



ANEXO IV

JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

FINAL

Número Expediente: PNSD #2009/022

Investigador Principal: Bru Cormand

Otros Investigadores: Claudio Toma, Noelia Fernández Castillo, Marta Ribasés Haro

Título Proyecto o subproyecto NUEVOS MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE BÚSQUEDA DE COCAÍNA: ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto)
NUEVOS MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE BÚSQUEDA DE COCAÍNA

Organismo: Universitat de Barcelona

Centro: Facultad de Biología

Departamento: Departamento de Genética

Comunidad Autónoma: CATALUNYA

Duración: 3 AÑOS

Fecha de inicio: Octubre 2009

Fecha de finalización: Octubre 2012

Año Convocatoria: 2009

Área Temática: Investigaciones sobre estrategias terapéuticas buscando nuevos métodos de tratamiento, incluyendo identificación de dianas terapéuticas y diseño de nuevos fármacos

Palabras Clave: Cocaína, recaída, modelos animales, receptores y péptidos opioides, expresión génica



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

Este proyecto coordinado tiene como objetivo principal evaluar los mecanismos neurobiológicos implicados en los procesos de recaída al consumo de cocaína y en las alteraciones que aparecen en el adicto en ausencia de dicho consumo. Así, el equipo dirigido por Rafael Maldonado (Laboratorio de Neurofarmacología, Universitat Pompeu Fabra, subproyecto 1, PNSD#2009/026), ha centrado la primera y segunda anualidad del subproyecto 1 en el desarrollo de modelo murinos operantes que permiten estudiar los comportamientos de **frustración** y de **desesperación** en situaciones de búsqueda compulsiva de refuerzo en relación a la **comida de alta palatabilidad** o al consumo de **cocaína**. Estos nuevos modelos comportamentales han sido objeto de estudios transcriptómicos exhaustivos por parte del equipo dirigido por Bru Cormand (Departamento de Genética, Universitat de Barcelona, subproyecto 2, PNSD#2009/022). A lo largo de la primera y segunda anualidades, el subproyecto 1 ha obtenido muestras biológicas de tres estructuras cerebrales (córtex prefrontal, núcleo estriado e hipocampo) de ratones con comportamiento frustrado de obtención de comida de alta palatabilidad y de consumo de cocaína. El modelo incluye las siguientes situaciones experimentales: frustración, desesperación, control positivo, control negativo y *yoked*. Durante la primera anualidad, en el contexto del subproyecto 2, se extrajeron muestras de RNA a partir de las distintas estructuras del modelo de comida palatable y se obtuvieron los perfiles transcriptómicos a escala genómica de todas ellas. Durante la segunda anualidad se llevó a cabo el análisis estadístico de estos datos, y se procedió a la extracción de las muestras de RNA del segundo modelo murino operante (cocaína). Como ampliación de los objetivos inicialmente planteados, durante la segunda anualidad se analizaron los resultados de un **modelo murino de autoadministración activa y pasiva de MDMA (éxtasis)**.

Finalmente, durante la tercera anualidad las investigaciones se han centrado en extender el análisis bioinformático de los resultados del modelo murino de frustración/desesperación ante la privación de comida palatable y se ha llevado a cabo la parte experimental y analítica del estudio transcriptómico del modelo murino de



frustración/desesperación ante la privación de cocaína. Las últimas semanas de ejecución del proyecto se están dedicando a la validación por qRT-PCR de los resultados obtenidos en el segundo modelo. Los resultados obtenidos señalan distintos genes cuya expresión está alterada en diferentes circunstancias experimentales. El análisis global de vías funcionales con una frecuencia elevada de genes diferencialmente expresados ha conducido a la identificación de un sistema en particular, la vía de señalización DA-DARPP32, relacionada con la neurotransmisión dopaminérgica, y que aparece en los análisis de los resultados del modelo murino de frustración/desesperación de comida palatable y también en el de cocaína.

Para terminar, se ha realizado una segunda ampliación del proyecto, en este caso con un **estudio de asociación caso-control en humanos** que tiene por objetivo principal la identificación de variantes genéticas comunes de susceptibilidad a la dependencia de cocaína. El estudio se centra en 37 genes que pertenecen a distintas vías funcionales candidatas, seleccionadas a partir de los resultados de expresión génica diferencial obtenidos en los distintos modelos murinos. Se ha obtenido una asociación significativa entre la dependencia de cocaína y el gen que codifica uno de los receptores de serotonina (5HT-2A).

ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN: (Se adjuntarán tres separatas de cada uno de ellos)

A lo largo de las tres anualidades se han publicado o están en vías de publicación los siguientes artículos:

Fernández-Castillo N, Orejarena MJ, Ribasés M, Blanco E, Casas M, Robledo P, Maldonado R, Cormand B. Active and passive MDMA ('ecstasy') intake induces differential transcriptional changes in the mouse brain. *Genes Brain & Behavior*, 2012 Feb; 11(1):38-51. doi: 10.1111/j.1601-183X.2011.00735.x. Epub 2011 Nov 16.

Fernández-Castillo N, Roncero C, Grau-Lopez L, Barral C, Prat G, Rodríguez-Cintas L, Sánchez-Mora C, Gratacòs M, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Ribasés M, Cormand B.



Association Study Of 37 Genes Related To Serotonin And Dopamine Neurotransmission And Neurotrophic Factors In Cocaine Dependence. *Genes Brain & Behavior*, 2012 Dec 14. doi: 10.1111/gbb.12013. [Epub ahead of print]

Martín-García E, Fernández-Castillo N, Burokas A, Gutiérrez-Cuesta J, Ribasés M, Cormand B, Maldonado R. Operant model of frustrated expected chocolate reward induces differential transcriptional changes in the mouse brain. *Addiction Biology*, in preparation (December 2012)

Fernández-Castillo N, Gutiérrez-Cuesta J, Burokas A, Martín-García E, Ribasés M, Maldonado R, Cormand B. Operant model of frustrated expected cocaine reward induces differential transcriptional changes in the mouse brain. *Addiction Biology*, in preparation (December 2012)

Además, los resultados derivados de este proyecto han sido presentados en varios congresos internacionales:

- **8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona, España. Julio 14-18, 2012.**
Fernández-castillo N, Roncero C, Grau L, Barral C, Prat G, Rodríguez L, Sánchez C, Gratacós M, Ramos JA, Casas M, Ribasés M, Cormand B. Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence.
- **The 12th International Congress of Human Genetics (ICHG) and the American Society of Human Genetics (ASHG) 61st Annual Meeting . Montreal, Canada. 11-15 Octubre, 2011.**
Fernández-Castillo N, Orejarena MJ, Ribasés M, Casas M, Robledo P, Maldonado R, Cormand B. Active and passive MDMA ('ecstasy') intake induces differential transcriptional changes in the mouse brain.
- **Workshop on Neuropsychopharmacology for Young Scientists in Europe (European College of Neuropsychopharmacology, ECNP). Nice, Francia. Marzo 2011.**
Orejarena MJ, Fernández-castillo N, Ribasés M, Casas M, Robledo P, Maldonado R, Cormand B. Active and passive MDMA (ecstasy) intake induces transcriptional changes in the mouse brain.



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

El proyecto, inicialmente centrado en el efecto sobre el transcriptoma de un modelo murino de 1) la comida de alta palatabilidad y 2) una droga psicoestimulante (cocaína) se ha ampliado a 3) una segunda droga psicoestimulante (**3,4-metilendioximetanfetamina, MDMA, o éxtasis**), como ya se describió en el informe correspondiente a la segunda anualidad. La ampliación tiene como objeto profundizar en el efecto de distintas sustancias psicoestimulantes, puesto que podrían producirse alteraciones comunes en la expresión génica. Además, durante la tercera anualidad se ha incluido un **estudio de asociación caso-control en humanos** con el objetivo de identificar variantes genéticas de elevada frecuencia en la población que incrementen el riesgo de los individuos consumidores de cocaína a desarrollar dependencia a esta droga.

OBJETIVOS PLANTEADOS: (Transcribir los del proyecto original)

El objetivo general del proyecto de investigación coordinado consiste en evaluar A) los mecanismos neurobiológicos implicados en los procesos de recaída al consumo de cocaína y B) las alteraciones que aparecen en el adicto en ausencia de dicho consumo. Nuestro subproyecto de análisis transcriptómico se centra en el punto B) y tiene los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar las consecuencias de un comportamiento frustrado de obtención de comida de alta palatabilidad en el transcriptoma de tres estructuras cerebrales (córtex prefrontal, núcleo estriado e hipocampo) de ratón, a partir de un modelo desarrollado por el subproyecto 1.

Enfoque experimental: Determinación de los niveles de expresión a escala genómica (34.000 genes) mediante análisis de *microarrays*.



2. Realizar un estudio equivalente al del punto 1 en un modelo de comportamiento frustrado de autoadministración compulsiva de cocaína desarrollado por el subproyecto 1.

Enfoque experimental: Determinación de los niveles de expresión a escala genómica (34.000 genes) mediante análisis de *microarrays*.

3. Validar 50 genes diferencialmente expresados a la vez en el modelo de frustración en la autoadministración de cocaína y en el modelo de frustración en la obtención de comida. Validar 50 genes diferencialmente expresados en el modelo de frustración para la autoadministración de cocaína pero no en el modelo de frustración para la obtención de comida.

Enfoque experimental: PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

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

Objetivo 1: Evaluar las consecuencias de un comportamiento frustrado de obtención de comida de alta palatibilidad en el transcriptoma de tres estructuras cerebrales (corteza prefrontal, núcleo estriado e hipocampo) de ratón, a partir de un modelo desarrollado por el subproyecto 1.

Esta parte del proyecto se ha completado durante esta última anualidad y hemos preparado un primer borrador de artículo para enviarlo próximamente a la revista *Addiction Biology*. Hemos profundizado en los análisis bioinformáticos y se han obtenido nuevos resultados que se suman a los presentados en el informe anterior (2ª anualidad). También se han validado mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) los genes seleccionados a partir del estudio de expresión génica con *microarrays* ya descritos en el anterior informe. Finalmente, se ha añadido una comparación más al estudio basada en los resultados obtenidos en el modelo murino de abuso de MDMA



(éxtasis): las diferencias en los niveles de expresión génica obtenidos por la auto-administración de comida de alta palatabilidad.

Se detallan a continuación los resultados finales del estudio:

Cambios transcripcionales inducidos por situaciones de frustración o desesperación:

Para evaluar cambios en la expresión génica inducidos por una situación de **frustración** o **desesperación** ante la restricción de comida de alta palatabilidad, se compararon los perfiles de ratones frustrados, desesperados y controles positivos en tres estructuras cerebrales (corteza frontal, núcleo estriado ventral e hipocampo).

Se observaron diferencias en corteza frontal y en núcleo estriado ventral en al menos una comparación, pero no se identificaron diferencias de expresión en ninguna de las comparaciones de hipocampo (**Figura 1A**).

Cambios inducidos por una situación de desesperación

Únicamente se observaron diferencias significativas en la expresión génica en ratones desesperados en el núcleo estriado ventral: desesperación vs control positivo (235 genes) y desesperación vs frustración (1423 genes) (**Figura 1A**). Hemos centrado nuestra atención en los genes que presentaron expresión diferencial en ambas comparaciones en la misma dirección, un total de 228 transcritos (prácticamente todos los resultados significativos obtenidos en la comparación desesperación vs control positivo), la mayoría de ellos subexpresados (**Figura 1B**). Las vías de “*spliceosoma*” y “degradación de RNA” mostraban una sobrerrepresentación de genes diferencialmente expresados en el análisis de “*KEGG pathways*” (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). También se observó una remarcable implicación del metabolismo de inositol, tanto a nivel de síntesis como de degradación, en el análisis de vías canónicas obtenidas por “*Ingenuity Pathway Analysis*” (IPA). También estaban enriquecidas las vías de señalización de JAK y CNTF (**Figura 1B**).

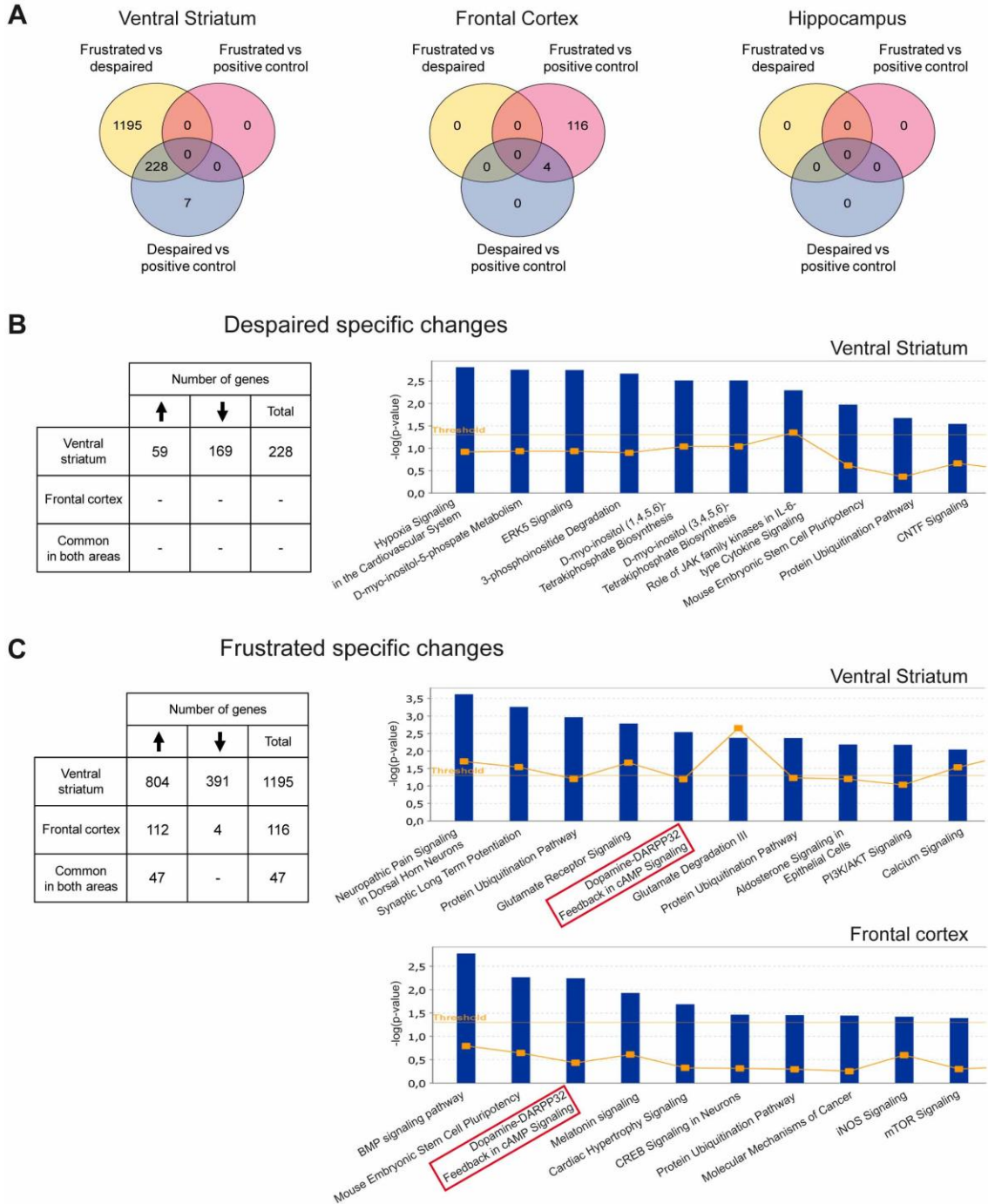


Figura 1. Cambios en la expresión génica causados por situaciones de **frustración** o **desesperación** ante la restricción de comida de alta palatabilidad. **A)** Diagramas Venn, con el número de genes diferencialmente expresados en cada comparación y en cada estructura cerebral analizada. **B)** Cambios en la expresión génica específicos de **desesperación**. En el panel de la izquierda, desglose de los genes sobreexpresados y subexpresados en cada estructura cerebral. A la derecha, las 10 vías canónicas enriquecidas de forma más significativa en los genes descritos en el panel anterior. **C)** Cambios en la expresión génica específicos de **frustración**. En el panel de la izquierda, desglose de los genes sobreexpresados y subexpresados en cada estructura cerebral. A la derecha, las 10 vías canónicas enriquecidas de forma más significativa en los genes descritos en el panel anterior. Enmarcado en rojo, la vía



común identificada en el núcleo estriado ventral y en la corteza frontal: señalización DA – DARPP32.

Se seleccionaron 7 genes diferencialmente expresados en las dos comparaciones para su posterior validación por qRT-PCR, todos ellos implicados en procesos neurológicos: *Crebbp*, *Cnr1*, *Plcb1*, *Nrxn1*, *Jak1*, *Casc4* y *Grit*. Se escogieron los genes *Hprt1* y *Gapdh* como genes de expresión constante, tras comprobación experimental, para normalizar los obtenidos. Se ha confirmado la subexpresión de todos estos genes en ratones en situación de **desesperación**.

Cambios inducidos por una situación de frustración

La situación de **frustración**, objeto principal de este proyecto, induce cambios en la expresión génica tanto en corteza frontal como en el núcleo estriado ventral.

En la corteza frontal, 116 genes presentaban expresión diferencial únicamente al comparar ratones frustrados con el control positivo (**Figura 1A**). Casi todos ellos cuales mostraban una sobreexpresión en el ratón frustrado (**Figura 1C**). En el núcleo estriado ventral, aunque no se pudieron identificar cambios en la comparación frustración-control positivo, un total de 1195 genes estaban diferencialmente expresados al comparar ratones frustrados y desesperados (**Figura 1A**), la mayoría de ellos sobreexpresados también en ratones frustrados (**Figura 1C**).

Con el objetivo de comparar los cambios en la expresión génica observados en ambas estructuras cerebrales, se han buscado genes que presentaran expresión diferencial tanto en la corteza frontal como en el núcleo estriado ventral (116 genes y 1195, respectivamente), y sorprendentemente 47 de ellos eran comunes en ambas áreas, todos ellos mostrando la misma dirección: sobreexpresión en situación de **frustración** (**Figura 1C**). Para evaluar posibles mecanismos comunes implicados en la sobreexpresión mayoritaria en ratones frustrados, realizamos un análisis de enriquecimiento de sitios de unión a factores de transcripción (TFBS) en los genes sobreexpresados en cada estructura por separado y en los genes comunes a las dos estructuras. Sorprendentemente, cuatro posibles factores de transcripción estaban

sobrerrepresentados tanto en el grupo de genes de corteza frontal como en el grupo de estriado ventral, y también en los genes comunes entre ambos: *Nkx2-5*, *Pdx1*, *Sox5* y *Sry*. También se ha realizado un análisis para detectar si hay un enriquecimiento de transcritos de origen glial o neuronal, para dislumbrar los mecanismos implicados en la **frustración**. Este análisis pone de manifiesto un enriquecimiento significativo de transcritos de origen neuronal en el grupo de genes con expresión diferencial (**Figura 2**).

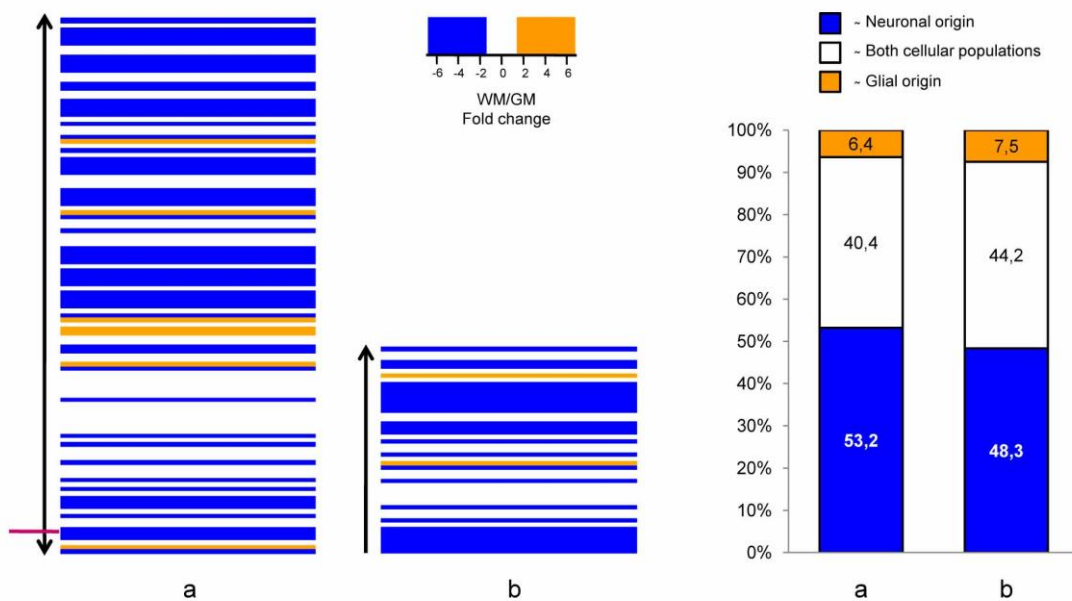


Figura 2. Enriquecimiento glial/neuronal de los genes con expresión alterada en corteza frontal (FC) en el modelo de **frustración**. a) Transcritos diferencialmente expresados (n=116) en FC entre ratones frustrados y control positivo. b) Transcritos diferencialmente expresados (n=47) en ratones frustrados comunes entre FC y estriado ventral. Panel de la izquierda: los transcritos están ordenados verticalmente de acuerdo con el cambio en la expresión génica (de mayor a menor). Las flechas indican sobreexpresión (hacia arriba) o subexpresión (hacia abajo), separadas por una barra morada. Los diferentes colores indican el origen celular del transcrito: naranja – origen glial (WM/GM>1.5), azul – origen neuronal (WM/GM<-1.5), y blanco – ambas poblaciones celulares (-1.5<WM/GM<1.5) (Sibile, et al 2008). Panel de la derecha: porcentaje de transcritos según su origen celular.

El análisis de enriquecimiento de vías canónicas mostró una vía muy interesante enriquecida en genes con expresión alterada tras la **frustración** tanto en corteza frontal como en el núcleo estriado ventral: “*Dopamine – DARPP32 feedback in cAMP*”

“Signaling” o vía de señalización Dopamina – DARPP32 (**Figura 1C, Figura 3**). Esta vía es especialmente interesante por haber sido previamente relacionada con comportamiento agresivo y privación de comida, y consideramos que es el resultado más identificativo de la situación de **frustración** obtenido en este estudio.

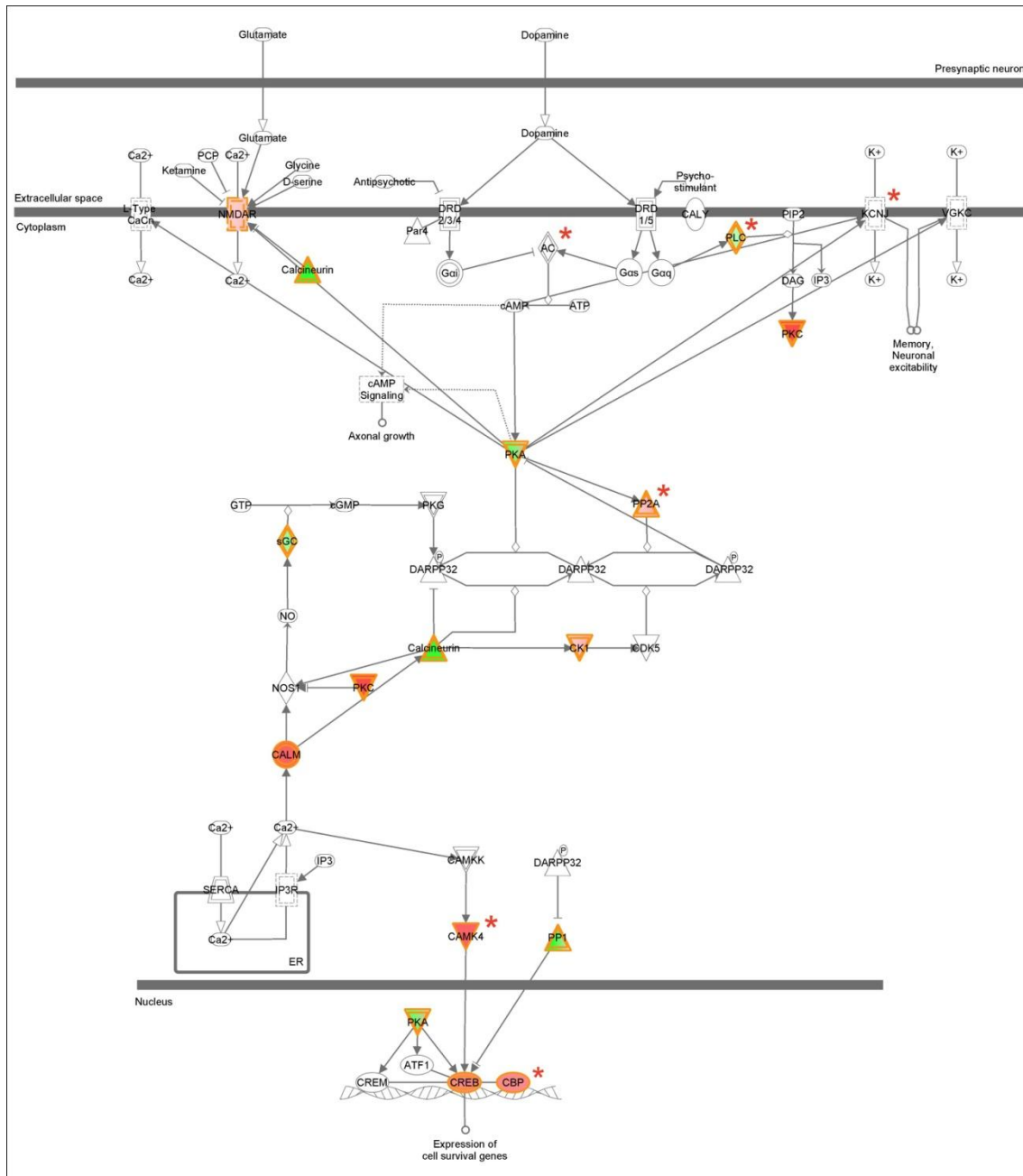


Figura 3. Vía de señalización DA-DARPP32. Se muestran en rojo o verde los genes sobreexpresados o subexpresados, respectivamente, en el núcleo estriado ventral de ratones **frustrados**. Los genes indicados con un asterisco rojo corresponden a genes sobreexpresados en corteza frontal en ratones frustrados.



En esta parte del estudio también se validó la expresión diferencial de otros genes por qRT-PCR, varios de ellos de la vía de señalización DA-DARPP32: *Crebbp*, *Cnr1*, *Plcb1*, *Nrxn1*, *Jak1*, *Casc4*, *Camk4*, *Kalrn*, *Rph3a*, *Prkcb* y *Gprin3*. Se consideró, tras comprobación de expresión constante en las diferentes condiciones experimentales, los genes *Hprt1* y *Gapdh* como genes endógenos para normalizar la expresión. Se confirmó la sobreexpresión de todos ellos, excepto *Rph3a*, en la situación de **frustración**.

Cambios transcripcionales inducidos por la auto-administración de comida de alta palatabilidad:

Con el objeto de identificar cambios causados por la administración activa o pasiva de comida de alta palatabilidad, basándonos en los resultados obtenidos para MDMA (éxtasis) descritos en el anterior informe, se compararon los perfiles de expresión génica del grupo control positivo, *yoked* y control negativo en las tres regiones cerebrales estudiadas.

Sólo se observó expresión génica diferencial en el núcleo estriado ventral, al comparar el grupo control positivo y el grupo *yoked* (n=624) y también al comparar el grupo control positivo con el grupo control negativo (n=429). No se identificaron cambios de expresión génica entre el grupo *yoked* y el grupo control negativo, lo que implica que la comida de alta palatabilidad no tuvo ningún efecto directo.

Nos centramos en genes que presentaban expresión diferencial como consecuencia del consumo activo, y para ello consideramos únicamente los genes que con una misma dirección de cambio en la expresión en las dos comparaciones: control positivo *vs yoked* y control positivo *vs* control negativo. Un total de 210 genes estaban diferencialmente expresados debido al consumo activo, y de ellos 50 genes estaban implicados en mecanismos de comunicación célula-célula (GO:0007154, AdjP = 0,0082) (**Figura 4**). Las vías de señalización de neurotrofinas y de MAPK también se identificaron como enriquecidas en genes diferencialmente expresados. El análisis de vías canónicas apuntaron a la vía de señalización del factor neurotrófico CNTF.

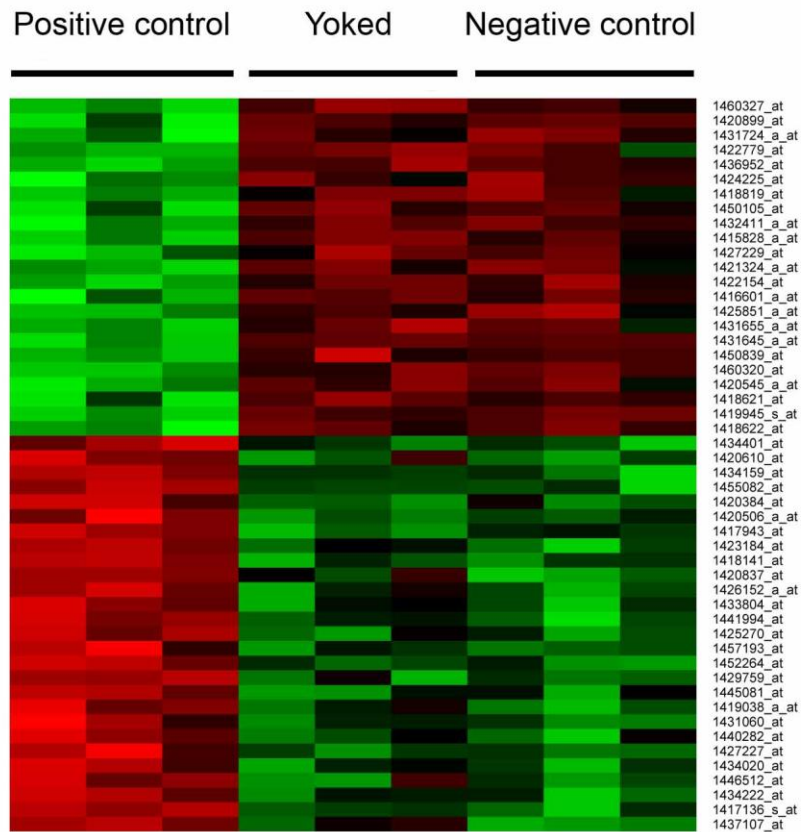
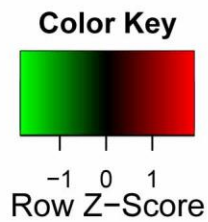


Figura 4. Genes implicados en la comunicación célula-célula diferencialmente expresados en el consumo activo de comida de alta palatabilidad. La representación *Heatmap* (derecha) muestra el nivel de expresión en los *microarrays* de los 50 genes identificados con esta función. Para cada grupo experimental se muestran las tres réplicas experimentales realizadas.

Objetivo 2: Realizar un estudio equivalente al del punto 1 en un modelo de comportamiento frustrado de autoadministración compulsiva de cocaína desarrollado por el subproyecto 1.



Antecedentes: En el informe anterior se indicó que el equipo responsable del subproyecto 1, dirigido por Rafael Maldonado (PNSD#2009/026) había desarrollado el modelo operante murino de comportamiento de frustración en situaciones de búsqueda compulsiva de cocaína y habían empezado a extraer muestras de distintas estructuras cerebrales.

A lo largo de esta última anualidad el equipo del subproyecto 1 (PNSD#2009/026) ha extraído y transferido al equipo del subproyecto 2 (PNSD#2009/022) muestras de tres estructuras cerebrales (corteza prefrontal, núcleo estriado e hipocampo) en cinco situaciones experimentales (frustración, desesperación, control positivo, control negativo y *yoked*) y correspondientes a 9 réplicas organizadas en *pools* de 3 individuos. Se han realizado, pues, las extracciones de RNA total de cada muestra individualmente y se ha comprobado la calidad de las muestras mediante Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Se han hibridado las muestras de RNA con *arrays* GeneChip mouse Gene 430 2.0 (Affymetrix) para evaluar los niveles de expresión génica a nivel transcriptómico. Cada *array* contiene 45.000 colecciones de sondas que permiten detectar más de 39.000 transcritos de unos 34.000 genes. Se presenta a continuación el análisis de los datos, realizado mediante el software Bioconductor para R (www.bioconductor.org).

Control de calidad de la hibridación: En primer lugar se han realizado controles de calidad mediante distintas aproximaciones estadísticas con la librería *affyPLM*: Se ha verificado la homogeneidad de las imágenes, se han comparado los perfiles de expresión global para cada chip mediante histogramas, se ha comparado la media y los percentiles de estos valores de expresión global para todos los genes con los gráficos *boxplot*, se ha comprobado la homogeneidad inter-chip de los patrones de degradación del RNA, se ha comprobado que los IQR (rango inter-cuantil) y las medias de los niveles de expresión cada chip sean similares, así como la topología de las nubes de puntos, con el gráfico *MA plot*. También se han realizado diferentes controles métricos de calidad en los que se ha evaluado el ruido de fondo medio de cada chip, los *scale factors*, el porcentaje de *present calls* y las proporciones entre extremos 3' y 5' de las



moléculas de RNA, así como otras medidas estadísticas como el *relative log expression* (RLE) y los *Normalized Unscaled Standard Errors* (NUSE). Una vez realizados los controles y comprobado que todos los chips cumplían los criterios de calidad, se ha realizado la corrección del ruido de fondo (*background*), normalización y sumarización mediante el *Background method*, *Robust Multichip Average* (RMA) y el método *Medianpolish*, respectivamente. Se han filtrado aquellos genes que no correspondían a genes conocidos, y además aquellos que no alcanzaban un mínimo umbral de expresión ($\log_2(60)$).

Comparaciones: Se ha utilizado la librería *Linear Modeling for Microarray Analysis* (LIMMA) para realizar las distintas comparaciones, en las que hemos contrastado los patrones de expresión de los siguientes grupos experimentales: frustración-desesperación, frustración-control positivo, desesperación-control positivo, control positivo-control negativo, control positivo-yoked, yoked-control negativo. Cada comparación se ha realizado en tres estructuras cerebrales distintas: corteza prefrontal, núcleo estriado ventral e hipocampo. Después de obtener los listados de genes que mostraban diferencias de expresión significativas, se realizaron diferentes análisis bioinformáticos: 1) Sobrerepresentación de grupos funcionales mediante *DAVID Annotation Tool* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) y *Gene Ontology* (<http://www.geneontology.org>), 2) vías funcionales sobrerepresentadas (*KEGG pathways*) mediante el *software* WebGESTALT (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>), 3) construcción de redes génicas mediante *Ingenuity Pathway Analysis 8.8* (<http://www.ingenuity.com>), y 4) identificación de sobrerepresentación de TFBS (transcription factor binding sites) mediante oPOSSUM 2.0 (<http://www.cisreg.ca/cgi-bin/oPOSSUM/oPOSSUM>), 5) análisis de enriquecimiento de transcritos de origen neuronal/glial.

Los resultados más interesantes se han obtenido en la **corteza frontal**, observándose cambios en la expresión de más de 1800 genes en la comparación frustración-control positivo, única comparación con cambios consistentes con el estudio realizado en el marco del **Objetivo 1**. Estos genes están principalmente implicados en la procesos de ubiquitinación, transmisión sináptica, señalización célula-célula, procesamiento de



RNA, regulación de niveles de neurotransmisión y organización cromosómica, funciones muy similares a las obtenidas en el anterior estudio. Entre las vías canónicas enriquecidas se identifica nuevamente la vía de señalización DA-DARPP32, relacionada con la neurotransmisión dopaminérgica.

A continuación se ha realizado una selección inicial de genes comunes identificados en el proyecto 1 (chocolate) y el presente proyecto (cocaína), en ambos casos con expresión diferencial en situación de frustración ante la privación de la sustancia.

De un total de 65 genes comunes, se han seleccionado los siguientes 48 genes para su posterior validación por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR), proyecto que se encuentra en su fase final:

Acly, Add3, Agk, Ahctf1, Akap9, Arf2, Asb8, Asph, Braf, C1qb, Centa2, Cnot7, Cs, Cux1, Ddx46, Epm2aip1, Foxp1, Gpr88, Gucy1a3, Kcnma1, Kif1b, Lamp2, Lrp6, Lrrtm3, Mapk1ip1l, Mtm1, Nedd4l, Nrnx3, Ogt, Pde4dip, Ppm1l, Ptpfrf, Pum1, Rbm12b, Rfx1, Serinc3, Slc1a1, Syt16, Tanc2, Tcf12, Tgoln1, Trak1, Trim37, Trim9, Trio, Ugcg, Wdr57, Zfp62

Objetivo 3: Validar 50 genes diferencialmente expresados a la vez en el modelo de frustración en la autoadministración de cocaína y en el modelo de frustración en la obtención de comida. Validar 50 genes diferencialmente expresados en el modelo de frustración para la autoadministración de cocaína pero no en el modelo de frustración para la obtención de comida.

La descripción de los resultados relacionados con el Objetivo 3 se incluye en los dos puntos anteriores (Objetivo 1 y Objetivo 2).

Ampliación de los objetivos iniciales: Estudio de asociación caso-control en humanos entre la dependencia de cocaína y 37 genes implicados en la neurotransmisión, factores neurotróficos y sus receptores

Los resultados obtenidos en los estudios de frustración/desesperación en relación al consumo de comida de alta palatabilidad o cocaína, realizados en modelos murinos,



apuntan a varios genes y vías funcionales. Entre ellas destaca la vía “*Dopamine – DARPP32 feedback in cAMP Signaling*” o vía de señalización Dopamina–DARPP32, relacionada con la neurotransmisión dopaminérgica. Por esta razón hemos llevado a cabo un estudio complementario en humanos centrado en esta vía y en otros sistemas funcionales relacionados (neurotransmisión serotoninérgica y factores neurotróficos). El trabajo consistió en un estudio de asociación caso-control realizado con más de 300 variantes genéticas polimórficas de tipo SNP (cambios de un solo nucleótido), frecuentes en la población general, localizados en 37 genes candidatos de las vías mencionadas, que incluyen genes implicados en la síntesis y degradación de dopamina y serotonina, los transportadores de ambos neurotransmisores, factores neurotróficos y sus receptores. Las variantes fueron seleccionadas con criterios de máxima cobertura genética usando el *software LD-select* (<http://droog.gs.washington.edu/ldSelect.html>) y teniendo en cuenta los patrones de desequilibrio de ligamiento en las regiones estudiadas según la base de datos HapMap (<http://www.hapmap.org>). Todos los SNPs tienen frecuencias alélicas para el alelo menor (MAF) superiores al 10%. Se compararon las frecuencias alélicas y genotípicas para 319 variantes en equilibrio Hardy-Weinberg en 432 individuos dependientes de cocaína diagnosticados con criterios DSM-IV, procedentes del Hospital Universitario Vall d’Hebron (Barcelona) y de la Unidad de Salud Mental de la Fundación Althaia del Hospital Sant Joan de Déu (Manresa) y 482 controles, todos ellos de nacionalidad española y etnia caucásica. El análisis de marcadores individuales permitió identificar asociaciones nominales entre 12 SNPs y la dependencia de cocaína. Después de ajustar por edad, 8 SNPs de 7 genes (*HTR1E*, *HTR2A*, *DBH*, *TH*, *NTRK2*, *NTRK3* y *CNTFR*) mantenían asociaciones significativas. Todos ellos fueron evaluados por su posible efecto sobre el tiempo transcurrido entre el consumo inicial de la droga y la aparición de la dependencia, sin resultados estadísticamente significativos. Sólo una de las variantes genéticas (rs6561333), situada en el gen *HTR2A*, que codifica para el transportador 2A de serotonina, superó las correcciones por múltiples comparaciones (*False Discovery Rate*, FDR, del 10%), con un P-valor ajustado por edad de 1,9e-04 (OR=1,72, CI 95% 1,29-2,30). Al subdividir a los pacientes en función de la presencia o ausencia de síntomas sicóticos se confirmó la asociación con la dependencia de cocaína en ambos grupos.



Finalmente, el análisis de marcadores múltiples considerando los 21 SNPs genotipados en el gen *HTR2A* no reveló ninguna combinación haplotípica asociada a la patología después de aplicar correcciones por permutación.

Este trabajo es el primer estudio de asociación genética que investiga sistemáticamente las vías funcionales mencionadas en relación a la dependencia de drogas, con la excepción de algunos estudios de tipo GWAS (*Genome-Wide Association Study*) (Drgon et al. 2010. PLoS One 5:e8832; Johnson et al. 2011. PLoS One 6:e19210; Uhl et al. 2008. Ann N Y Acad Sci 1141:318). El receptor serotoninérgico identificado es abundante en el sistema dopaminérgico mesolímbocortical y tendría un efecto modulador de los efectos comportamentales de la cocaína. Así, antagonistas del receptor 5-HT_{2A} inhiben la sensibilización comportamental y la hiperlocomoción inducidas por la cocaína, mientras que los agonistas estimulan el efecto estimulante de la locomoción asociado al consumo de cocaína (Davidson et al. 2002. Eur J Pharmacol 453:255; Filip et al. 2004. J Pharmacol Exp Ther 310:1246). Además, el pre-tratamiento con antagonistas 5-HT_{2A} también bloquea comportamientos de búsqueda de cocaína inducidos por señales en ratas y en primates no humanos, sin modificar los efectos reforzantes de la droga (Fantegrossi et al. 2002. Psychopharmacology (Berl) 161:356; Filip et al. 2006. Psychopharmacology (Berl) 183:482). En resumen, los resultados de varios estudios en modelos animales y la asociación detectada en humanos el presente trabajo sugieren que el gen que codifica este receptor de serotonina es un buen candidato a estar implicado en la dependencia de cocaína en humanos.



MINISTERIO
DE SANIDAD
Y POLÍTICA SOCIAL

SECRETARIA GENERAL DE
POLITICA SOCIAL

DELEGACION DEL GOBIERNO
PARA EL PLAN NACIONAL
SOBRE DROGAS

OTRAS SUBVENCIONES O AYUDAS RECIBIDAS PARA ESTE PROYECTO:

origen, cantidad, en qué se aplica

No aplicable

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

Ninguna

**En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección
pndinvestigación@msps.es la presente memoria.**

En Barcelona, a 25 de Diciembre de 2012



Bru Cormand Rifà (IP del proyecto)