general muestra un buen ajuste a los datos, aunque no ha sido perfecto y los coeficientes podrían diferir de muestra a muestra. El número de residuos mayores de 0,05 en valor absoluto ha sido de un 18%, pero el método de extracción de factores (ULS) no permite concluir si los residuos son estadísticamente distintos de cero. El método de máxima verosimilitud (ML) sí permite obtener un contraste estadístico χ^2 del ajuste del modelo. La ausencia de normalidad multivariada observada en el ADE no aconseja la aplicación del método ML y además el estadístico χ^2 está muy influenciado por el tamaño de la muestra (Abad et al, 2011).

En la elección del número de factores, el método PA recomienda la extracción de tres factores, y si bien este método se considera el más preciso (Fabrigar et al. 1999; Hayton, 2004; Matsunaga, 2010), se ha complementado con el análisis de los residuos. Como vimos, el número de residuos fue menor en la solución de cuatro factores. Además, se ha señalado que es menos grave equivocarse por exceso que por defecto (Fabrigar et al., 1999). Cuando se extraen más factores alguno podría estar representado por una sola variable, aunque la estructura correcta tiende a permanecer. Este podría ser el caso de F4 que está representado principalmente por el aminoácido L-ornitina. Sin embargo, el hecho de que los aminoácidos L-glutamina y glicina tengan pesos menores en este factor y además saturen con pesos similares en el F1 y en F3 respectivamente, podría hacer pensar en la división de lo que debería haber sido un único factor. No obstante, cuando se comprobaron los pesos factoriales de estas variables en la solución de tres factores se observó que no aumentaban sustancialmente y continuaban siendo redundantes. Serían necesarios nuevos estudios incluyendo diferentes aminoácidos para determinar con mayor precisión el número apropiado de factores a extraer ya que una variable puede ser indicadora de varios factores latentes en función del conjunto de variables adicionales consideradas en el análisis.

En la solución inicial de cuatro factores se han obtenido comunalidades altas, por encima de .40, en todas las variables excepto en L-treonina (.26), lo que podría indicar una importancia menor de este aminoácido en relación con las posibles alteraciones metabólicas que tendrían lugar durante la administración crónica de alcohol y/o cocaína. Al eliminar L-treonina en los análisis el ajuste del modelo empeoraba considerablemente

por lo que, a pesar de su pequeña contribución a la explicación de la variabilidad común, consideramos que esta variable debe mantenerse.

En los sucesivos ANOVAs realizados encontramos que los cuatro factores resultan útiles para diferenciar a los sujetos en función del tratamiento que recibieron. F1 es el factor más importante a la hora de describir la relación entre las variables. En el ANOVA de este factor, además de observarse diferencias significativas debidas al tratamiento, se encontraron diferencias en función de la edad, el sexo de las ratas y una interacción significativa entre el sexo y el tratamiento. Por tanto, el efecto principal del tratamiento está modulado por el sexo de las ratas y debe ser interpretado teniendo en cuenta este aspecto. En el grupo de hembras, aquellas que recibieron cocaína presentan una alteración que las diferencia significativamente de los demás grupos de administración. En los machos los metabolitos que configuran la dimensión F1 parecen afectados por igual en las condiciones en las que se administró alcohol, cocaína y alcohol + cocaína, sin diferencias entre ellas, pero sí respecto al grupo salino. Entre los machos y las hembras la diferencia máxima se encuentra en la administración de cocaína, sin que se aprecien diferencias importantes entre ambos sexos cuando se suministra alcohol o alcohol + cocaína. Por otra parte, F2 es un factor importante para diferenciar los efectos de la administración conjunta de alcohol y cocaína frente al control salino. F3 diferencia entre la administración individual de alcohol y cocaína y, además, los metabolitos con saturaciones altas en este factor presentan distinta variabilidad en jóvenes y adultos. F4 diferencia entre la de administración de alcohol solo o en combinación con cocaína respecto al grupo salino y, al igual que F1, diferencia por sexo.

En conjunto, los parámetros del modelo que se ha propuesto pueden ser útiles para evaluar las alteraciones metabólicas diferenciales entre la administración individual o conjunta de alcohol y cocaína, y es sensible a la edad y el sexo de los sujetos. Los resultados deberán ser interpretados desde un enfoque biológico para conferir significado a los factores. Estos factores podrían estar relacionados con alteraciones en vías metabólicas que, de no mantener unos márgenes adecuados, darían cuenta de la vulnerabilidad al consumo de estas drogas y de los trastornos que se observan en la adicción (ver Figura 4).

Este estudio también presenta alguna limitación. Se ha observado un caso Heywood en la variable L-prolina, con una comunalidad de .99. Este valor impropio es poco plausible ya que implica que la concentración en este metabolito se predice

perfectamente a partir de la puntuación en los factores. Se considera que puede apuntar a que la muestra es pequeña. En general una muestra de menos de 100 sujetos se considera pequeña, como es nuestro caso. Sin embargo, algunos autores recomiendan como mínimo tres sujetos por variable y nosotros contamos con ocho sujetos aproximadamente por variable. La utilidad de esta regla es relativa y se ha recomendado tener en cuenta otros aspectos como el tamaño de las comunalidades y el número de variables por factor. Según esta aproximación, en nuestro estudio encontramos comunalidades comprendidas entre valores bajos y altos y en cada factor pesan entre tres y cuatro variables, lo que requeriría una muestra mínima de 350 sujetos (Mundfrom, Shaw y Ke, 2005).

Por todo ello, sería necesario acumular datos en muestras de mayor tamaño, ampliar el número de variables estudiadas, comparar modelos para cada uno de los grupos definidos por las variables sexo, edad y grupo de tratamiento, realizar un análisis factorial confirmatorio (AFC) sobre los modelos propuestos y evaluar su capacidad de predicción a través de otras muestras.

Los estudios más recientes que nuestro equipo ha venido realizando sobre el modelo de autoadministración de las drogas pueden contribuir a esclarecer cuales son los metabolitos que estarían afectados en el consumo conjunto de cocaína y alcohol. Por el momento es posible afirmar que los resultados conductuales en el procedimiento de autoadministración son coherentes con el protocolo utilizado en la administración pasiva.

En el futuro se espera reunir nuevos datos que nos ayuden a entender mejor los factores que influyen en el inicio, mantenimiento y recaída en la adicción al alcohol y la cocaína desde un enfoque metabolómico. Confiamos que los resultados contribuyan al desarrollo de pautas para el diagnóstico y el tratamiento orientadas a cada persona y, por lo tanto, más eficaces.

5. Referencias

- Abad, F. J., Olea, J., Ponsoda, V., & García, C. (2011). *Medición en ciencias sociales y de la salud*. Madrid, España: Síntesis.
- Aldred, S., Moore, K. M., Fitzgerald, M., & Waring, R. H. (2003). Plasma amino acid levels in children with autism and their families. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 33(1), 93-97.
- Altamura, C. A., Mauri, M. C., Ferrara, A., & Moro, A. R. (1993). Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatric disorders. *The American Journal of Psychiatry*, 150(11), 1731.
- Altamura, C., Maes, M., Dai, J., & Meltzer, H. Y. (1995). Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *European Neuropsychopharmacology*, 5, 71-75.
- Arias, R. M. (2008). *El análisis multivariante en la investigación científica*. La Muralla.
- Blanco, C. C. (1998). *Electroforesis capilar* (Vol. 4). Universidad de Almería, Servicio de Publicaciones.
- Burdenski, T. (2000). Evaluating Univariate, Bivariate, and Multivariate Normality Using Graphical and Statistical Procedures. *Multiple Linear Regression Viewpoints*, 26 (2): 15-28.
- Cattell, R. B. (1966). The scree test for the number of factors. *Multivariate Behavioral Research*, 1(2), 245-276.
- Chambers, R. A., Taylor, J. R., & Potenza, M. N. (2003). Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *American Journal of Psychiatry*, 160(6), 1041-1052.
- Colimon, K. M. (1990). *Fundamentos de Epidemiología*. Ediciones Díaz de Santos.
- Coyle, J. T., & Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262(5134), 689-695.
- Crespo, J. A., Manzanares, J., Oliva, J. M., Corchero, J., García-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2003). Extinction of cocaine self-administration produces

- alterations in corticotropin releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Molecular Brain Research*, 117(2), 160-167.
- Crespo, J. A., Manzanares, J., Oliva, J. M., Corchero, J., Palomo, T., & Ambrosio, E. (2001). Extinction of cocaine self-administration produces a differential time-related regulation of proenkephalin gene expression in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 25(2), 185-194.
- Crespo, J. A., Oliva, J. M., Ghasemzadeh, M. B., Kalivas, P. W., & Ambrosio, E. (2002). Neuroadaptive changes in NMDAR1 gene expression after extinction of cocaine self-administration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 965(1), 78-91.
- Doroteo, M. C. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investigación en Discapacidad*, 1(2), 86-89.
- Fabrigar, L. R., Wegener, D. T., MacCallum, R. C., & Strahan, E. J. (1999). Evaluating the use of exploratory factor analysis in psychological research. *Psychological Methods*, 4(3), 272.
- 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.
- Frustaci, A., Neri, M., Cesario, A., Adams, J. B., Domenici, E., Dalla Bernardina, B., & Bonassi, S. (2012). Oxidative stress-related biomarkers in autism: systematic review and meta-analyses. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(10), 2128-2141.
- Griffiths, R. R., & Balster, R. L. (1979). Opioids: Similarity between evaluations of subjective effects and animal self-administration results. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 25(5part1), 611-617.
- Harrigan, G. G., Maguire, G., & Boros, L. (2008). Metabolomics in alcohol research and drug development. *Alcohol Research & Health*, 31(1), 27.
- Harris, D. S., Everhart, E. T., Mendelson, J., & Jones, R. T. (2003). The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. *Drug and Alcohol Dependence*, 72(2), 169-182.

- Hayton, J. C., Allen, D. G., & Scarpello, V. (2004). Factor retention decisions in exploratory factor analysis: A tutorial on parallel analysis. *Organizational Research Methods*, 7(2), 191-205.
- Hu, M., Crombag, H. S., Robinson, T. E., & Becker, J. B. (2004). Biological basis of sex differences in the propensity to self-administer cocaine. *Neuropsychopharmacology*, 29(1), 81.
- Huxtable, R. J., Laird, H., Lippincott, S. E., & Walson, P. (1983). Epilepsy and the concentrations of plasma amino acids in humans. *Neurochemistry International*, 5(1), 125-135.
- Jiménez, E. G., Flores, J. G., & Gómez, G. R. (2000). *Análisis factorial*. La Muralla.
- Kass, R. E., Eden, U. T., & Brown, E. N. (2014). *Analysis of neural data* (Vol. 491). New York: Springer.
- Kaiser, H. F. (1974). An index of factorial simplicity. *Psychometrika*, 39(1), 31-36.
- Korkmaz, S., Goksuluk, D., & Zararsiz, G. (2014). MVN: an R package for assessing multivariate normality. *The R Journal*, 6(2), 151-162.
- Kozawa, S., Yukawa, N., Liu, J., Shimamoto, A., Kakizaki, E., & Fujimiya, T. (2007). Effect of chronic ethanol administration on disposition of ethanol and its metabolites in rat. *Alcohol*, 41(2), 87-93.
- Landry, M. J. (1992). An overview of cocaethylene, an alcohol-derived, psychoactive, cocaine metabolite. *Journal of Psychoactive Drugs*, 24(3), 273-276.
- Lindon, J. C., Nicholson, J. K., & Holmes, E. (Eds.). (2011). *The handbook of metabonomics and metabolomics*. Elsevier.
- Lorenzo, M. P., Villaseñor, A., Ramamoorthy, A., & Garcia, A. (2013). Optimization and validation of a capillary electrophoresis laser-induced fluorescence method for amino acids determination in human plasma: Application to bipolar disorder study. *Electrophoresis*, 34(11), 1701-1709.
- Lu, Y. R., Fu, X. Y., Shi, L. G., Jiang, Y., Wu, J. L., Weng, X. J., ... & Li, H. C. (2014). Decreased plasma neuroactive amino acids and increased nitric oxide levels in melancholic major depressive disorder. *BMC Psychiatry*, 14(1), 123.

- Lynch, W. J., & Carroll, M. E. (2000). Reinstatement of cocaine self-administration in rats: sex differences. *Psychopharmacology*, *148*(2), 196-200.
- Lynch, W. J., Roth, M. E., & Carroll, M. E. (2002). Biological basis of sex differences in drug abuse: preclinical and clinical studies. *Psychopharmacology*, *164*(2), 121-137.
- Magura, S., & Rosenblum, A. (2000). Modulating effect of alcohol use on cocaine use. *Addictive Behaviors*, *25*(1), 117-122.
- Martínez Arias, R. (2008). *El análisis multivariante en la investigación científica*. La Muralla: Madrid.
- Matsunaga, M. (2010). How to Factor-Analyze Your Data Right: Do's, Don'ts, and How-To's. *International journal of Psychological Research*, *3*(1).
- Mauri, M. C., Ferrara, A., Boscati, L., Bravin, S., Zamberlan, F., Alecci, M., & Invernizzi, G. (1998). Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. *Neuropsychobiology*, *37*(3), 124-129.
- McCance-Katz, E. F., Price, L. H., McDougle, C. J., Kosten, T. R., Black, J. E., & Jatlow, P. I. (1993). Concurrent cocaine-ethanol ingestion in humans: pharmacology, physiology, behavior, and the role of cocaethylene. *Psychopharmacology*, *111*(1), 39-46.
- Miguéns, M., Crespo, J. A., Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Montoya, G. L., García-Lecumberri, C., & Ambrosio, E. (2008). Differential cocaine-induced modulation of glutamate and dopamine transporters after contingent and non-contingent administration. *Neuropharmacology*, *55*(5), 771-779.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2015-2016). Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías, Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España, EDADES 2015. Recuperado de http://www.pnsd.mssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/2015_EDADES_Informe.pdf
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2018). Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Encuesta sobre el uso de drogas en enseñanzas secundarias en España, EDADES 2016/2017. Recuperado de

http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/pdf/2016_2017_ESTUDES.pdf

- Mitani, H., Shirayama, Y., Yamada, T., Maeda, K., Ashby Jr, C. R., & Kawahara, R. (2006). Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(6), 1155-1158.
- Mundfrom, D. J., Shaw, D. G., & Ke, T. L. (2005). Minimum sample size recommendations for conducting factor analyses. *International Journal of Testing*, 5(2), 159-168.
- Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (2018), Informe Europeo sobre Drogas 2018: Tendencias y novedades, Oficina de Publicaciones de la Unión Europea, Luxemburgo.
- O'Connor, B. P. (2000). SPSS and SAS programs for determining the number of components using parallel analysis and Velicer's MAP test. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 32(3), 396-402.
- Pedraza, M., Araos, P., García-Marchena, N., Serrano, A., Romero-Sanchiz, P., Suárez, J., ... & Barrios, V. (2015). Sex differences in psychiatric comorbidity and plasma biomarkers for cocaine addiction in abstinent cocaine-addicted subjects in outpatient settings. *Frontiers in Psychiatry*, 6.
- Pennings, E. J., Leccese, A. P., & Wolff, F. A. D. (2002). Effects of concurrent use of alcohol and cocaine. *Addiction*, 97(7), 773-783.
- Qiu, Z., & Morgan, J. P. (1993). Differential effects of cocaine and cocaethylene on intracellular Ca²⁺ and myocardial contraction in cardiac myocytes. *British Journal of Pharmacology*, 109(2), 293-298.
- Roth, M. E., Cosgrove, K. P., & Carroll, M. E. (2004). Sex differences in the vulnerability to drug abuse: a review of preclinical studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(6), 533-546.
- Roy, A. (2001). Characteristics of cocaine-dependent patients who attempt suicide. *American Journal of Psychiatry*, 158, 1215-1219.
- Sánchez-López, E., Marcos, A., Ambrosio, E., Mayboroda, 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 140, 313-321.

Schechter, M. D., & Meehan, S. M. (1995). The lethal effects of ethanol and cocaine and their combination in mice: implications for cocaethylene formation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 52(1), 245-248.

Spear, L. (2000). Modeling Adolescent Development and Alcohol. *Alcohol Research and Health*, 24, 2.

Spear, L. P. (2002). The adolescent brain and the college drinker: biological basis of propensity to use and misuse alcohol. *Journal of Studies on Alcohol, Supplement*, (14), 71-81.

Spear, L. (2013). The teenage brain: Adolescents and alcohol. *Current Directions in Psychological Science*, 22(2), 152-157.

Stevens, J. P. (2012). *Applied multivariate statistics for the social sciences*. Routledge.

Thurstone, L. L. (1947). *Multiple factor analysis*. Chicago: University of Chicago Press.

Velleman, P. F., & Hoaglin, D. C. (2012). Exploratory data analysis. In H. Cooper, P. M. Camic, D. L. Long, A. T. Panter, D. Rindskopf, & K. J. Sher (Eds.), *APA handbook of research methods in psychology, Vol. 3. Data analysis and research publication* (pp. 51-70). Washington, DC, US: American Psychological Association.

Windisch, K. A., Kosobud, A. E., & Czachowski, C. L. (2014). Intravenous alcohol self-administration in the P rat. *Alcohol*, 48(5), 419-425.

Wood, J. M., Tataryn, D. J., & Gorsuch, R. L. (1996). Effects of under-and overextraction on principal axis factor analysis with varimax rotation. *Psychological Methods*, 1(4), 354.

Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1-17.

Yela, M. (1997). *La técnica del análisis factorial. Un modelo de investigación en psicología y pedagogía*. Madrid: Biblioteca Nueva.

- Zaitso, K., Miyawaki, I., Bando, K., Horie, H., Shima, N., Katagi, M., ... & Tsuchihashi, H. (2014). Metabolic profiling of urine and blood plasma in rat models of drug addiction on the basis of morphine, methamphetamine, and cocaine-induced conditioned place preference. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *406*(5), 1339-1354.
- Zaitso, K., Hayashi, Y., Kusano, M., Tsuchihashi, H., & Ishii, A. (2016). Application of metabolomics to toxicology of drugs of abuse: A mini review of metabolomics approach to acute and chronic toxicity studies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *31*(1), 21-26.
- Zavala, M., Castejón, H. V., Ortega, P. A., 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*(5), 401-407.