

© Autores de las ponencias y conferencia

Coordinadores de la Jornada:

José Carlos Pérez de los Cobos

Silvia Mendieta Caviedes

J. Carlos Valderrama Zurrian

Edita: Sociedad Española de Toxicomanías

ISBN: 84-611-1370-5

Imprime: Martin Impresores, S.L.

Depósito legal:

"20 Aniversario del Plan Nacional sobre Drogas"

Genética de las Adicciones

10 de Mayo de 2006

Jornada organizada por la Sociedad Española de Toxicomanías

Financiado por



INDICE

PRESENTACION. Jornadas sobre Genética de las Adicciones de la SET

D. Jose Oñorbe de Torre
Subdirector General de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas

CONFERENCIA. Aspectos genéticos en el juego patológico 9

Ángela Ibáñez
Servicio de Psiquiatría. Unidad de Ludopatía
Hospital Ramón y Cajal
Universidad de Alcalá. Madrid

PARTE I. Introducción a la genética

Conceptos básicos de la investigación en genética de los trastornos mentales 35

Francisco Martínez
Unidad de Genética Hospital Universitario La Fe. Valencia

Investigación genética en enfermedades complejas 53

Javier Costas
Centro Nacional de Genotipado (CeGen)
Grupo de Medicina Xenómica
Universidade de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela

PARTE II. Mesa de Debate y Reflexión:

Contribución de la genética a la etiología de las adicciones

Aportaciones de la genómica y la proteómica al estudio de los trastornos adictivos 73

David Arteta
PROGENIKA Biopharma S.A

Cannabis y Esquizofrenia: un modelo para la comprensión de la interacción genes-ambiente (GxE) 87

Araceli Rosa De la Cruz.
Unidad de Antropología.
Facultat de Biologia. Universidad de Barcelona.

PARTE III A. Mesa de Debate y Reflexión.

La investigación básica en drogodependencias

Sustrato neurobiológico en la adicción de drogas 101

Olga Valverde Granados
Laboratori de Neurofarmacologia
Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universitat Pompeu Fabra de Barcelona

Genética de la susceptibilidad individual a la drogadicción 115

Emilio Ambrosio Flores
Departamento de Psicobiología
Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED)

**PARTE III B. Mesa de Debate y Reflexión:
Genética y alcoholismo**

**Factores genéticos dopaminérgicos y cannabinoides en la comorbilidad
adictiva de los pacientes psiquiátricos** **135**

Guillermo Ponce Alfaro
Servicio de Psiquiatría
Hospital Universitario 12 de Octubre

Factores genéticos en la patogenia de la hepatopatía alcohólica **147**

Jose Maria Ladero Quesada
Departamento de Medicina de la Universidad Complutense
Jefe de Sección del Servicio de Aparato Digestivo
Hospital Clínico San Carlos, de Madrid

Polimorfismos del ADN en el alcoholismo **161**

Isabel Julia Pastor Encinas
Unidad de Alcoholismo. Servicio de Medicina Interna II
Hospital Universitario de Salamanca.

Documento de Consenso sobre Genética de las Adicciones de la Sociedad Española de Toxicomanías

El primer borrador del genoma humano fue publicado hace cinco años, en febrero de 2001. Según este proyecto singular, los seres humanos contamos aproximadamente con 30000 genes, 50% de los cuales se expresan en el cerebro. Estos datos constituyen unos de los exponentes principales del enorme desarrollo experimentado por la genética en los últimos años. Tal desarrollo permite que la genética médica se encamine en el momento actual a la tarea de identificar el componente hereditario de nuestra predisposición a padecer enfermedades.

Nos encontramos en uno de esos momentos clave del avance científico en el que la descripción de un nuevo ámbito de nuestro medio interno inaugura una larga lista de nuevas líneas de investigación de tipo fisiológico o terapéutico. Si la descripción del genoma humano es ya una realidad, ahora se espera conocer mejor cómo funciona este complejo entramado molecular. Tal esfuerzo nos permitirá seguramente describir el proteoma y ampliar de forma espectacular nuestro arsenal terapéutico.

Una situación como la que se describe es muy probable que produzca muchos cambios en nuestra manera de entender las enfermedades. Existen motivos para pensar que estos cambios afectarán muy especialmente a nuestro entendimiento de las adicciones. En estos trastornos la interacción entre la herencia y el ambiente tiene una importancia singular.

Si se identificasen los factores genéticos implicados en la etiología de las adicciones, los clínicos deberán acometer una ardua labor de puesta al día. Ante la plétora de nuevos términos, nuevas técnicas y nuevas alternativas terapéuticas que se utilizan o ensayan en los estudios de investigación sólo cabe ponerse en marcha para el momento en que ya esté disponible la aplicación práctica. La cuestión es que el mencionado "momento" ya lo estamos viviendo: un chip para determinar el perfil metabolizador de los pacientes respecto a diferentes citocromos ya ha sido comercializado en EEUU para ser utilizado por los psiquiatras.

En este momento crucial, la Sociedad Española de Toxicomanías (SET) ha convocado una reunión de expertos que coinciden en resaltar los siguientes aspectos claves respecto a la genética de los trastornos adictivos:

1. El progreso en la prevención y el tratamiento de las adicciones pasa por una mejor comprensión de la etiología de estos trastornos.

Hasta ahora las intervenciones terapéuticas se habían basado en el control y manejo más adecuado de los factores ambientales, como si estos fueran los únicos agentes causales

que inician y mantienen los trastornos adictivos. Sin embargo, la experiencia clínica muestra que éste es un abordaje parcial del problema. Sabemos que no todas las personas se exponen por igual al riesgo de desarrollar una adicción. Dicho de otro modo, existen muchas diferencias individuales en cuanto a la frecuencia con que las personas prueban por primera vez sustancias psicoactivas. Además, una vez que estas son probadas no todas las personas tienden con la misma intensidad o frecuencia a volver a consumirlas. Por último, cuando el hábito está ya instaurado también existen muchas diferencias respecto a la capacidad para reducir significativamente o detener completamente el consumo. En todas estas facetas del proceso adictivo es muy probable que numerosos factores genéticos estén involucrados de forma significativa.

2. Las adicciones son debidas en parte a factores genéticos.

Los estudios de epidemiología genética (agregación de enfermedades en familias, concordancia de gemelos homocigóticos frente a dicigóticos y estudios de adopción) muestran que en la etiología de las adicciones existe un componente genético muy importante (heredabilidad: 0,30-0,50), aunque no tan elevado como en otros trastornos mentales tales como la esquizofrenia o el trastorno bipolar (heredabilidad 0,50-0,80).

Las cifras de heredabilidad referidas nos indican que la presencia de los factores genéticos de vulnerabilidad incrementa el riesgo de sufrir adicciones, aunque no determinan su aparición. Así, es factible que un portador de tales factores genéticos nunca desarrolle una adicción y que, por el contrario, sufra tal trastorno una persona que carezca de los mismos.

3. Una amplia variedad de genes están implicados en la aparición y persistencia de las diferentes formas de adicción.

Los resultados de los estudios de asociación y ligamiento muestran que las adicciones están sujetas a herencia poligénica (multifactorial y compleja). Seguramente, varios factores genéticos específicos (para cada sustancia) e inespecíficos (entre los que destacan los relacionados con el sistema dopaminérgico) contribuyen a la aparición de las diferentes variedades de adicción. En consecuencia, las adicciones estarían relacionadas con la coincidencia en una misma persona de un conjunto de polimorfismos genéticos sin que la presencia aislada de uno de estos polimorfismos tenga un papel suficiente para determinar la aparición del trastorno.

En el proceso de la adicción a una sustancia están implicados más de un sistema neurobiológico. Entre estos sistemas destacan los dependientes de los siguientes neurotransmisores: dopamina, GABA, glutamato, endocannabinoides, endorfinas, y serotonina. Diferentes líneas de investigación, sobre todo en animales, han mostrado que estos sistemas funcionales interactúan entre sí, lo que sirve de base fisiopatológica a los numerosos procesos neuro y psicobiológicos (tolerancia, abstinencia, refuerzo, sesgo atencional, aprendizaje, motivación, etc) que integran una adicción.

El caso de la dependencia de opioides puede servir para ilustrar este fenómeno. Es posible que en la dependencia de estas sustancias, determinados polimorfismos del receptor mu opioide constituyan un factor de riesgo para el trastorno. La cuestión es que ciertas variaciones genéticas en los receptores cannabinoides, dopaminérgicos o gabaérgicos, también pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de la dependencia de heroína.

4. La identificación de los genes involucrados en la etiología de las adicciones y sus complicaciones es compleja

Las adicciones son fenómenos complejos caracterizados por un extenso deterioro en muchas áreas del funcionamiento personal. Las personas con adicciones frecuentemente sufren trastornos mentales comórbidos tanto de estado (eje I del DSM-IV) como de rasgo (eje II). Además, también son muy frecuentes las complicaciones físicas (eje III) lo que supone un nuevo foco de comorbilidad. Las patologías presentes en los ejes I, II y III suponen un notable incremento de la variabilidad clínica y también están sujetas a factores de vulnerabilidad genética. Este conjunto de hechos, junto con las dificultades todavía existentes para formular entidades diagnósticas válidas en el campo de las adicciones, plantea serias dificultades a la hora de seleccionar los fenotipos más adecuados para la investigación.

Por otra parte, la adicción y los trastornos y enfermedades que la acompañan interaccionan con el ambiente conformando un juego de factores de riesgo y de protección cuyo funcionamiento puede resultar muy difícil de conocer. Sobre todo porque el signo de estos factores puede cambiar con la edad del sujeto. Además, el significado del término "ambiente" en el caso de las adicciones es mucho más complejo que en el resto de trastornos mentales.

5. Las adicciones son el resultado de la interacción entre la herencia y el ambiente

A las dificultades inherentes al estudio de las bases genéticas de cualquier trastorno mental hay que añadir en el caso que nos ocupa un elemento peculiar: la entrada de una sustancia biológicamente activa en nuestro organismo que puede inducir cambios neuroadaptativos y alteraciones patológicas. Como puede observarse, en el caso de las adicciones "el ambiente" ejerce un efecto biológico directo sin la mediación de los mecanismos de procesamiento de la información.

Los mecanismos de procesamiento de la información también son muy importantes en nuestro caso, como lo demuestran nuestros conocimientos sobre el juego patológico. Si se acepta que este trastorno es una forma de "adicción sin sustancia" deberemos admitir que no es necesaria la entrada de una sustancia en nuestro organismo, para que se desarrolle una conducta compulsiva dirigida a una meta. Y también deberemos aceptar que esta conducta no modelada por el efecto biológico de una sustancia está sujeta a factores de vulnerabilidad genética.

La cuestión es que en la dependencia de sustancias los mecanismos de procesamiento de la información convergen con otros que están inducidos por la acción biológica de la sustancia consumida. Cuando ésta entra en nuestro organismo produce cambios en la expresión génica más o menos duraderos que repercuten significativamente en el desarrollo de la adicción. El resultado es una compleja interacción gen-ambiente (G x E) que estamos muy lejos de entender. Tal interacción supone la existencia de una diferente sensibilidad a los factores ambientales que está moderada o mediada por factores genéticos. Una parte importante de los esfuerzos en la futura investigación sobre adicciones habrán de orientarse hacia la comprensión de esta interacción.

6. En el estudio de la genética de las adicciones existe una amplia variedad de estrategias válidas de investigación.

Los estudios en animales permiten crear situaciones experimentales únicas, como la posibilidad de observar el efecto de una sustancia en un animal que carece de un

determinado gen. En seres humanos los estudios de epidemiología genética permite diferenciar entre factores genéticos específicos e inespecíficos, y entre factores ambientales individuales o compartidos. Además, los estudios familiares y de asociación pueden ayudar a la identificación de los genes implicados en cada tipo de adicción. En este sentido, también pueden ser muy útiles los estudios de hibridación con microarrays para identificar los cambios inducidos por el consumo de una sustancia en el transcriptoma.

7. La identificación de factores genéticos de susceptibilidad a las adicciones incrementará nuestro conocimiento de su fisiopatología, servirá para la identificación de nuevas dianas farmacológicas (farmacogenómica) y contribuirá significativamente a la individualización del tratamiento (farmacogenética).

Los datos disponibles en la actualidad nos permiten establecer esta afirmación sin la sensación de estar incurriendo en especulaciones sin fundamento.

PRESENTACIÓN

Jornadas sobre Genética de las Adicciones de la SET

D. Jose Oñorbe de Torre
Subdirector General de la Delegación del Gobierno
para el Plan Nacional sobre Drogodependencias

Buenos días:

Tengo el placer de inaugurar estas Jornadas de la Sociedad Española de Toxicomanía cuyo contenido va a versar sobre "Genética de las adicciones", un tema de notable interés en el campo de las drogodependencias.

Como todos sabemos, los trastornos adictivos son un fenómeno extraordinariamente complejo, en cuya etiología intervienen múltiples factores de diversa índole, cuyo estudio desde diferentes ópticas y disciplinas resulta imprescindible para llevar a cabo una adecuada política en torno a este problema.

Uno de estos factores es la genética. Como la propia Organización Mundial de la Salud señala, "hay muchos factores individuales, culturales, biológicos, sociales y ambientales que convergen para aumentar o reducir las posibilidades de que un determinado individuo consuma una sustancia psicoactiva y en qué medida... Además de los factores sociales y culturales, hay diferencias en la dotación genética que explican una considerable proporción de la variación individual en el consumo y la dependencia de las sustancias psicoactivas". Por ello, el conocimiento de estos genes y su interacción con los factores ambientales que influyen en la dependencia constituyen un aspecto clave en el tratamiento de las drogodependencias.

Actualmente, se están desarrollando investigaciones en relación con diversos aspectos de esta cuestión. Desde esta Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas hemos financiado algunos proyectos de investigación que ahondan en este tema. También estamos interesados, y prueba de ello es la financiación de estas Jornadas, en que los resultados de estas investigaciones, así como el estado actual de lo que la ciencia tiene que decir sobre estos temas, se transfiera y difunda a los profesionales que trabajan en este campo, de forma que puedan actualizar sus conocimientos y aplicarlos en su práctica cotidiana.

Creo que la celebración de estas Jornadas pueden suponer un fecundo intercambio de experiencias, conocimientos y reflexiones entre científicos, profesionales e instituciones que desarrollan su trabajo en la genética de las adicciones y que, a su vez, nos aporte información y sugerencias que permitan mejorar nuestra actuación como responsables de la ejecución de la política de drogodependencias en España.

Muchas gracias,

CONFERENCIA

Aspectos genéticos en el juego patológico

Ángela Ibáñez
Servicio de Psiquiatría. Unidad de Ludopatía
Hospital Ramón y Cajal
Universidad de Alcalá. Madrid

INTRODUCCIÓN

Para que una investigación genética tenga sentido es preciso realizarla sobre una entidad diagnóstica válida, que tenga unas bases neurobiológicas suficientes, y que haya evidencias de que hay un componente hereditario en el trastorno.

En este sentido, nos debemos plantear la siguiente pregunta: ¿la ludopatía es realmente una entidad diagnóstica válida?. El juego patológico es un trastorno que es tan antiguo casi como la propia historia de la Humanidad, ya que nos podemos remontar a siglos atrás y encontramos descripciones de ludópatas en civilizaciones antiguas. Sin embargo, hasta finales del siglo XIX no empezó el interés por el estudio de este trastorno, y como entidad patológica no se empieza a considerar hasta hace pocos años. Antes se pensaba que era un vicio, una costumbre insana, pero su reconocimiento como trastorno mental tuvo que esperar hasta el año 1980, cuando la Asociación Psiquiátrica Americana (APA) lo incluyó en su clasificación de los trastornos mentales DSM-III, incluyéndolo dentro del grupo de trastornos de control de los impulsos no clasificados en otros apartados.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) por su parte no reconoció este trastorno hasta 1992, cuando publicó su CIE-10, mientras que en la CIE-9 publicada en 1979 no lo contemplaba. Para la OMS "el trastorno consiste en la presencia de frecuentes y reiterados episodios de juegos de apuestas, los cuales dominan la vida del enfermo en perjuicio de los valores y obligaciones sociales, laborales, materiales y familiares del mismo." La definición que hace la CIE-10 de la ludopatía, se asemeja mucho conceptualmente al resto de las adicciones.

En los estudios epidemiológicos realizados en distintos países, se han encontrado cifras similares de prevalencia. También se ha observado que cuando se legalizan los juegos de azar, la prevalencia de la ludopatía aumenta, de manera que las diferencias en la prevalencia dependen fundamentalmente de la accesibilidad que tiene la población general a los juegos de azar. De esta manera la prevalencia del trastorno se sitúa entre el 0,5 y el 2,5 % de la población adulta. Esta cifra de prevalencia aumenta en poblaciones de jóvenes y adolescentes que son sujetos más vulnerables, y también si se estudian poblaciones que tienen más riesgo de padecer este problema como son los sujetos con adicciones.

Los criterios diagnósticos recogidos por la APA en el DSM-IV (1994) y mantenidos en el texto revisado DSM-IV-TR (2000) representan una descripción de los rasgos clínicos esenciales en el juego patológico, aunque ellos establecen para el diagnóstico sólo cinco de los diez criterios, añadiendo además un criterio de diagnóstico diferencial (tabla 1). Se trata de sujetos que están muy preocupados por el juego, piensan constantemente en el juego, o en la manera de obtener dinero para seguir jugando o para pagar las deudas. Se involucran en las conductas relacionadas con el juego progresivamente más, el sujeto tiene que jugar cada vez cantidades mayores para obtener el grado de satisfacción que persigue, lo que se asemeja al concepto de tolerancia en las adicciones. Hay típicamente un fracaso en el control de estas conductas, y el sujeto no puede dejar de jugar aunque se lo proponga. Muchos de los sujetos nos relatan síntomas de abstinencia, cuando intentan dejar de jugar o cuando no pueden jugar porque se le impide de alguna manera, como irritabilidad, nerviosismo, insomnio, de forma también similar a lo que ocurre con otras adicciones. Estos enfermos muchas veces utilizan el juego como una forma de escapar a los problemas, de aliviar tensiones, de olvidarse de sus preocupaciones. Una característica muy típica del jugador patológico, es que se involucran en el juego y siguen jugando para intentar recuperar y a pesar de que pierden reiteradamente, son incapaces de aprender de la experiencia y siguen jugando en un intento absurdo de intentar recuperar lo que han perdido. Con frecuencia recurren a mentiras y engaños para ocultar su grado de implicación en el juego, para conseguir dinero para seguir jugando o para pagar deudas. Muchos de ellos recurren a actos ilegales de distinto grado para poder financiar el juego o hacer frente a sus consecuencias, desde hurtos y robos en el medio familiar, el uso fraudulento de tarjetas de crédito, la falsificación de firmas para la obtención de créditos, llegando también a cometer otros delitos más graves como robos con intimidación, estafas, etc. Todo el cuadro clínico descrito desemboca en una serie de complicaciones en todos los ámbitos del individuo, personales, familiares -muchos acaban separados si estaban previamente casados-, sociales -abandonan las relaciones interpersonales-, y laborales -muchos pierden el trabajo por falta de rendimiento, absentismo para jugar o incluso robos en este medio-. Finalmente, cuando se ven en apuros económicos importantes, la mayoría recurre a las personas cercanas para aliviar esta situación causada por el juego.

La Unidad de Ludopatía del Hospital Ramón y Cajal se creó en el año 1981. Cabe recordar que sólo un año antes, en 1980, fue cuando se introdujo por primera vez como trastorno mental en el DSM-III. Fue mérito del Profesor Jerónimo Sáiz Ruiz, quien organizó la Unidad de Ludopatía y la dirige desde entonces, quien tuvo la perspicacia de identificar estos sujetos entre los que acudían al servicio de urgencias de Psiquiatría para consultar por problemas de ansiedad, intentos de suicidio etc., pero al indagar en el origen del problema había un problema de ludopatía. De esta manera, en un intento de ofrecer a estos pacientes un tratamiento específico nació la Unidad, que se constituyó como un programa monográfico de tratamiento. Posteriormente se desarrolló un programa de investigación clínica, neurobiológica, genética y farmacológica que se ha plasmado en la realización de seis Tesis Doctorales y ha obtenido el reconocimiento de la comunidad científica mediante la obtención de financiación externa a través de becas del Fondo de Investigación Sanitario y la publicación de los resultados de las investigaciones en revistas científicas de prestigio internacional.

Bases neurobiológicas

En la ludopatía se han establecido varios modelos teóricos para explicar la etiopatogenia del trastorno. Uno de ellos considera el juego patológico como un trastorno del control de los impulsos, teniendo en cuenta su ubicación nosológica y la relación que tiene con otros trastornos del mismo grupo. En relación con los trastornos de control de impulsos una de las hipótesis más firmes es la implicación de la serotonina, al haberse encontrado en numerosas investigaciones datos que apuntan a la posible existencia de una hipofunción serotoninérgica en este tipo de trastornos. Esta aproximación representa desde luego una forma simplista de contemplar el problema, porque el cerebro es un órgano muy complejo y no parece razonable que haya una sola causa que pueda explicar este tipo de trastornos.

Otro de los modelos teóricos involucra al nivel de arousal y la búsqueda de sensaciones como rasgo de personalidad en el desarrollo de la ludopatía, lo que se ha puesto en relación con la posible implicación de la adrenalina. Un tercer modelo que de alguna manera nos ha traído a estar aquí presentes en estas jornadas es el modelo de "adicción sin sustancia". Los distintos modelos tampoco son excluyentes entre sí, ya que en las adicciones también hay un trastorno del control de los impulsos asociado, por lo que la división por modelos teóricos también son constructos simplistas que sin embargo nos ayudan para poder organizar la información que tenemos y poder investigar. En nuestra opinión, el modelo de "adicción sin sustancia" es probablemente el que más nos ayuda a comprender la etiopatogenia del juego patológico. También se han barajado otros modelos, como los que consideran la ludopatía dentro del espectro del trastorno obsesivo-compulsivo, y la consideración del juego patológico en el espectro de los trastornos afectivos.

Siguiendo el modelo de la ludopatía como trastorno del control de los impulsos y sobre la hipótesis serotoninérgica, se han realizado distintas investigaciones para estudiar cómo está el sistema serotoninérgico, mediante pruebas de estimulación, determinación de los niveles de la serotonina y sus metabolitos en el líquido cefalorraquídeo, -el principal metabolito que es el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)-, estudiar la MAO plaquetaria -la MAO es una enzima encargada de la metabolización de la serotonina-, también los niveles de triptófano en plasma -el triptófano es el aminoácido precursor de la serotonina-.

En cuanto a pruebas de estimulación que se han realizado en el juego y que apoyan la hipótesis serotoninérgica, se han realizado con clomipramina intravenosa (i.v.), -clomipromina es un antidepresivo tricíclico, y mediante la administración i.v. se evitaría el primer paso hepático, por lo que tiene un efecto más serotoninérgico. Esta investigación fue la base de una Tesis Doctoral que realizó en nuestra unidad, la Dra. Moreno, y lo que ella encontró es que había una respuesta aplanada de prolactina, es decir que tras la administración de clomipromina i.v. que es un estimulante serotoninérgico, al contrario que los controles en los que se observa un pico de prolactina, los jugadores tienen una respuesta aplanada, lo que se interpreta como consecuencia de una hipofunción del sistema serotoninérgico. Otros autores americanos utilizan como estimulante serotoninérgico la metil-cloro-fenilpiperacina (m-CPP), observando en jugadores la presencia de una sensación como de euforia o de bienestar (high) y un aumento de prolactina. No se trata de resultados discordantes, ya que la clomipramina actuaría como estimulante a nivel presináptico y el m-CPP actuaría a nivel postsináptico. En este sentido la interpretación de los autores en ambos casos apunta hacia la existencia de una hipofunción serotoninérgica.

En cuanto a los niveles de 5-HIAA en líquido cefalorraquídeo, se han realizado varios estudios. En unos no se encuentran diferencias; en otro estudio con un número muy

limitado de pacientes, los autores encuentran una disminución del metabolito en líquido cefalorraquídeo.

Las investigaciones sobre la MAO plaquetaria han sido objeto también de Tesis Doctorales realizadas en nuestra unidad por el Dr. Jose Luis Carrasco y el Dr. Carlos Blanco. Ambos encontraron que la actividad de la MAO-B plaquetaria estaba disminuida en los jugadores patológicos, interpretándose los resultados en el sentido de la existencia de una hipofunción serotoninérgica.

El estudio de los niveles del triptófano plasmático fue objeto de otra Tesis Doctoral en nuestra Unidad, la de la Dra. Rita Prieto. En el triptófano total no se hallaron diferencias entre jugadores y controles. Sin embargo, en el triptófano libre, que es el que realmente pasa la barrera hematoencefálica, sí que se encontraron diferencias entre jugadores y controles, de manera que había una disminución del triptófano libre en los jugadores respecto de los controles, apoyando la hipótesis de la hipofunción serotoninérgica en la ludopatía.

En cuanto a la teoría del arousal y la búsqueda de sensaciones, que apoyaría la implicación de la noradrenalina en el juego patológico, algunos autores han intentado investigar como está el sistema noradrenérgico mediante la determinación de los niveles de noradrenalina o su metabolito o bien mediante pruebas de estimulación, en este caso con clonidina, y valorando la respuesta de la hormona de crecimiento. En resumen se ha encontrado un aumento del metabolito de la noradrenalina en líquido cefalorraquídeo y plasma, un aumento de la noradrenalina en orina y en líquido cefalorraquídeo y un aumento de la hormona de crecimiento en respuesta a la clonidina, apuntando hacia la existencia de una posible disfunción del sistema noradrenérgico.

Siguiendo el modelo de "adicción sin sustancia", que implicaría fundamentalmente al sistema dopaminérgico, algunos autores han estudiado como están los niveles de dopamina y sus metabolitos en plasma, orina y líquido cefalorraquídeo y no han encontrado diferencias. En cambio en otro de los estudios, se encontró una disminución de la dopamina y un aumento de sus metabolitos en líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, en relación con las adicciones y la vía dopaminérgica del refuerzo, la dopamina representa sólo uno de los componentes, ya que esta vía recibe aferencias de neuronas gabaérgicas y neuronas opioideérgicas, entre otras, ambas con un efecto inhibitor. En este sentido, se estudiaron los niveles de GABA en líquido cefalorraquídeo y no se encontraron diferencias en jugadores patológicos comparado con controles. En cuanto al sistema opioide, cabe señalar que un hallazgo casual en el transcurso de una investigación fue la observación clínica de que los ludópatas tenían mayor tolerancia al dolor, lo que les llevó a pensar que podían tener afectadas las endorfinas. En un estudio posterior no se encontraron diferencias en los niveles de beta-endorfinas en jugadores comparado con controles.

Sin embargo, el hecho de que no se haya encontrado ningún dato consistente en relación con la implicación de la dopamina, el GABA, o el sistema opioide, no quiere decir que no esté implicado el sistema dopaminérgico en la etiopatogenia de la ludopatía, ya que por ejemplo podría haber, a modo de hipótesis, alguna alteración funcional o estructural en los receptores dopaminérgicos que conllevaría una disfunción en el sistema.

Componente hereditario

Los datos que apuntan hacia un componente hereditario en el juego patológico proceden por un lado de estudios clínicos. La comorbilidad con otros trastornos relacionados es muy alta, y es conocido que cuando hay un componente genético importante en un trastorno, se

observa a menudo una agregación familiar no solamente del trastorno en sí, sino también de los trastornos relacionados. Otros datos proceden de estudios de epidemiología genética en el juego patológico.

En cuanto a la agregación familiar del trastorno, en diferentes estudios clínicos se estima que alrededor de un 20% de los familiares de primer grado de los jugadores patológicos tendrían también ese diagnóstico. Si comparamos este porcentaje con la prevalencia del trastorno en población general, que según hemos visto anteriormente los datos epidemiológicos sugieren que está entre el 0,5 y el 2 %, observamos que realmente el porcentaje es muy alto. Sin embargo, el hecho de que un familiar de primer grado tenga el trastorno también, no quiere decir que sea genético, porque entran en juego todos los factores ambientales que pueden tener un papel decisivo. De esta manera si una persona se cría en un ambiente donde es propicio el juego y ve jugar a sus progenitores, o hay un ambiente de juego en casa, sería un factor de riesgo para poder desarrollar la ludopatía.

En un estudio muy interesante de Gambino y colaboradores, los autores observaron que la probabilidad de ser jugador patológico cuando alguno de los padres lo eran, se multiplicaba por 3 en los sujetos del estudio. Si los abuelos también lo eran además de los padres, la posibilidad de que el sujeto fuera jugador se multiplicaba por 12.

Para poder esclarecer más el posible componente genético en un trastorno hay que recurrir a estudios epidemiológicos más complejos como los realizados sobre muestras de gemelos y de adoptados. En el juego patológico hay referencias de un estudio realizado sobre una muestra numerosa de gemelos, con 3359 pares de gemelos monocigóticos y dicigóticos, procedente del registro de los veteranos del Vietnam, por lo que está compuesta únicamente por varones. En este estudio se encontró que los factores familiares explicaban hasta el 62% del diagnóstico del juego patológico.

Otro estudio más modesto, pero que tiene la ventaja de que incluye varones y mujeres, es el realizado por Winters & Rich. Estudiaron 92 pares de sujetos monocigóticos y dicigóticos varones y 63 pares también de ambos tipos de gemelos pero mujeres. En este estudio se encontraron diferencias de género, de manera que en varones hallaron una heredabilidad en los juegos, pero sólo en aquéllos más activos, en los que implican una mayor participación del sujeto de forma activa (casinos y máquinas fundamentalmente) respecto a los juegos menos activos (cartas y bingo). En cambio en las mujeres no encontraron diferencias en ningún tipo de juego.

Genética molecular en la ludopatía

En primer lugar cabe señalar que en el juego patológico lo que se han realizado en este campo son estudios genéticos de asociación con marcadores polimórficos de ADN de genes candidatos. En este sentido cabe preguntarse cuáles son los genes candidatos que se pueden estudiar en la ludopatía. En realidad, a la vista de los conocimientos actuales cualquier gen de los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico, noradrenérgico y otros potencialmente involucrados en la etiopatogenia de la ludopatía puede ser un gen candidato. Un aspecto importante es poder elegir, dentro de los genes candidatos, polimorfismos funcionales que tengan algún sentido, es decir que el producto resultante de la síntesis de ese gen que estudiamos sea diferente estructural o funcionalmente según la dotación alélica del polimorfismo que se estudia, de manera que nos facilite la interpretación de los resultados.

En un estudio sobre el receptor dopaminérgico DRD2, un autor americano encontró una asociación del juego patológico con el alelo A-1 de un polimorfismo que inicialmente se pensaba que no era funcional, aunque investigaciones posteriores señalan lo contrario. En otras investigaciones, llevadas a cabo en nuestra Unidad, no se encontró asociación de la ludopatía con un polimorfismo del gen de la tirosina-hidroxilasa situado en el intron I y tampoco con otro polimorfismo del gen de la MAO-B situado en el intrón II. En el caso de la MAO-A sí se encontró asociación con un polimorfismo situado en el intron I, por lo que no sería funcional, si bien dicha asociación sólo se observó en el grupo de varones y no en mujeres.

A continuación se resumen los datos obtenidos en el estudio de polimorfismos funcionales en jugadores patológicos. Se trata de una investigación que llevamos a cabo en nuestra Unidad, con 68 jugadores patológicos que cumplían criterios DSM-IV y CIE-10 para el trastorno (47 varones y 21 mujeres), y 68 controles también con la misma composición en cuanto a género que procedían de la Unidad de Donantes de Sangre del Hospital Ramón y Cajal. Todos ellos eran no emparentados, caucasianos, procedentes del centro de España, y que firmaron el consentimiento informado. El análisis genético-molecular se realizó en la Unidad de Genética de la Universidad Autónoma de Madrid, a cargo del Profesor Fernández Piqueras. Los polimorfismos funcionales que se estudiaron estaban localizados en el receptor dopaminérgico DRD4, el gen responsable de la síntesis del transportador de serotonina y el gen responsable de la síntesis de la enzima monoamino-oxidasa A.

El estudio del gen responsable de la síntesis del receptor de dopamina DRD4 tiene mucho interés en las adicciones y en los trastornos relacionados con el control de los impulsos, ya que estos receptores podrían tener algún papel en la etiopatogenia de estos trastornos, teniendo en cuenta que este tipo de receptores están especialmente representados en regiones límbicas. Dentro de este gen se ha descrito un polimorfismo funcional que está situado en el exon-III, que consiste en una repetición en tándem de una unidad de 48 pares de bases, y que es responsable de la síntesis del tercer lazo citoplasmático del receptor. A mayor número de repeticiones, mayor longitud del lazo citoplasmático sintetizado. La importancia de este polimorfismo deriva de que los receptores en los que este lazo es más largo, fundamentalmente aquél que tiene 7 repeticiones, es hipofuncional, o sea que tiene un peor funcionamiento. En cambio, los que sólo tienen de 2 a 4 repeticiones, la afinidad por clozapina que tiene el receptor sintetizado es 3 ó 4 veces mayor. Al estudiar este polimorfismo en jugadores y controles se encontró una distribución de los alelos significativamente diferente entre el grupo de jugadores y de los controles. Al analizar las diferencias, encontramos que éstas procedían de la distribución diferente en el subgrupo de mujeres pero no en los varones. El hallazgo más significativo era que las mujeres tenían más representado el alelo de 7 repeticiones comparado con las mujeres del grupo control. En el genotipo de las mujeres, el alelo de 7 repeticiones estaba en casi el 50% de la muestra de jugadoras, y en cambio en sólo el 15% de las mujeres controles. En varones, en cambio, no se encontraron diferencias en la distribución.

Otro de los polimorfismos funcionales que se estudiaron se localizaba en el gen del transportador de serotonina, que está en el cromosoma 17. Este polimorfismo, situado en el promotor del gen, consiste en la inserción o delección de 44 pares de bases. Por tanto, en el genotipo puede haber uno o dos alelos cortos, que no tendrían la inserción de estos pares de bases, o bien uno o dos alelos largos, que tendrían esta inserción. La presencia de al menos un alelo corto en el genotipo confiere una menor capacidad de expresarse por un lado, y por otro el transportador resultado de la síntesis tiene una menor

capacidad para recaptar serotonina en un cultivo de fibroblastos; es decir, que hay menos número de transportador de serotonina sintetizado y además el que hay, funciona peor. Por esta razón, en las distintas investigaciones sobre este polimorfismo, se agrupan los sujetos en función de su genotipo, denominando grupo "S" a los que tienen en su genotipo al menos uno de los alelos cortos, que originaría la opción hipofuncionante, y grupo "L" a los que tienen ambos alelos largos. En la investigación en controles y jugadores, no se encontraron diferencias significativas en el grupo total. Sin embargo, al analizar por género, las correspondientes correcciones por comparaciones múltiples, se encontró que en varones la frecuencia del alelo corto era mayor comparado con el alelo largo, aunque no llegaba a alcanzar la significación estadística ($p=0,07$). En cambio en las mujeres no había diferencias. Al agrupar por grupos, que realmente era lo que nos estaba hablando de la funcionalidad, porque como hemos comentado el grupo "S" reúne a los que tienen una menor capacidad funcional, en este caso se encontró que los jugadores varones tenían con mayor frecuencia el grupo "S", o sea que funcionaba peor su transportador de serotonina, comparado con los controles, siendo las diferencias significativas. En las mujeres tampoco se encontraron diferencias al analizar por grupos.

Otro polimorfismo funcional del que disponemos de resultados está en el gen de la enzima monoamino-oxidasa A, localizado en la región promotora del gen, y consiste en la repetición en tándem de 30 pares de bases. Se han descrito varios alelos, si bien en más del 95% de la población se encuentran los alelos con 3 y 4 copias. El alelo con 3 copias, confiere una menor capacidad funcional al producto de la síntesis, tanto en que se transcribe menos (de 2 a 10 veces menos la posibilidad de transcripción) y además la enzima que se sintetiza tiene una menor actividad en el cultivo de fibroblastos, y en otro tipo de estudios para comprobar la funcionalidad como son los ensayos con luciferasa. Al analizar este polimorfismo en nuestro estudio, el alelo 3 (menos funcionante) estaba más representado en la distribución general en jugadores comparado con los controles, si bien las diferencias no llegaban a ser significativas ($p=0.09$). Al analizar por género encontramos diferencias significativas en los varones, de manera que el alelo 3 era más frecuente en el caso de los ludópatas comparado con los controles, y el nivel de significación estadística aumentaba al considerar solamente el subgrupo de jugadores más graves. El alelo 3 se observó menos representado en el grupo de varones controles (30%) comparado con los ludópatas varones (55%) y con el subgrupo de varones más graves (68%).

Reuniendo los resultados anteriores observamos que los varones ludópatas tenían con mayor frecuencia el genotipo menos funcional del polimorfismo del transportador de serotonina por un lado, y también tenían con más frecuencia respecto a las mujeres, un polimorfismo menos funcional de la monoaminoxidasa A. Por este motivo intentamos aplicar la metodología del estudio por haplotipos, para estudiar conjuntamente ambos resultados. Asignamos el haplotipo cero, a los sujetos que tenían los dos polimorfismos más favorables, o sea los que eran más funcionantes. En el caso del transportador de serotonina, eran aquéllos que tuvieran los dos alelos largos; en el caso de la monoaminoxidasa A, en los varones, como el gen está en el cromosoma "X", eran aquéllos que tuvieran solamente 4 copias, mientras que en las mujeres, que tienen una dotación doble de cromosoma "X" tenemos que considerar los más funcionantes aquéllas que tenían al menos uno de los alelos con 4 copias (4/4, o bien 4/3). El haplotipo 1 reunía los casos en los que uno de los polimorfismos estudiados, ya sea el de la monoamino-oxidasa A o el del transportador de la serotonina, fuera menos funcional. En el haplotipo 2 se recogían los

casos en los que en ambos polimorfismos, la dotación genética fuera la menos funcionante. De esta manera el haplotipo 2 representaba la opción menos favorable. En el análisis por haplotipos encontramos que el haplotipo 2 estaba significativamente más representado en jugadores (42%) respecto a controles (20%), con una $p < 0.05$. Al analizar por género, en mujeres no encontramos diferencias, mientras que en los varones las diferencias se incrementaban, aumentando el nivel de significación ($p < 0.01$).

En resumen y a modo de conclusión cabe señalar que en nuestra opinión el juego patológico es una entidad diagnóstica que es real en la clínica, es válida para la investigación, tanto biológica como genética, que hay datos que sugieren, -con independencia de otros factores como los ambientales que son indudablemente muy importantes-, que hay una predisposición por lo menos en algunos individuos a desarrollar este trastorno. Algunos hallazgos sugieren que hay una hipofunción serotoninérgica y también una disfunción dopaminérgica en este trastorno. Por otra parte los datos actuales sobre estudios genéticos sugieren que hay factores genéticos que pueden conferir una susceptibilidad individual para el desarrollo de este trastorno, y que esa base genética está basada, al menos en parte, o en algunos individuos, en alelos específicos hipofuncionantes de los genes responsables de la síntesis de la enzima MAO-A, del receptor de dopamina DRD4, y del transportador de la serotonina, si bien estos hallazgos deben ser replicados en muestras más amplias, en otras poblaciones y en estudios preferiblemente de colaboración internacional. En cualquier caso es preciso recordar que los ludópatas no constituyen un grupo homogéneo, y aunque tienen características comunes, es posible que en algunos casos el factor genético pueda ser importante y en otros no. Se trataría entonces de un modelo de herencia poligénica y multifactorial, donde el papel de la interacción genes-ambiente tiene un valor primordial. En este sentido, y como ocurre con las adicciones en general, aunque un sujeto puede estar genéticamente muy predispuesto, si no se cruza nunca con una máquina tragaperras en su vida (o con algún otro juego con alta capacidad adictiva), no desarrollará el trastorno.

Por último cabe también mencionar la importancia que pueden tener las diferencias encontradas en la investigación neurobiológica y en la genética en función del género. De esta manera parece que se podría contribuir de diferente forma según el género en el desarrollo de un mismo fenotipo o un fenotipo que parece semejante cuando vemos en la clínica a los pacientes. Estas diferencias son cobran especial relevancia porque pueden tener una influencia en el abordaje terapéutico del trastorno.



ASPECTOS GENÉTICOS EN EL JUEGO PATOLÓGICO

Ángela Ibáñez
Servicio de Psiquiatría. Unidad de Ludopatía
Hospital Ramón y Cajal
Universidad de Alcalá. Madrid

"Genética de las Adicciones". SET. Madrid, 10 de mayo de 2006

Aspectos genéticos en el Juego Patológico

- Introducción**
- Bases neurobiológicas**
- Componente hereditario**
- La genética molecular en la ludopatía**
- Conclusiones**

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN INVESTIGACIÓN GENÉTICA

- **La ludopatía como entidad diagnóstica válida**
- **Bases Neurobiológicas**
- **Evidencias de componente genético en JP**

INTRODUCCIÓN

La ludopatía como entidad diagnóstica

- Reconocido como trastorno mental en DSM-III (1980)
- “Presencia de frecuentes y reiterados episodios de juegos de apuestas, los cuales dominan la vida del enfermo en perjuicio de los valores y obligaciones sociales, laborales, materiales y familiares del mismo” (CIE-10, 1992)
- Afecta al 0,5 - 2,5% de la población adulta

INTRODUCCIÓN

La ludopatía como entidad diagnóstica

Características clínicas (DSM-IV, 1994; DSM-IV-TR, 2000)

- Preocupación por el juego
- Progresión (tolerancia)
- Fracaso en el control
- Síntomas de abstinencia
- El juego como escape
- Intento de recuperar
- Engaños para ocultar
- Actos ilegales
- Complicaciones diversas (familiares, laborales,...)
- Apuros económicos

INTRODUCCIÓN

Unidad de Ludopatía H. Ramón y Cajal

- Inicio año 1981
- Programa monográfico de tratamiento
- Referencia de ámbito nacional
- Más de mil pacientes atendidos
- Actividad investigadora
 - ✓ 6 Tesis Doctorales realizadas
 - ✓ Beca FIS

Bases Neurobiológicas

BASES NEUROBIOLÓGICAS

Modelos teóricos

JP como un tr. en control de impulsos → 5-HT

Arousal y “búsqueda de sensaciones” → NE

Modelo de adicción sin sustancia → DA

BASES NEUROBIOLÓGICAS

JP COMO UN TR. EN CONTROL DE IMPULSOS → 5-HT

Hipofunción 5-HT:

- Pruebas de estimulación
- 5-HIAA en LCR
- MAO plaquetaria
- Triptófano en plasma

BASES NEUROBIOLÓGICAS

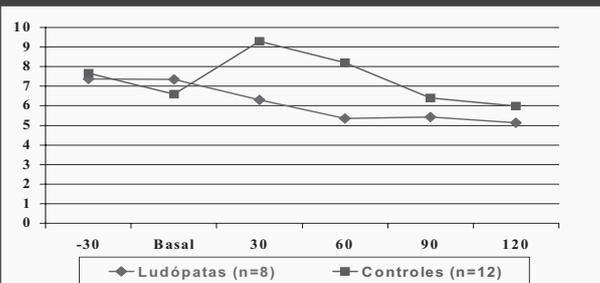
JP COMO UN TR. EN CONTROL DE IMPULSOS → 5-HT

Pruebas de estimulación

Clomipramina: Respuesta aplanada prolactina
(Moreno et al., 1991)

m-CPP: “high” y aumento de prolactina
(DeCaría et al., 1996)

ESTIMULACIÓN CON AGONISTAS SEROTONÉRGICOS



Prolactinemia tras 12,5 mg. IV de clomipramina (p<0,02)

Moreno et al., Hum Psychopharmacol 1991; 6: S9-12

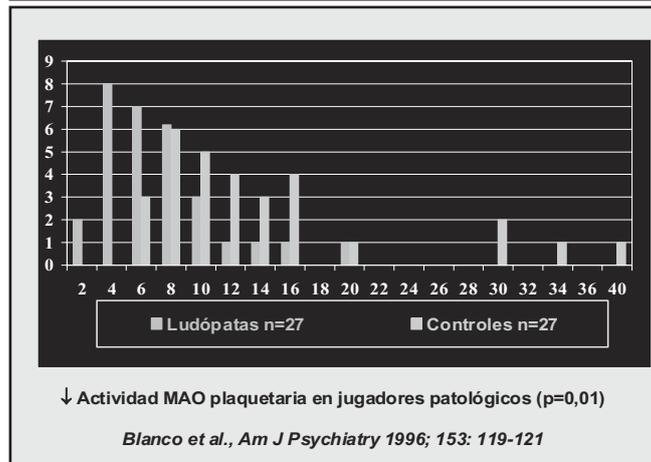
BASES NEUROBIOLÓGICAS

JP COMO UN TR. EN CONTROL DE IMPULSOS → 5-HT

5-HIAA en LCR
 ✓ No diferencias (Roy et al., 1988; Bergh et al., 1997)

✓ ↓ 5-HIAA en LCR 10 JP vs. 12 controles (Nordin & Eklundh, 1999)

MAO plaquetaria
 ↓ actividad MAO-B (Carrasco et al., 1994; Blanco et al., 1996)



BASES NEUROBIOLÓGICAS

JP COMO UN TR. EN CONTROL DE IMPULSOS → 5-HT

Triptófano en plasma
 ↓ TRF libre (Prieto et al., 2000)

	TOTAL TRIPTOFANO	RATIO	TRIPTOFANO LIBRE	RATIO
JUGADORES				
(Media ± Des. Est.)	44,94 ± 9,75	0,082 ± 0,017	5,94 ± 2,12	0,011 ± 0,004
CONTROLES				
(Media ± Des. Est.)	47,68 ± 11,55	0,080 ± 0,023	6,99 ± 2,51	0,013 ± 0,005
VALOR "p"	0,256	0,724	0,039	0,034

BASES NEUROBIOLÓGICAS

AROUSAL Y "BÚSQUEDA DE SENSACIONES" → NE

- Aumento MHPG en LCR y plasma (Roy et al, 1988; Bergh et al., 1997)
- Aumento Noradrenalina en orina y LCR (Roy et al, 1988; Bergh et al., 1997)
- Aumento de GH en respuesta a clonidina (DeCaria et al., 1997)

BASES NEUROBIOLÓGICAS

MODELO DE ADICCIÓN SIN SUSTANCIA → DA

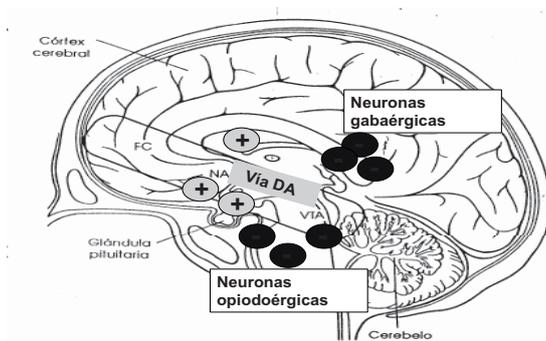
➤ No diferencias de Dopamina y metabolitos en plasma, orina y LCR

(Roy et al., 1988)

➤ Disminución Dopamina y ↑ metabolitos en LCR

(Bergh et al., 1997)

VIA DOPAMINÉRGICA DEL REFUERZO



BASES NEUROBIOLÓGICAS

Vía dopaminérgica del refuerzo

- ✓ Dopamina
Niveles neurotransmisor y metabolitos discordantes
- ✓ GABA
No diferencias en LCR (Roy et al., 1989)
- ✓ Sistema opioide
Mayor tolerancia al dolor (Pratt et al., 1982)
No diferencias beta-endorfinas (Blaszczynski et al., 1986)



IMPLICACIÓN RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Componente hereditario

COMPONENTE HEREDITARIO

- **Comorbilidad con otros trastornos relacionados**
- **Agregación familiar**
- **Estudios de epidemiología genética**

COMPONENTE HEREDITARIO

Agregación familiar del trastorno

- **20% en familiares de primer grado (vs. 0.5-2% en población general)**
(Lesieur, 1988; Ibáñez et al., 1997)
- **Aumenta probabilidad de ser JP si padres son JP (x3) y más si abuelos también lo son (x12)**
(Gambino et al., 1993)

COMPONENTE HEREDITARIO

Estudios en gemelos

- **3359 pares de MZ y DZ varones**
Factores familiares explican 62% de diagnóstico JP
(Eisen et al., 1998)
- **92 pares MZ y DZ varones y 63 pares MZ y DZ mujeres**
En varones, heredabilidad en juegos más activos (casinos, máquinas) vs. menos activos (cartas, bingo)
No diferencias en mujeres
(Winters & Rich, 1999)

La genética molecular en la ludopatía

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Investigación genética en psiquiatría

- Estudios de ligamiento (*linkage*)
- Estudios de asociación
- Otros:
 - Estudios de expresión génica
 - ✓ Estudio del mRNA:
 - extraído del cerebro
 - técnicas histoquímicas de hibridación *in situ*
 - en cerebros *post-mortem*
 - estudios en animales
 - ✓ Estudios con luciferasa
 - Estudios de farmacogenética

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Investigación genética en psiquiatría

Estudios de ligamiento (*linkage*)

- Basados en la independencia de la segregación de los genes durante la meiosis
- Limitaciones:
 - ✓ originalmente concebidos para el estudio de caracteres causados por un solo gen de transmisión mendeliana conocida
 - ✓ pedigrí lo más amplio posible con varios miembros afectados

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Investigación genética en psiquiatría

Estudios de asociación

- Dos poblaciones:
 - individuos con el trastorno en estudio
 - individuo sin el trastorno (grupo control)
- Sujetos no emparentados
- Se comparan las frecuencias y distribuciones alélicas de marcadores genéticos polimórficos
- Ventaja: permiten detectar genes que contribuyen a la enfermedad con un efecto menor o de susceptibilidad

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

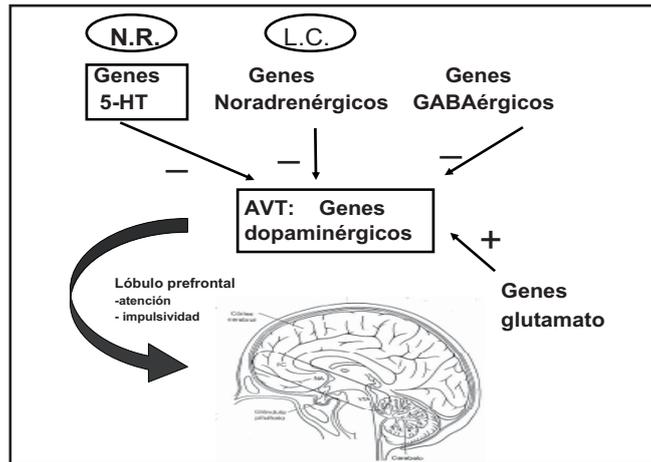
ESTUDIO GENÉTICO MOLECULAR EN JP

- Estudio genético de asociación
- Marcadores polimórficos de ADN en genes candidatos

?

Sistema serotoninérgico
Sistema noradrenérgico
Sistema dopaminérgico

- Elección de polimorfismos funcionales



GENES CANDIDATOS SISTEMA SEROTONÉRGICO

Gen	Localización
Triptófano hidroxilasa	11p
MAO-A	Xp11.4-p11.3
Transportador de 5-HT	17q12
Receptores: 5-HT-1A 5q11.2	
5-HT-1B	6q13
5-HT-1D	1p34.4-P36.3
5-HT-1E	6q14-q15
5-HT-1F	3p13-p14.1
5-HT-2A	13q14-q21
5-HT-2B	2q36.3-q37.1
5-HT-2C	Xq24
5-HT-3	11q23.1-q23.2
5-HT-4	5q31-33
5-HT-5A	7q36
5-HT-5B	2q11-q13
5-HT-6	1p35-p36
5-HT-7	10q23.3-24.3

GENES CANDIDATOS SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Gen	Localización
Tirosina hidroxilasa	11p15.5
Dopamina β hidroxilasa	9q34.3
Receptores: DRD1 5q.35.1	
DRD2	11q22-q23
DRD3	3q13.3
DRD4	11p15.5
DRD5	4p16.1
MAO-A	Xp11.4-p11.3
MAO-B	Xp11.4-p11.3
COMT	22q11.21
Transportador dopamina	5p15.3

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Resumen de hallazgos

DRD2 Taq	Alelo A1	(Comings et al., 1995)
DRD4 exon III	Alelo 7 hipofuncionante en mujeres	(Pérez de Castro et al., 1997)
5-HTTLPR (promotor)	Alelo corto hipofuncionante en varones	(Pérez de Castro et al., 1999)
Tirosina hidroxilasa intron I	No asociación	(Ibáñez et al., 1999)
MAO-A intron I	Alelo C4 en varones	(Ibáñez et al., 2000)
MAO-A promotor	Alelo hipofuncionante en varones	
MAO-B intron II	No asociación	(Ibáñez et al., 2000)

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Estudio de asociación**68 JP (DSM-IV y CIE-10) (47 varones y 21 mujeres)**

Unidad de Ludopatía Hospital Ramón y Cajal

68 controles (47 varones y 21 mujeres)

Unidad de Donantes de Sangre (H. Ramón y Cajal)

Inclusión mediante entrevista psiquiátrica

**Todos eran: no emparentados,
caucasianos
procedentes del centro de España
consentimiento**

Análisis genético molecular:

Unidad de Genética. Facultad de Ciencias. U. Autónoma (Madrid)

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

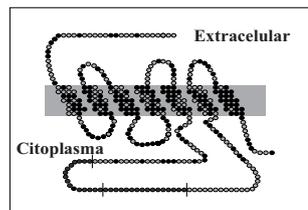
Polimorfismos funcionales en genes candidatos

- Gen del receptor de dopamina D4
- Gen del transportador de la serotonina
- Gen de la enzima monoamino-oxidasa A

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Gen del receptor de dopamina D4 (DRD4)

- Más representado en regiones límbicas que otros receptores
- Gen localizado en brazo corto de cromosoma 11



- Polimorfismo funcional en exón III
- VNTR (unidad de 48 bp)
- Alelos con 2-4 repeticiones afinidad 3-4 veces mayor por clozapina que alelos con 7 repeticiones

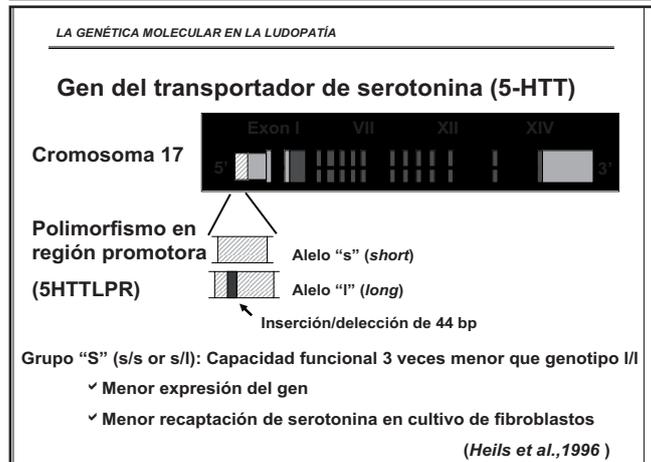
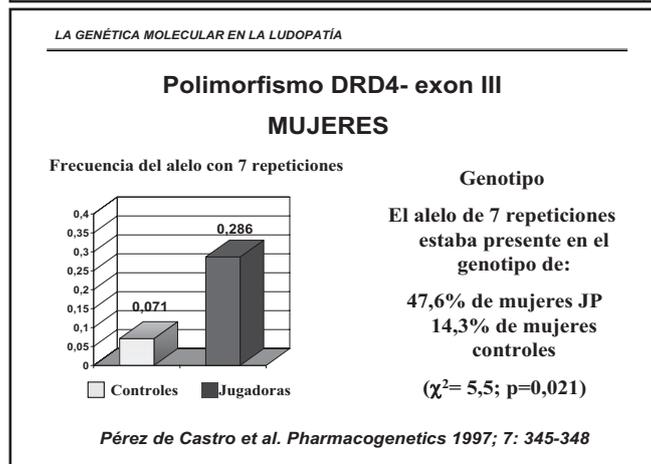
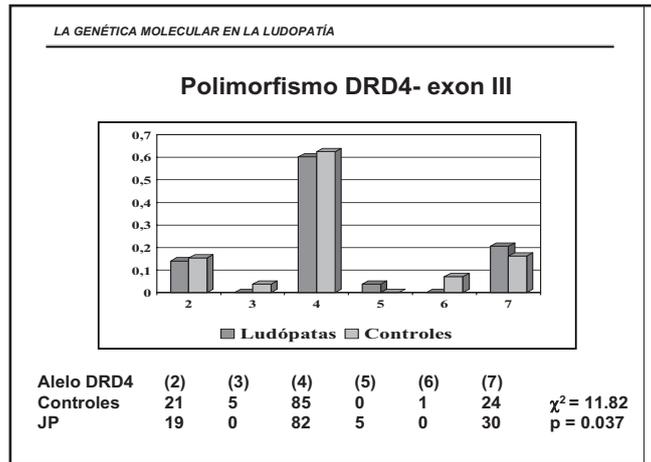
Pharmacogenetics (1997) 7: 345-348

Original article

Genetic association study between pathological gambling and a functional DNA polymorphism at the D4 receptor geneI. Pérez de Castro¹, A. Ibáñez², P. Torres¹, J. Sáiz-Ruiz² and J. Fernández-Piqueras^{1*}¹Laboratorio de Genética Molecular Humana, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain²Servicio de Psiquiatría, Hospital Ramón y Cajal de Madrid, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Received 24 February 1997 and accepted 25 April 1997

A Spanish sample consisting of 68 Caucasian pathological gambling patients (47 males and 21 females) and 68 unaffected controls were screened by the molecular analysis of a functional DNA polymorphism in the locus for the D4 dopamine receptor gene. Our results are consistent with the existence of a significant association between genetic variants at a DRD4 gene polymorphism and pathological gambling ($\chi^2 = 11.82$; $P = 0.037$). This association seems to be sex-influenced, since there was no significant association when only males were considered ($\chi^2 = 9.45$; $P = 0.09$), but there was a more significant association if we only considered female subjects ($\chi^2 = 8.73$; $P = 0.033$). Individuals with the longest allele (D7) were the most frequent in affected females ($\chi^2 = 4.50$; $P = 0.033$). This work provides a new evidence of the implication of the dopaminergic reward pathways, now through the involvement of DRD4, in the aetiology of this impulsive disorder.



Pharmacogenetics 1999, 9:397-400

Short communication

Genetic contribution to pathological gambling: possible association between a functional DNA polymorphism at the serotonin transporter gene (5-HTT) and affected men

Ignacio Pérez de Castro^a, Angela Ibáñez^b, Jerónimo Saiz-Ruiz^b and José Fernández-Piqueras^a

^aUnidad de Genética, Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid and ^bServicio de Psiquiatría, Hospital Ramón y Cajal de Madrid y Universidad de Alcalá, Madrid, Spain

Received 15 December 1998; accepted 8 January 1999

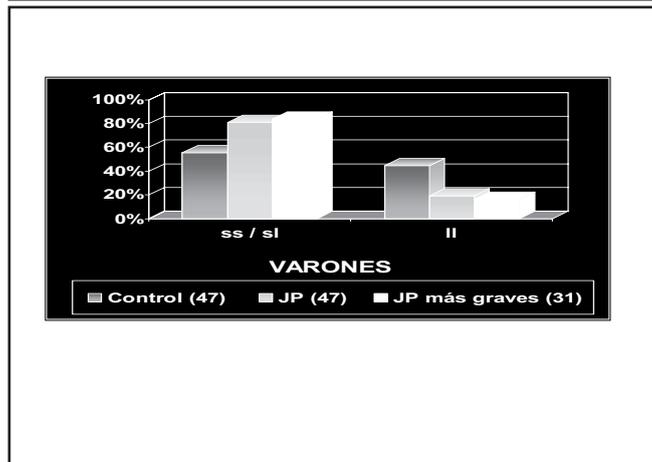
Keywords: serotonin transporter gene, 5-HTT, functional polymorphism, pathological gambling, association studies

Pathological gambling is an impulsive disorder characterized by frequent and reiterated episodes of... Recently, a functional polymorphism (5-HTTLPR) has been reported in the promoter region of this gene

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Polimorfismo 5-HTTLPR

	Alelos (%)			Grupos (%)		
	s	l	P	S	L	p
TOTAL						
Controles n=68)	40.4	59.6		60.3%	39.7%	
JP (n=68)	45.6	54.4	0.3	73.5%	26.5%	0.1
POR SEXO						
Varones						
Controles (47)	37.2	62.8		55.3%	44.7%	
JP (47)	50.0	50.0	0.07	80.8%	19.2%	0.008
Mujeres						
Controles (21)	47.6	52.4		71.4%	28.6%	
JP (21)	35.7	64.3	0.2	57.1%	42.9%	0.3



LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Gen de la enzima monoamino-oxidasa A

- Polimorfismo funcional VNTR (30 bp) en región promotora
- Alelos con 3, 3.5, 4 y 5 copias
- Alelos 3 y 4 en >97%
- Alelo con 3 copias:
 - Menor transcripción (2-10)
 - Menor actividad MAO-A en cultivo de fibroblastos
 - Menos activo en ensayos con luciferasa

Cromosoma X

MAO-A 11.23 - 11.4

MAO-B

Molecular Psychiatry (2000) 5, 105-109
© 2000 Nature Publishing Ltd. A right reserved 1359-4144/00 \$15.00
www.nature.com/imp

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Pathological gambling and DNA polymorphic markers at MAO-A and MAO-B genes

A Ibañez¹, I Pérez de Castro², J Fernández-Piqueras², C Blanco³ and J Saiz-Ruiz¹

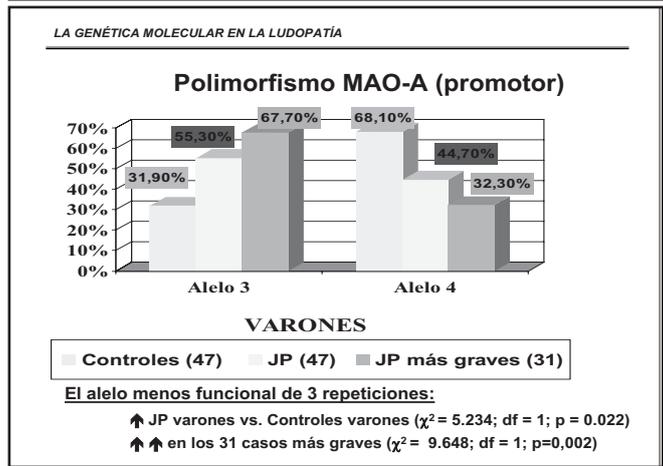
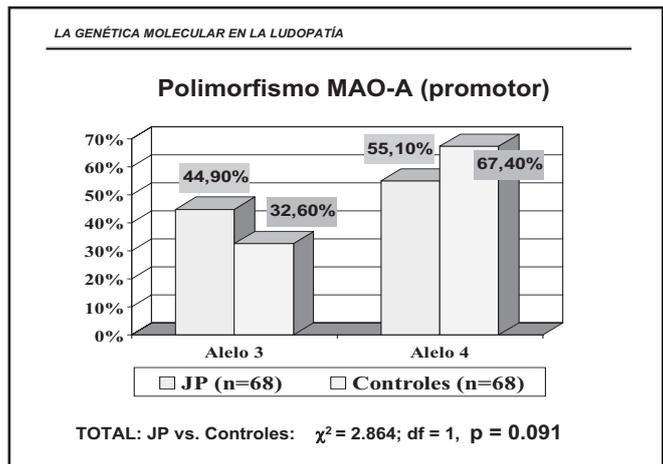
¹Department of Psychiatry, Ramón y Cajal Hospital, Alcala University, Madrid, Spain; ²Genetics Unit, Department of Biology, Autónoma University, Madrid, Spain; ³Department of Psychiatry, Columbia University, New York State Psychiatric Institute, New York, USA

Keywords: pathological gambling; genetics; monoamine oxidase genes; MAOA gene; MAOB gene; impulse control disorders

This study was conducted to detect a possible association of MAOA and/or MAOB genes with pathological gambling (PG). DNA polymorphisms in MAOA and MAOB genes were screened by molecular analysis in 68 individuals (47 males and 21 females) meeting ICD-10 and DSM-IV criteria for pathological gambling and 68 healthy comparison controls matched for age and sex. There were no significant differences between pathological gamblers and healthy volunteers in overall allele distribution at the MAOA gene polymorphism. However, there was a significant association between allele distribution and the subgroup of severe male gamblers ($n = 31$) compared to the males in the group of healthy volunteers ($\chi^2 = 5246$; $df = 1$; $P < 0.05$ [Bonferroni corrected]). No association was found between the MAOB polymorphic marker and PG. Allele variants at the MAOA, but not the MAOB gene may be a genetic liability factor in PG, at least in severe male gamblers. *Molecular Psychiatry* (2000) 5, 105-109

has been reported between pathological gambling and DNA polymorphism of the D2 and D4 receptor genes.^{2,3} Monoamine oxidases A (MAOA) and B (MAOB) play a critical role in the disposition of several neurotransmitters which could be involved in the pathogenesis of pathological gambling. Increased platelet MAOB activity has been reported in pathological gamblers,^{4,5} and other impulse control disorders.^{6,7} Although MAOA activity has never been studied in pathological gambling, previous research suggests that abnormal MAOA activity may play a role in the pathophysiology of disorders with impaired impulse control.⁸ Decreased MAOA activity was associated with impulsive behaviors in several affected males from a large Dutch family with a mutation in that locus.⁹ Differences in MAOA activity have been associated with specific alleles of the structural gene.¹⁰ Polymorphic variants of MAOA and/or MAOB genes have been reported to be associated with alcoholism, substance abuse and other impulse control disorders.^{11,12} In light of these findings we sought to investigate the possibility of an association between genetic variants at

Molecular Psychiatry 2000; 5: 105-109



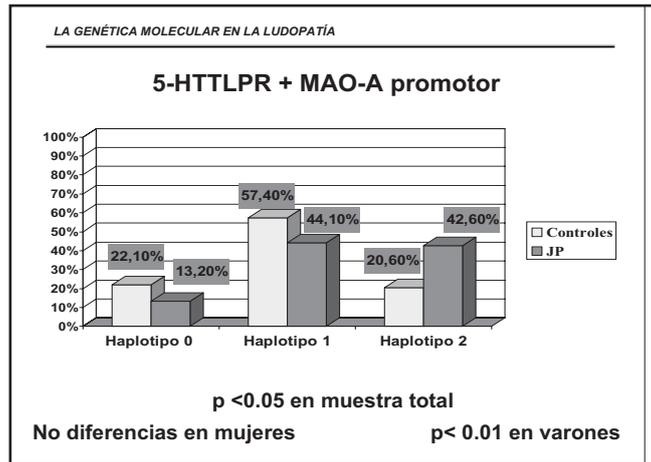
LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

VARONES

- Genotipo menos funcional del polimorfismo HTTLPR (s/s o s/l)
- Genotipo menos funcional del polimorfismo en el promotor de MAOA (homocigoto en mujeres y hemicigotos en varones para el alelo de 3 repeticiones)

LA GENÉTICA MOLECULAR EN LA LUDOPATÍA

Haplotipo 0		Haplotipo 1		Haplotipo 2	
5-HTTLPR	MAOA-uVNTR	5-HTTLPR	MAOA-uVNTR	5-HTTLPR	MAOA-uVNTR
VARONES					
l/l	4-copias	s/s	4-copias	s/s	3-copias
		s/l	4-copias	s/l	3-copias
		l/l	3-copias		
MUJERES					
l/l	4/4; 4/3	s/s	4/4; 4/3	s/s	3/3
		s/l	4/4; 4/3	s/l	3/3
		l/l	3/3		



Conclusiones

CONCLUSIONES

- El Juego Patológico es una entidad diagnóstica real en la clínica y válida en investigación biológica y genética
- Predisposición biológica
- Hallazgos biológicos sugieren papel primordial de hipofunción 5-HT y disfunción dopaminérgica
- Hallazgos genéticos sugieren que factores genéticos podrían conferir susceptibilidad para el desarrollo del trastorno.

CONCLUSIONES

- Esta base genética está constituida, al menos en parte, por alelos específicos hipofuncionantes de los genes reguladores de la síntesis de la enzima MAO-A, del receptor dopaminérgico D4 y del transportador de la serotonina.
- Resultados en de genética molecular apuntan a:
 - ✓ heterogeneidad
 - ✓ posible herencia poligénica multifactorial: papel de la interacción genes-ambiente
 - ✓ diferencias en función del sexo

PARTE I. INTRODUCCIÓN A LA GENÉTICA

Modera:

D^a Carmen Puerta
CAD 4 San Blas.
Instituto de Adicciones de la Ciudad de Madrid.

Conceptos de genética para clínicos que trabajan en el área de los trastornos mentales.

Francisco Martínez Castellano
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal.
Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Investigación genética en enfermedades complejas.

Javier Costas
Centro Nacional de Genotipado (CeGen) Grupo de Medicina Xenómica.
Universidade de Santiago de Compostela.

Conceptos básicos de la investigación en genética de los trastornos mentales

Francisco Martínez
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal.
Hospital Universitario La Fe. Valencia

Quisiera empezar agradeciendo a los organizadores de esta jornada su amable invitación para daros esta charla sobre los conceptos básicos de investigación en Genética de los trastornos mentales. Avisando ante todo que mi campo de investigación, y de trabajo asistencial, se centra más bien en las enfermedades monogénicas, en concreto en investigación sobre el retraso mental de causa genética.

De entre las muchas definiciones posibles de GEN, concepto que todavía se discute, me ha gustado esta porque es sencilla y suscita bastante consenso, que básicamente viene a decir que, **"el gen es una unidad hereditaria, que controla cada carácter de los seres vivos"**.

Los genes pueden tener distintas variantes, cada variante se le llama alelo, e independientemente de eso, está en concepto de locus. El locus no es más que el lugar que ocupa un gen o una secuencia arbitraria en el genoma, sea en un mapa físico, sea en un mapa genético. También se puede aplicar a un marcador polimórfico, de esos que tienen nombres que parecen matrículas.

Se dice que un individuo es **heterocigoto** cuando presenta dos variables distintas para un mismo gen o un mismo locus. **Homocigoto** si ambas copias de la secuencia son idénticas. Un alelo es **dominante** cuando se manifiesta en el fenotipo, y si no se manifiesta se considera **recesivo**. Por otra parte, cuando el heterocigoto se diferencia tanto de un homocigoto como del otro, se habla de **codominancia**; el ejemplo típico lo tenemos en los grupos sanguíneos A/B.

En la figura [diapositiva 3] tenemos algunos patrones básicos de herencia sencillos. En el primer ejemplo (AD), vemos una transmisión vertical de caracteres con un riesgo de transmisión del 50%, y que además afecta por igual a hombres y mujeres. Sería una transmisión **autosómico-dominante**. La segunda (AR) es una forma **autosómico-recesiva** (entre otras cosas, en realidad), lo habitual es encontrar que las enfermedades recesivas afectan en una familia tan sólo afectan a los miembros de una misma fratría, es decir, sólo se repite entre grupos de hermanos. Muchas veces, aunque no necesariamente, puede haber consanguinidad y también afecta por igual a varones y mujeres. Un tercer patrón, es la aparición de un rasgo exclusivamente en varones que están relacionados

entre sí por vía materna, es una herencia **ligada al cromosoma X recesiva**. En este caso, el punto en el interior del símbolo señala las portadoras en heterocigosis.

Otro patrón similar, con una pequeña gran diferencia, es la herencia **dominante ligada al X**. Afecta tanto a varones como mujeres, pero los varones lo transmiten exclusivamente a sus hijas, a todas sus hijas. Lo que diferencia este tipo de herencia de la autosómica dominante es la transmisión paterna: sólo a las hijas en la herencia ligada al X (ya que a los hijos varones les transmite el cromosoma "Y") o bien a hijos e hijas con una probabilidad del 50% en la autosómico-dominante. Cuando vemos una transmisión de varón a varón, automáticamente se excluye una herencia ligada al cromosoma X.

Por desgracia, hay una multitud de factores que, digamos, modifican estos patrones relativamente sencillos, y que pueden inducir a engaño. En primer lugar está la **expresividad variable**, dado que muchos rasgos hereditarios tienen distintos grados de expresión, más leve o más grave, y que pueden conllevar distintas manifestaciones de un mismo defecto básico. Por otra parte, está la **penetrancia incompleta**, que ocurre cuando un individuo no tiene el fenotipo esperado por su genotipo. También puede afectar al patrón de herencia el grado de inactivación del cromosoma "X", la heterogeneidad genética, la existencia de fenocopias –esto es, la aparición por un factor ambiental de un fenotipo habitualmente debido a una causa genética. Otros factores que pueden ocurrir son la interacción génica o la impronta génica. La impronta genética es ni más ni menos que el hecho de manifestarse un rasgo o no depende de si lo heredamos del padre o de la madre. Es decir, la misma secuencia de ADN puede llevar una marca que diferencie si el origen es paterno o materno, y esa marca puede hacer que un gen se exprese o no se exprese. Un ejemplo lo tenemos en algunas mutaciones causantes del síndrome de Beckwith-Wiedeman, que tan sólo causan el síndrome cuando se heredan en el cromosoma materno, pero no cuando se heredan en el cromosoma paterno.

Otros factores pueden ser una herencia dominante ligada al X con letalidad en varones, por la que una mujer que presenta un rasgo o una enfermedad aparentemente sólo lo transmite a la mitad de sus hijas (ya que los varones con una mutación así no finalizan el desarrollo embrionario). También se debe tener en cuenta que cuando el rasgo es frecuente, o hay consanguinidad, las mutaciones recesivas ligadas al X también pueden manifestarse en mujeres. Y por último, en un caso esporádico de una enfermedad hereditaria, sin antecedentes en la familia, cabría pensar en cualquier tipo de herencia, pero en muchas ocasiones se trata de una mutación con herencia dominante que ha surgido de novo, por lo que será el primer caso en la familia portador de ese defecto.

Existe toda una serie de rasgos que dependen básicamente de un solo gen. ¿Cómo se llega a identificar esos genes? ¿Cómo llegamos a averiguar cual es el gen responsable de esta enfermedad o de este carácter? Básicamente hay distintas estrategias, y de hecho en muchas ocasiones lo que se hace es ir combinando distintas aproximaciones en función de cada caso particular. En primer lugar está la **clonación posicional**, que se basa en la información disponible de dónde se localiza el gen. Para ello, ha resultado bastante fructífera la caracterización de los puntos de rupturas cromosómicas en pacientes con la enfermedad en cuestión que muestran en su cariotipo alguna translocación cromosómica que presumiblemente han alterado el gen que causa la enfermedad. De este tipo son también los estudios de ligamento genético. Por otra parte está la estrategia del **candidato funcional**, es decir, no se tiene ni idea de dónde se localiza el gen pero se puede suponer

qué función realiza, por la que se deduce el tipo de gen que podría estar implicado en la enfermedad o rasgo que se esté estudiando. Aquí se trata de rastrear mutaciones que se correlacionen con el fenotipo de interés. Algo muy similar sería la búsqueda o el rastreo de mutaciones en genes implicados en enfermedades relacionadas, que en no pocas ocasiones pueden dar lugar a distintas variantes en el fenotipo.

En la diapositiva 8, hay un esquema de una clonación posicional por **translocación cromosómica**. En concreto se trata de un esquema de cómo se identificó el gen del Síndrome de Sotos, básicamente una forma de retraso psíquico. En un paciente con esta enfermedad se vio que tenía una translocación entre el cromosoma 5 y el 8. Empleando diferentes clones, correspondientes a grandes fragmentos de ADN de esa zona, e hibridándolos con los cromosomas del paciente, se identificó cuales de estos daban señal de hibridación en los dos cromosomas derivados (translocados), es decir que abarcaban el punto de rotura. Empleando posteriormente fragmentos de estos clones como sondas se pudo llegar a definir el punto de rotura. Una vez conocida la secuencia alrededor del punto de rotura, se puede identificar el gen que se ha interrumpido por la translocación.

Por otro lado hay otro tipo de estrategias un poco más complicadas de explicar, que son los estudios de ligamiento genético, que básicamente consiste en el empleo de marcadores genéticos. Un marcador genético no es más que un polimorfismo, una secuencia que puede contener distintas variantes. Un tipo de polimorfismos muy empleados como marcadores genéticos son las secuencias de tipo microsatélite: son repeticiones en tándem de un elemento pequeño (típicamente de dos, tres, cuatro bases) que se repite un número variable de veces. En consecuencia, la misma secuencia, es decir el mismo "locus", puede tener por ejemplo 16 repeticiones en un cromosoma, mientras que en el cromosoma homólogo solamente 10 repeticiones, por lo que la misma secuencia posee distinto tamaño en cada cromosoma. Todo lo que nos permita distinguir entre los dos cromosomas homólogos nos va a permitir hacer, entre otras cosas, estudios de ligamiento. Si podemos distinguir los dos cromosomas homólogos, se puede averiguar cual se ha heredado del padre y cual de la madre. A su vez, si comparte ese locus con su hermano afectado o no, etc. Básicamente, los estudios de ligamiento tratan de buscar qué marcador o marcadores (de todos los disponibles) es el que se hereda asociado a la enfermedad.

Un concepto relacionado, pero radicalmente distinto, es el de **asociación alélica**. El ligamiento se estudia en el seno de una familia. Lo que estás midiendo es la tendencia de dos genes, o un gen y un marcador (dos loci, en definitiva) a heredarse juntos porque están muy próximos en el cromosoma, es decir, la asociación entre genes, o entre loci. Por otro lado, la asociación alélica busca si hay o no asociación entre alelos específicos en esos loci. Esta asociación se deberá a motivos históricos, y para determinarlo hay que hacer estudios poblacionales, no en el seno de una familia. Esta asociación alélica, que también se puede llamar desequilibrio de ligamiento, puede tener también otras causas, como la estratificación de la población, es decir la existencia de distintas subpoblaciones, cada una con su grupo específico de alelos, o bien por interacción entre genes (epistasia) que puede ocasionar una patología, por lo que en la población de pacientes con dicha patología se encuentra una determinada asociación alélica.

Para realizar los estudios de ligamiento se necesita la colaboración de familias enteras, cuanto más extensas y más informativas mejor, siendo preferible el estudio de pocas familias extensas a muchas familias pequeñas, que resultan menos informativas.

Se presenta el caso de una familia real en la que se transmite un retraso mental inespecífico (no lleva asociado ningún otro rasgo clínico). Es evidente, por el hecho de que todos los afectados sean varones y todos estén relacionados entre sí a través de su vía materna, de que se trata de una herencia ligada al "X", por lo que al intentar localizar el gen en esta familia, sólo tendremos que emplear marcadores del cromosoma "X". Básicamente de lo que se trata es de ir caracterizando en miembros informativos de esta familia (afectados, madres de afectados y sus hijos varones sanos) distintos marcadores, localizados a lo largo de todo el cromosoma, e ir estableciendo los haplotipos. Un haplotipo, no es ni más ni menos que la serie de alelos de distintos loci que van juntos en el mismo cromosoma en un individuo. Los haplotipos van cambiando de generación en generación por recombinación. Se trata de identificar qué haplotipo, o qué marcador, se heredará de forma asociada a la enfermedad, porque lo tienen en común todos los varones afectados, lo tienen también todas las mujeres portadoras, pero no lo tienen los varones sanos, que sabemos que no comparten la mutación. El gen responsable estará entre los marcadores ligados o muy cercano.

Cuando se estudian varias familias, es conveniente hacer un tipo de análisis probabilístico que consiste en el cálculo del valor LOD. El término LOD no es más que la contracción en inglés de logaritmo de las proporciones. Se trata de calcular la probabilidad condicional de obtener los datos que hemos obtenido en la familia, asumiendo que hay una **frecuencia de recombinación** determinada entre un marcador y el gen de la enfermedad (es decir, que están a una distancia genética determinada) frente a la probabilidad de obtener esos mismos datos cuando no hay ligamiento, es decir cuando recombinan al 50%, que es la frecuencia máxima de recombinación. Para el cálculo de este valor para distintas frecuencias de recombinación hay programas específicos. [Se muestran distintos ejemplos de la representación gráfica de cómo varía el valor LOD cuando dos genes estén muy ligados, ligados a una cierta distancia o no ligados, en cuyo caso sólo se obtienen valores negativos].

En el caso de la familia anterior, en una representación del valor LOD para todo el mapa genético del cromosoma "X", se obtuvieron valores muy negativos en todos los intervalos del mapa genético, excepto en un único intervalo donde se alcanzó un máximo superior a 2, considerado significativo en una herencia ligada al "X".

¿Qué conclusiones nos permiten obtener estos estudios?, como ya sabemos a qué marcadores va ligada la enfermedad en esta familia, sabemos que el gen responsable del está localizado en una banda cromosómica concreta, la región Xq24-q25. Teniendo en cuenta los marcadores flanqueantes, que son los primeros que recombinan a cada lado del intervalo crítico, éste abarca 12 megabases, es decir 12 millones de pares de bases en los que hay más de 70 genes distintos. Demasiados genes candidatos y de hecho ninguno de estos genes se ha demostrado estar implicado en este tipo de patología. Por otro lado, sí que había un candidato funcional, el gen GRIA3, interrumpido en un caso de retraso mental y trastorno bipolar, portador de una translocación cromosómica X;12. Sin embargo, el estudio por secuenciación de este gen no nos permitió encontrar ninguna mutación, por lo que se descartó como gen responsable, al menos en esta familia.

Se presenta un esquema con un diagrama del cromosoma "X" donde están representados todos los genes implicados en retraso mental inespecífico en este cromosoma, así como las localizaciones, o mejor dicho intervalos de localización, obtenidos en familias aisladas que no tienen mutación en ninguno de estos genes. Se resaltan las localizaciones descritas por

nuestro grupo, que cuando se alcanza un valor significativo reciben un código internacional MRX. La conclusión es que además de los 24 genes distintos que pueden ocasionar la misma patología, sabemos que tiene que haber bastantes más, localizados a lo largo de todo el cromosoma "X". De hecho se estima que en este cromosoma, que sólo tiene unos 900 genes distintos, puede haber hasta 100 genes distintos cuya mutación puede causar este tipo de patología. Esto es heterogeneidad genética: distintos genes ocasionan la misma patología.

En una familia con una localización bastante pequeña, y solapada con la de otras tres familias se trató de identificar un nuevo gen implicado en este tipo de trastornos. Hoy en día se conocen los genes contenidos en cada región del genoma, lo que facilita los estudios para tratar de identificar qué genes causan una enfermedad, una vez que ésta se ha localizado en un intervalo del genoma, mediante la búsqueda de mutaciones en los genes contenidos en dicho intervalo.

Un ejemplo especialmente didáctico, es los estudios en una familia con el síndrome de Lenz, un retraso psicomotor grave con microftalmia y toda una serie de rasgos clínicos que son los que nos permiten afirmar que se trata de esta enfermedad, y que presentaban dos varones primos entre sí. Esta enfermedad del síndrome de Lenz es afortunadamente muy poco prevalente, se han descrito muy pocos casos en todo el mundo en la literatura científica y sin embargo, también tiene heterogeneidad genética.

En principio, solo había descritas dos familias en las que se habían hecho estudios genéticos, y en cada una de ellas se daba una localización distinta. Una, cerca del extremo del brazo largo, otra, en medio del brazo corto. La segunda de ellas de hecho tiene una mutación candidata en un gen concreto. Pues bien, en la familia que hemos estudiado, hemos encontrado que en principio se asocia de forma parcialmente solapada con el segundo de estos "locus". Con un pequeño problema, un tío de los pacientes que presenta exactamente el haplotipo a riesgo. Una posible localización de la mutación en el resto del cromosoma "X" se pudo excluir con total significatividad, por tanto cabían tres posibilidades. 1) La existencia de un mosaicismo germinal en la abuela. La primera generación de hecho no se puede estudiar, pero por los haplotipos podemos deducir de donde proviene cada cual, ya que las mujeres comparten entre sí el cromosoma "X" del padre. Se pudo deducir así que el haplotipo a riesgo proviene de la abuela. 2) Que la mutación tuviera penetrancia incompleta. Es decir, que siendo un varón portador de la mutación, no lo manifestara como tal síndrome por el motivo que fuera. 3) Que en realidad la enfermedad que estamos estudiando no está en el cromosoma "X", sino que se trataba de otro tipo de herencia. De hecho, se asumieron las dos primeras hipótesis para continuar los estudios.

Un mosaico es cuando distintas células de un mismo individuo presentan distintas variantes. En este caso tendría que ser necesariamente una mutación que hubiera surgido durante el desarrollo embrionario, de tal forma que entre toda la población de células germinales, en la población de ovocitos, algunos portaban la mutación, pero otros ovocitos con el mismo cromosoma "X", no la portaría, lo que justificaría que hubiese mujeres portadoras de la mutación mientras que un hermano, teniendo el mismo cromosoma "X", fuera sano. Finalmente se demostró que ésta era la hipótesis correcta porque después de rastrear toda una serie de genes encontramos una mutación en el gen PQBP1, consistente en una pequeña delección de dos bases (AG) presente en los pacientes pero no en el tío sano. Este gen se sabe implicado en una serie de formas sindrómicas de retraso mental,

más o menos relacionadas entre sí, y que se han venido a agrupar bajo la denominación de síndrome de Renpenning.

La conclusión es que esta enfermedad, aun siendo tan rara, muestra una extraordinaria **heterogeneidad genética**, de modo que nos encontraríamos que de tres familias en las que se ha realizado estudios genéticos, cada una de ellas está causada por un gen distinto. Por otro lado también demostramos que hay **heterogeneidad alélica**, porque distintas mutaciones en el mismo gen van a dar lugar a distintas enfermedades o a distintos rasgos clínicos. Por otro lado, resulta que el síndrome cerebro-palato-cardíaco de Hamel presentaba exactamente la misma mutación que encontramos en esta familia. Esto se podría explicar como una **expresividad variable**, es decir, hay otros factores, posiblemente factores genéticos o epigenéticos, que hace que la misma mutación en unos casos afecten determinados órganos y en otros no. Por último, hemos visto cómo una mutación presente como mosaicismo germinal puede dificultar los estudios de ligamiento.

En el gen ARX, hay ejemplos en los que una delección, que puede ser bastante más grande, puede ser una variante polimórfica, sin repercusión en el fenotipo. Mutaciones en este gen puede ocasionar todo un rango de trastornos del neurodesarrollo, trastornos que van desde la hidranencefalia (incompatible con la vida), pasando por problemas de lisencefalia, de síndromes específicos y de retraso mental inespecífico leve. Por otro lado, cuando se estudia la frecuencia de la mutación más frecuente, al estudiar familias con una herencia claramente ligada al "X" es más frecuente que si estudiamos series de pares de hermanos, y si estudiamos varones esporádicos la frecuencia es muy baja. Hay un 30-40% de exceso de varones con retraso mental sobre el número de mujeres. Este exceso de varones se achacaba a causas monogénicas en el cromosoma "X", sin embargo lo que nos está indicando las diferentes frecuencias de mutaciones en el gen ARX según los antecedentes familiares es que posiblemente que una gran proporción de este exceso de varones no se deben a una causa monogénica, sino que se debería posiblemente a causas multifactoriales. En la distribución continua de la inteligencia, que en última instancia es de lo que estamos hablando, puede haber causas monogénicas, que tienen lugar en un grupo de pacientes, pero solapándose y sin distinción aparente, otros casos en realidad se deben a causas multifactoriales. El exceso de varones posiblemente indique que en el cromosoma "X" haya un acúmulo de factores de susceptibilidad al retraso psicomotor.

La **epigenética**, por último, sería algo así como la importancia que pueda tener la estructura de la cromatina sobre la expresión de los genes y su regulación. En un principio, lo que se describió relacionado con este tema fue la impronta genética, que como decía antes es el hecho de que se manifieste una enfermedad o no, en función que heredemos una mutación del padre o de la madre. Se debe a la expresión diferencial de determinados genes, de hecho un número muy limitado de genes. La falta de cada uno de ellos puede dar lugar a distintas enfermedades, básicamente son casi todos trastornos del desarrollo. Quizás el paradigma es la región responsable de los síndromes de Prader-Willy y de Angelman. En la misma zona nos encontramos una serie de genes que se expresan exclusivamente aquellos presentes en el cromosoma 15 que hemos heredado del padre, y otros genes que se expresan solamente en el cromosoma 15 que hemos heredado de nuestra madre. Con lo cual tenemos que, dos síndromes muy distintos pueden tener genéticamente el mismo defecto: una delección de la región 15q11-q12 en el cromosoma paterno va a ocasionar el síndrome de Prader-Willy, porque va a faltar la expresión de aquellos genes de expresión exclusiva paterna, mientras que la ausencia de la misma

zona en el cromosoma materno ocasionará el síndrome de Angelman, básicamente por la falta de expresión del gen UBE3A. El hecho de que se expresen o no estos genes depende de la que se ha venido a denominar "centro de la impronta", cuyo estado de metilación se estudia para el diagnóstico de ambos síndromes. La metilación del ADN no es más que la adición de un grupo metilo, en concreto sobre una citosina (seguida de guanina). Lo habitual es que esté metilada una copia, no metilada la otra, por lo que la ausencia de un patrón de metilación u otro, nos está indicando que se trata de una enfermedad o de otra. Esta metilación del DNA, se dice que es estable, sin embargo va variando a lo largo del desarrollo, de tal forma que es bastante mayor por ejemplo en espermatozoides que en ovocitos, sin embargo en las primeras etapas del desarrollo del embrión se desmetila de forma masiva todo el genoma y en cuanto empiezan los procesos de diferenciación celular, se irán metilando genes concretos en función del linaje celular. Asociado a la metilación del ADN se producen con distintas modificaciones en las histonas, que influirán en la estructura de la cromatina. Distintas modificaciones son acetilaciones/desacetilaciones, la adición de grupos metilo, la fosforilación, etc. La secuencia básica es que en un principio, cuando se quiere inactivar un gen en un tipo de célula por no ser necesaria su actividad, se metila la región promotora. El hecho de que está metilada atrae una proteína de unión al ADN con capacidad de inhibir la transcripción en mayor o menor grado, y que también tiene la función de reclutar, de atraer otros factores que van a ir modificando estas histonas, de tal forma que ocasiona una compactación de la cromatina. En consecuencia, el ADN estará muy compactado y, por lo tanto, no será accesible a factores de transcripción, por lo que el gen no se expresa, está silenciado.

Hay una serie de datos que relaciona la epigenética con el tema de la adicción a drogas. Sabemos que los cambios epigenéticos pueden ocasionar cambios permanentes a largo plazo que se relacionan con la diferenciación celular, que se han relacionado con la memoria a largo plazo y que se han relacionado también con cambios conductuales a largo plazo, estables. Recientemente se ha demostrado que la administración de cocaína induce cambios en la estructura en el centro estriado mediante acetilación de las histonas en las regiones promotoras de genes específicos. Estos cambios de la cromatina son los que van a inactivar determinados genes, y por tanto van a cambiar de alguna forma la pauta de comportamiento. Se está trabajando con la hipótesis de que la remodelación de la cromatina estaría implicada en los cambios neuronales y de comportamientos asociados a la adicción a las drogas.

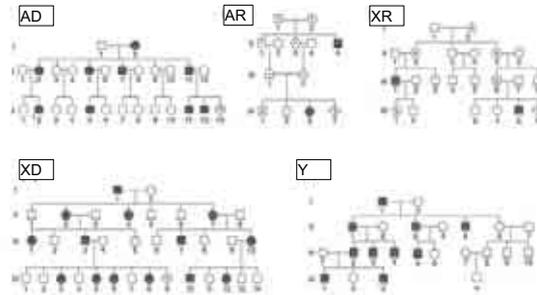
Conceptos básicos de la investigación en genética de los trastornos mentales

Francisco Martínez
Unidad de Genética
Hospital Universitario La Fe

Conceptos básicos

- Gen: Unidad hereditaria que controla cada carácter en los seres vivos.
- Alelo: Cada una de las variantes que puede tener un gen
- Locus: El lugar que ocupa un gen o una secuencia en el genoma. Ej: marcadores polimórficos (DXS1214, D17S1536...)
- Homocigoto: Individuo con el mismo tipo de alelo en cada cromosoma homólogo (AA)
- Heterocigoto: Individuo con distinto tipo de alelo en cada cromosoma homólogo (Aa)
- Dominancia: Un carácter es dominante si se manifiesta en el heterocigoto
- Recesividad: Es recesivo si no se manifiesta en el heterocigoto
- Codominancia: El heterocigoto tiene un fenotipo intermedio entre los homocigotos. Grupo ABO: A=B>O

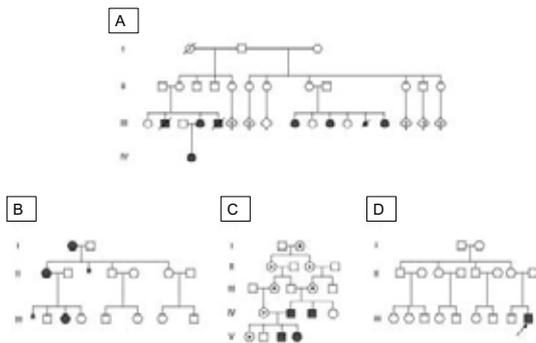
Patrones básicos de herencia



Factores que afectan a la herencia monogénica

- Expresión variable
 - Anticipación
- Penetrancia incompleta
- Lyonización
- Heterogeneidad génica
- Fenocopias
- Interacción génica/Epistasia
- Impronta génica

Factores que afectan a la herencia monogénica



Estrategias para la identificación de genes implicados en enfermedades monogénicas

- Clonación posicional:
 - Caracterización del punto de rotura en alteraciones cromosómicas (translocaciones, inversiones, deleciones, sitios frágiles)
 - Estudio de genes localizados en regiones definidas mediante ligamiento genético
- Genes candidatos funcionales: rastreo de mutaciones
 - Genes implicados en enfermedades relacionadas

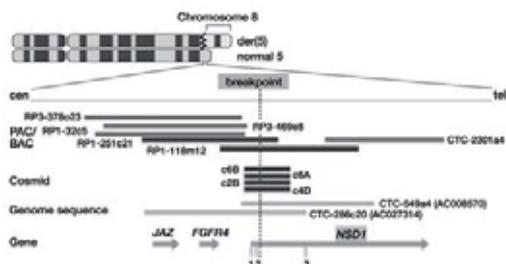
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Causas genéticas de retraso mental

Causas genéticas de retraso mental	%
•Cromosómicas	15%
•Monogénicas ligadas al cromosoma X	10-13%
•X frágil	2-2,5% varones
•RMLX síndrómico	5-7% *
•RMLX inespecífico	5-10% *
•Monogénicas Autosómicas	5-8%(?)
•Dominantes (S. de Sotos, Cornelia de Lange...)	
•Recesivas	
•Síndromes de microdelección	3-5%
•S. Prader-Willi 15q11-q13	•Cri du Chat 5p15
•S. Angelman 15q11-q13	•WARG 11p13
•CATCH 22 22q11	•Miller-Diecker 17p13
•Williams 7q11	•Smith-Magenis 17p11
•Wolf-Hirshhorn 4p16	•Rubinstein-Taybi 16p13

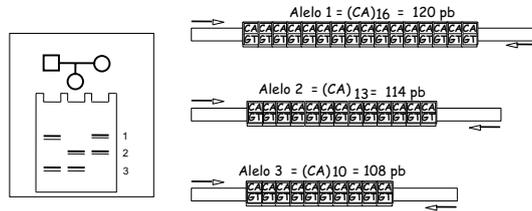
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Búsqueda de genes mediante caracterización del punto de rotura cromosómica



Estudios de ligamiento

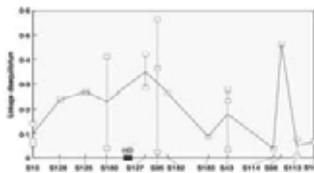
Empleo de secuencias microsatélite como marcadores genéticos de elevada informatividad, para analizar la segregación de alelos en una familia



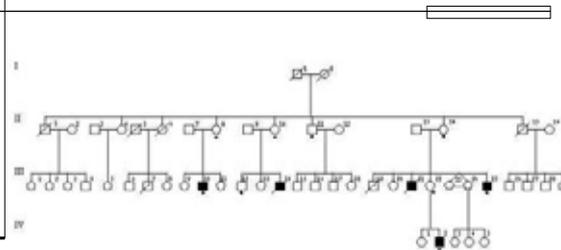
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Ligamiento vs. asociación alélica

- Ligamiento: tendencia de dos genes o secuencias (loci) a transmitirse juntos como consecuencia de su proximidad física en el cromosoma (asociación entre loci)
- Asociación alélica (desequilibrio de ligamiento): asociación no aleatoria entre alelos específicos de loci ligados
- Pero también hay situaciones que causan aparente asociación alélica: estratificación de la población, epistasia.

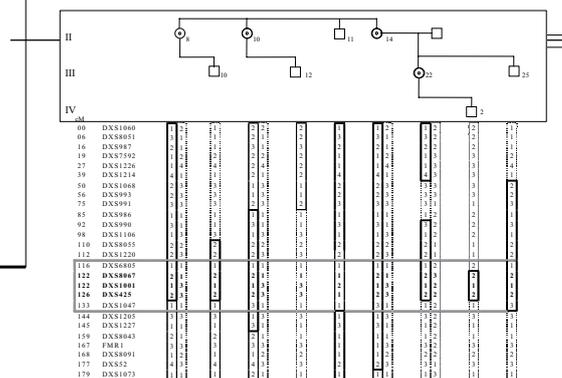


MRX82: árbol genealógico



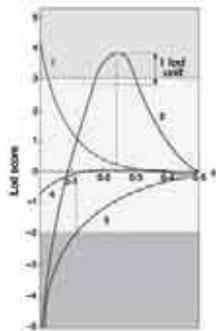
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

MRX82: establecimiento de los haplotipos



Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Cálculo del valor Lod



$$Z(\theta) = \log [L(\theta)/L(1/2)]$$

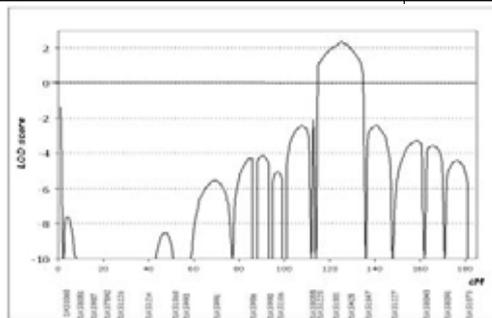
Donde,

θ : Frecuencia de recombinación

L: probabilidad condicional de los datos obtenidos

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

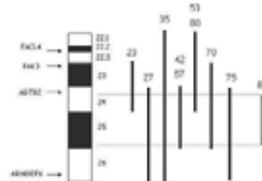
MRX82: cálculo del valor LOD



Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

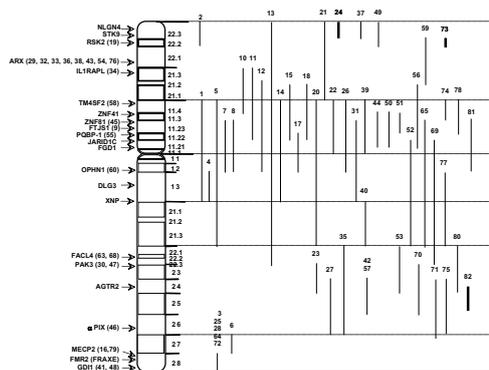
MRX82 : conclusiones

- ☐ MRX82 se localiza en Xq24-q25
- ☐ El intervalo abarca 12,4 Mb (~74 genes distintos)
- ☐ No contiene ningún gen RMLX conocido
- ☐ Existe un gen candidato (GRIA3) interrumpido en una translocación (X;12) asociada a RM y trastorno bipolar



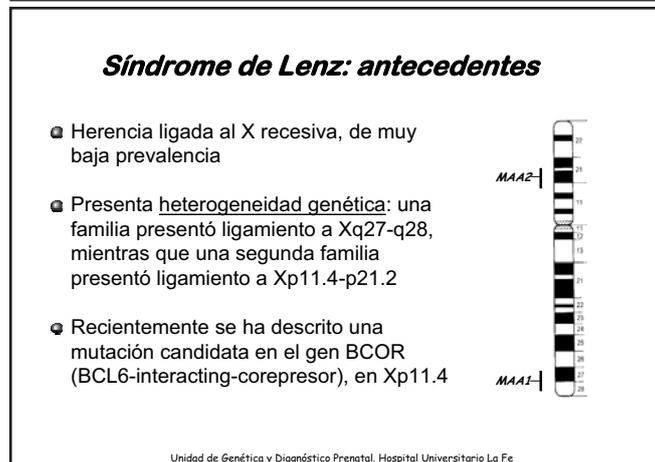
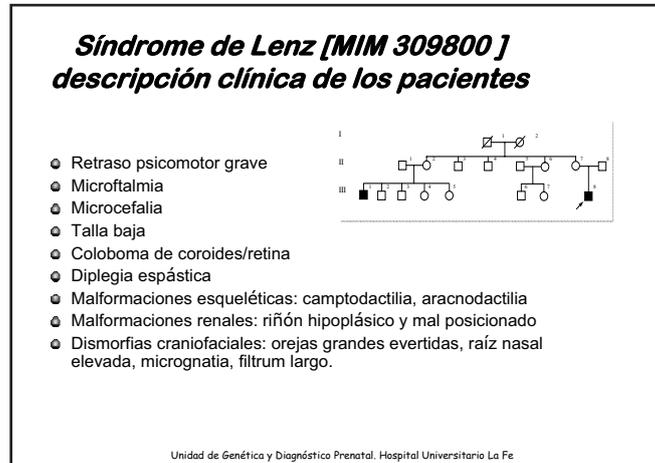
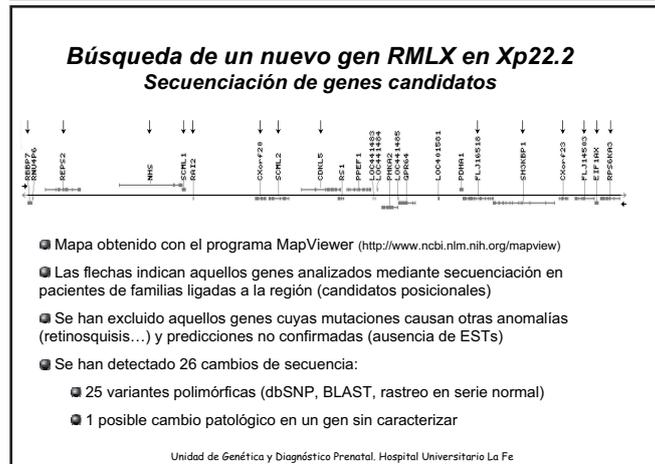
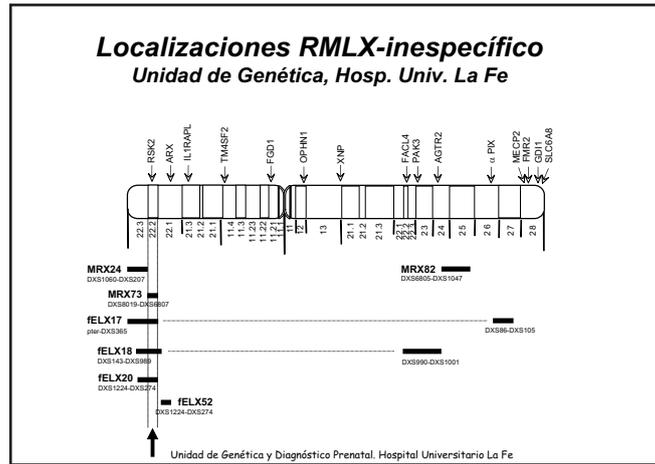
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

RMLX inespecífico: elevada heterogeneidad genética

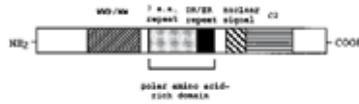


Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Octubre 2005



PQBP1: PoliGlutamine Binding Protein



- ❑ Gen muy conservado evolutivamente y de expresión ubicua, abundante en SNC
- ❑ Función(?): relacionada con factores de transcripción (tractos de poliglutamina) y de procesamiento del RNA mensajero
- ❑ Mutaciones en este gen causan:
 - ❑ S. de Renpenning
 - ❑ S. de Sutherland-Haan
 - ❑ S. cerebro-palatocardiaco de Hamel
 - ❑ RM inespecífico

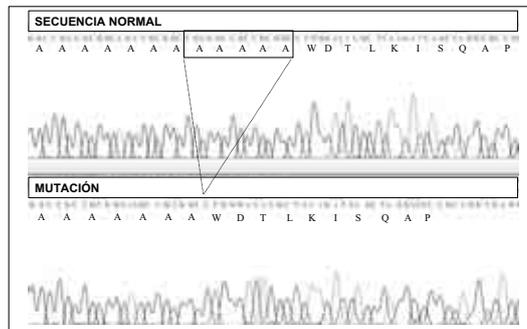
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Conclusiones del estudio

- ❑ El S. de Lenz presenta mayor heterogeneidad genética de la esperada: 3 familias estudiadas → 3 genes/loci distintos.
- ❑ Aumenta la heterogeneidad alélica del gen PQBP1: S. de Renpenning, S. de Sutherland-Haan, S. cerebro-palatocardiaco de Hamel, RM inespecífico...y S. de Lenz.
- ❑ La misma mutación genética puede causar un cuadro clínico diferente (expresividad variable): 3898_3899delAG descrita previamente en pacientes sin afectación ocular, genito-urinaria o esquelética.
- ❑ El mosaicismo germinal de una mutación puede enmascarar los estudios de ligamiento familiar.

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Rastreo mutacional del gen ARX c.450del15 es una variante polimórfica

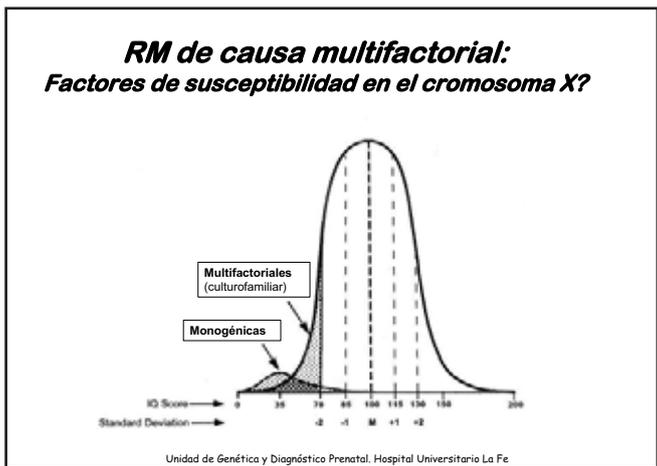


Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

ARX: enseñanzas de un gen

- ❑ Mutaciones en el gen ARX causan un rango continuo de trastornos del neurodesarrollo, desde hidranencefalia, lisencefalia+agenesia del cuerpo calloso hasta RMLX inespecífico.
- ❑ Frecuencia de las expansiones de poli-alanina:
 - ❑ 7% familias RMLX (Euro-consorcio RMLX)
 - ❑ 2% pares de hermanos (Euro-consorcio RMLX)
 - ❑ 0,1% varones esporádicos (Gronskov et al, 2004)
- ❑ Mandel y Chelly (2004): las causas monogénicas no justifican el 30-40% de exceso de varones afectados. Estiman que la prevalencia de las causas monogénicas en el cromosoma X afectan menos del 10% varones con RM.

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe



Reordenamientos cromosómicos
Técnicas de detección

- Citogenética convencional con bandas G: Límite de resolución 5 Mb.
- CGH: Resolución 3-10 Mb.
- FISH: Estudio de un loci específico de 35-200 Kb complementario a la sonda.

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

CGH-array

Cohibridación de la muestra problema (marcada con Cy3) y muestra normal (Cy5)

Puntos con un exceso de fluorescencia roja: posible deleción en el DNA problema
Puntos con un exceso de fluorescencia verde: posible duplicación en el DNA problema

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Otros tipos de microarrays

Arrays de expresión

Arrays de genotipado

SNP	Allele 1	Allele 2	Genotype
1	A	G	AA
2	C	T	CC
3	G	A	GA
4	T	C	TC
5	A	G	AA
6	C	T	CC
7	G	A	GA
8	T	C	TC

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Epigenética

Importancia de la estructura de la cromatina sobre la expresión génica y su regulación

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

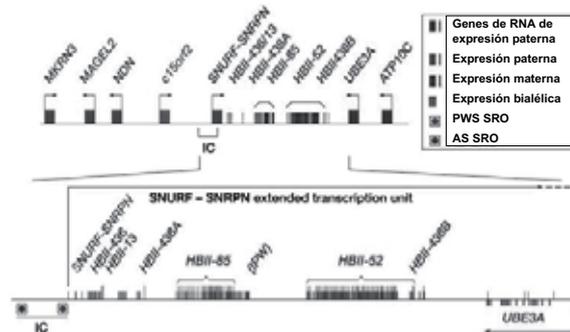
Impronta génica

- Expresión diferencial de determinados genes según se localicen en el cromosoma de origen materno y paterno.
- Sólo se ha descrito en unas pocas regiones:

Gen	Alelo reprimido	Enfermedad
• SNURF-SNPN	materno	S. Prader-Willi
• UBE3A	paterno	S. Angelman
• PEG1/MEST	materno	S. Silver-Russell
• LIT1	paterno	S. Beckwith-Wiedemann
• IGF2	materno	S. Beckwith-Wiedemann
• WT1	paterno	Nefroblastoma

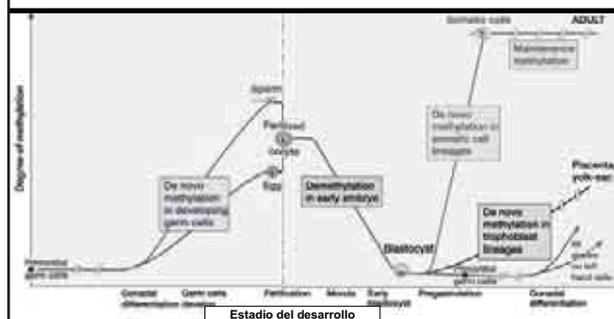
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Región con impronta paterna/materna en 15q12: S. Prader-Willi y S. Angelman



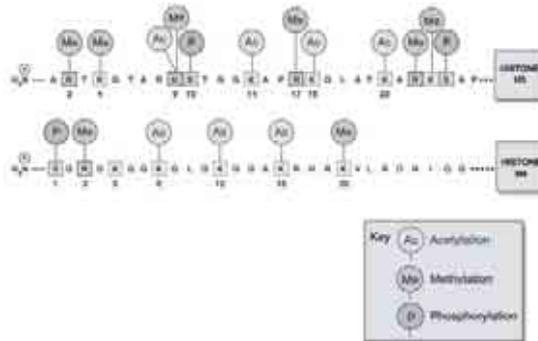
Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Niveles de metilación del DNA en distintas fases del desarrollo

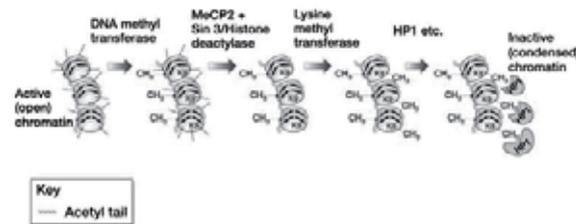


Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe

Epigenética: modificación de histonas



La metilación del DNA conduce a la represión de la transcripción mediante desacetilación y metilación de histonas

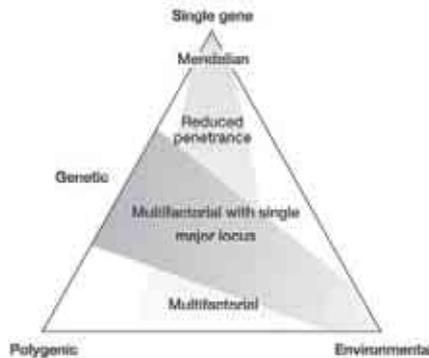


Importancia de la epigenética en la adicción a drogas

- Los cambios epigenéticos pueden ocasionar cambios permanentes en el patrón de expresión génica, que se relacionan con:
 - Memoria celular (diferenciación)
 - Refuerzo de conexiones sinápticas implicadas en memoria a largo plazo
 - Cambios conductuales a largo plazo
- Kumar et al. (Neuron 48:303-14, 2005): administración de cocaína induce cambios en la estructura de la cromatina en el estriado mediante acetilación de histonas en promotores de genes específicos.

Hipótesis: La remodelación de la cromatina estaría implicada en los cambios neuronales y de comportamiento asociados a la adicción a drogas.

Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal, Hospital Universitario La Fe



Investigación genética en enfermedades complejas

Javier Costas
Centro Nacional de Genotipado (CeGen).
Grupo de Medicina Xenómica
Universidade de Santiago de Compostela

Enfermedades multifactoriales complejas

No se puede abordar el tema de la investigación genética en enfermedades complejas sin referirnos al proyecto genoma humano, cuyo primer borrador se publicó en febrero de 2001. Este proyecto ha permitido que la genética médica pudiese enfrentarse a un nuevo reto, la identificación de las bases genéticas implicadas en la diferente predisposición a padecer enfermedades comunes. La mayor parte de las enfermedades comunes son enfermedades multifactoriales complejas, cuya aparición es debida a la combinación de factores genéticos y ambientales (tanto de riesgo como de protección). Además, es de esperar que la interacción entre estos factores desempeñe un papel importante en la aparición de la enfermedad. El número de factores genéticos puede ser muy variable de unos pocos a múltiples genes, lo que determinará en parte la complejidad en su identificación. Este modelo es válido en general para cualquier tipo de carácter complejo, tanto cualitativo (por ejemplo, rasgos de personalidad) como cuantitativo (por ejemplo, índice de masa corporal).

Cuando se analiza alguna patología compleja, lo primero es saber si existe una base genética. Aunque en principio siempre hay base genética, es interesante tener una idea de la importancia que puede tener esta base genética. Ésto se estima mediante estudios de epidemiología genética clásica, que son estudios de agregación de las enfermedades en familias, estudios de concordancia en gemelos homocigóticos frente a dicigóticos, y estudios de adopción, que nos dan una idea de la heredabilidad del carácter que estamos estudiando, es decir, la proporción de la varianza poblacional en susceptibilidad a padecer un trastorno complejo atribuible a factores genéticos. Los cálculos de heredabilidad en humanos son complicados, a diferencia de organismos modelo donde se pueden realizar los cruces necesarios. Por tanto, estas estimas hay que tomarlas con cierta prudencia.

En la tabla 1 se muestran los valores de heredabilidad de trastornos psiquiátricos comunes. Se puede ver que la variabilidad debida a factores genéticos, la heredabilidad, es grande en todos los trastornos. También se puede ver en la tabla 1 el riesgo relativo definido como proporción de afectados entre familiares de primer grado en comparación con controles. Se puede apreciar que realmente existe una agregación familiar en las distintas patologías y que el componente genético es importante. Por ejemplo, en abuso de drogas el componente genético puede explicar el 30-50% de la variabilidad poblacional,

según distintos autores, con lo cual es importante estudiar este componente genético. Si la variabilidad fuera próxima a cero, no tendría sentido analizar este tipo de factores.

Tabla 1. El componente genético en trastornos psiquiátricos		
Patología	Riesgo relativo	Heredabilidad
Trastorno bipolar	7-10	0,60-0,70
Depresión mayor	2-3	0,28-0,40
Pánico	3-8	0,50-0,60
Autismo	50-100	0,90
Esquizofrenia	8-10	0,80-0,84
Abuso de drogas	4-8	0,30-0,50
Trastorno de ansiedad	4-6	0,30-0,40

Estudios de asociación en poblaciones frente a ligamiento en familias

Como se describió en la anterior ponencia, en las enfermedades mendelianas (enfermedades monogénicas) la forma general de identificar genes es mediante estudios de ligamiento en familias, en que se busca la cosegregación entre un marcador genético y la enfermedad, asumiendo un modelo de herencia determinado. El problema en las enfermedades complejas es que no existe un modelo de herencia claro, porque es la existencia de múltiples genes de predisposición y su interacción con el ambiente lo que determina la aparición de la enfermedad, de forma que es necesario introducir modificaciones en los métodos básicos de análisis de ligamiento para adaptarlos a las enfermedades complejas (modelos no paramétricos). Aún así, en enfermedades complejas hay otro método alternativo de identificación de genes de predisposición, que son los estudios de asociación en poblaciones, generalmente mediante diseños caso-control. Simplemente, se muestrean grupos de individuos provenientes de la misma población que presentan la patología de estudio e individuos sanos no emparentados. Y mediante una prueba estadística estándar, como puede ser una X^2 cuadrado o una regresión logística, se compara la hipótesis nula de la igualdad de frecuencias alélicas o genotípicas entre los casos y los controles. Los estudios de asociación tienen más potencia para detectar variantes de efecto modesto (Risch y Merikangas, 1996, Science 273:1516-1517), que es lo esperable en genes que causan susceptibilidad a enfermedades complejas. Para que sean detectables mediante ligamiento, se necesita que el efecto sea grande. En cambio, si el efecto es pequeño se detecta mejor en estudios de asociación, siempre que la frecuencia de la variante de susceptibilidad sea elevada en la población. Si la frecuencia es baja, los estudios de asociación son poco efectivos. Los estudios de ligamiento son más robustos que los de asociación frente a la heterogeneidad alélica (la existencia en el mismo gen de distintos alelos que causan susceptibilidad a la patología). En este caso, las distintas variantes alélicas estarían a baja frecuencia y los estudios de asociación tendrían menos potencia estadística.

Por tanto, podemos concluir que los estudios de asociación, tal y como se están realizando actualmente, se basan en la hipótesis de enfermedad común-variante común, que propugna que el riesgo genético a padecer enfermedades comunes podría ser debido a alelos de predisposición que también son comunes en la población. Es una idea simple e intuitiva ya propuesta por Eric Lander en 1996 (Science 278:536-539), aunque hay pocas

evidencias tanto a favor como en contra. La hipótesis alternativa es la de enfermedad común-variante rara. Ésta es la hipótesis correcta en el caso de las enfermedades monogénicas, donde las variantes son raras, son eliminadas por el papel de la selección purificadora, con lo cual la aparición de la enfermedad se debe a la presencia de alguna de múltiples variantes nuevas. Se trata, por tanto, de mutaciones y no de polimorfismos (la diferencia entre polimorfismo y mutación es básicamente que un polimorfismo tiene una frecuencia importante en la población, en general superior al 1%, frente a una mutación, que prácticamente no se encuentra representada en la población). Sin embargo, dado el limitado efecto que ocasiona cada variante de susceptibilidad en enfermedades complejas (a diferencia de en enfermedades monogénicas), es posible que la selección natural no sea eficaz eliminándolas, pudiendo llegar a convertirse en polimorfismos de predisposición.

El ejemplo más claro que se conoce de la existencia de alelos comunes de susceptibilidad a enfermedades complejas es el caso de la variante ϵ^4 de Apoe, asociada a Alzheimer. Es realmente una variante común, con una frecuencia en las distintas poblaciones del 10-20%, lo que demuestra que, al menos en determinados casos, la hipótesis de enfermedad común-variante común es correcta.

Otro aspecto importante en los estudios de asociación es el cálculo de la Odds ratio (OR), el riesgo conferido por la variante, que se calcula como:

siendo a el número de casos que presentan la variante, b el número de controles que presentan la variante, c el número de casos que no presentan la variante, y d el número

$$OR = \frac{\frac{a}{c}}{\frac{b}{d}} = \frac{ad}{bc}$$

de controles que no presentan la variante.

Si el valor OR es menor que 1, estaríamos ante un factor de protección y si el factor es mayor que 1, estaríamos ante un factor de riesgo. Normalmente no sólo se presenta el valor de OR, sino que se dan sus intervalos de confianza al 95%. Y la interpretación no es intuitiva, aunque es equivalente al riesgo relativo si la prevalencia de la enfermedad es baja. En estos casos un OR de 1,5, por ejemplo, significaría que ese factor nos estaría incrementando en un 50% la probabilidad de padecer la enfermedad. El ejemplo prototípico de Apoe ϵ^4 y Alzheimer presenta una OR de 3,3. Normalmente se están encontrando en enfermedades complejas valores de OR menores. De hecho Apoe ϵ^4 debió ser de los primeros alelos que se encontraron por este motivo, pues causa un riesgo relativo bastante grande. Generalmente se encuentran riesgos menores de 2 y su interpretación sería la siguiente: por ejemplo, la prevalencia de la esquizofrenia en población en general es del 1%, si hablamos de un alelo de susceptibilidad con un OR de 1,5, tendríamos que los individuos que presentan ese alelo tienen una posibilidad del 50% mayor, o sea tendrían una posibilidad del 1,5% de padecer esquizofrenia. Simplemente incrementaría un poco el riesgo.

Diseño de estudios de asociación: selección de genes candidato y de marcadores moleculares

El diseño de los estudios de asociación es algo que ha venido cambiando substancialmente, gracias al proyecto Genoma Humano y proyectos relacionados. Clásicamente, lo que se analizaba era un polimorfismo candidato, algún cambio conocido

que pudiera tener repercusión en algún gen candidato (como algún cambio aminoacídico o alguna variante de longitud en la región promotora que pudiera alterar los niveles de expresión), y se buscaban diferencias de las frecuencias de estas variantes en casos y controles. Actualmente, la hipótesis de partida es más ambiciosa, no está limitada por el número de polimorfismos conocido, de forma que se analizan genes candidato basándose en criterios de funcionalidad, tales como datos de expresión, modelos fisiopatológicos de la enfermedad, interacciones proteicas con otras proteínas relacionadas con la enfermedad, rutas metabólicas, etc. Éstos serían genes candidato funcionales. En vez de utilizar un único polimorfismo, se suelen utilizar múltiples polimorfismos a lo largo del gen.

La otra opción es el análisis de genes candidato posicionales a partir de análisis de ligamiento en familias. Como se veía en la ponencia anterior, estos análisis detectan una región grande, que puede contener varias decenas de genes, de forma que los estudios de asociación en poblaciones nos permiten refinar estas regiones, empleando múltiples polimorfismos a lo largo de la región, para llegar a identificar el gen causal. A medida que la hipótesis inicial para escoger genes candidato va siendo menos estricta, se tiende hacia los análisis de todo el genoma, que ya son abordables tecnológicamente, gracias a los conocimientos de la estructura del genoma y de las tecnologías de genotipación. En este caso, no se establece ninguna hipótesis a priori sobre qué genes pueden ser candidatos, sino que se analiza todo el genoma buscando algún gen asociado.

Como veíamos también en la ponencia anterior, en los análisis de ligamiento los marcadores clásicos que se utilizan son microsatélites, que simplemente son repeticiones de secuencias cortas. Pueden ser marcadores muy polimórficos, muy variables, existiendo múltiples alelos que varían en el número de repeticiones. Sin embargo, los estudios de asociación se centran principalmente en polimorfismos de un único nucleótido (SNPs, del inglés single nucleotide polymorphism). Generalmente, sólo existen dos alelos. Sin embargo, la principal ventaja que tienen los SNPs frente a los microsatélites, y por eso se utilizan en los estudios de asociación, es que son muy abundantes. Se calcula que hay un SNP cada 300 pares de bases de forma que es posible delimitar muy bien la región de estudio, la región que está asociada. Por otro lado, tienen la ventaja de que son muy fácilmente analizables a gran escala con técnicas robotizadas.

La abundancia de SNPs ya descritos en el genoma humano es enorme. Hay más de diez millones de SNPs en la base de datos de SNPs del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), de los cuales cinco millones están validados, es decir, se excluye que se trate de errores de secuenciación o de posibles SNPs sólo identificados mediante métodos computacionales. Este número es suficiente para realizar estudios de asociación a lo largo de todo el genoma.

Además de estos marcadores, es interesante el uso de haplotipos. Los datos que obtenemos cuando se realiza genotipación de SNPs son genotipos, datos de las dos posiciones que puede tener un individuo en ese SNP, pero no se sabe su ordenación en los cromosomas, su haplotipo. Los haplotipos en principio pueden dar información adicional con respecto a la utilización de SNPs en estudios de asociación, porque son más polimórficos, pueden existir más variantes alélicas. Por tanto, es interesante también realizar análisis empleando haplotipos como marcadores, aunque también hay que tener claro que los haplotipos se infieren a partir de datos genotípicos de la población mediante una serie de algoritmos que, aunque son bastante fiables, pueden representar un posible factor de ruido a tener en cuenta. Se puede introducir algún pequeño sesgo, algún pequeño error en la estima,

sobre todo dependiendo de la estructura de desequilibrio de la región, que luego veremos.

Para realizar estudios de asociación empleando SNPs, una vez que se escoge el gen (o genes) candidato, hay dos tipos de estrategias. Por un lado, estaría el método directo que es la estrategia más clásica, más convencional, que simplemente buscaría SNPs (o otro tipo de polimorfismos) funcionales, que serían los responsables directos de causar susceptibilidad. Teniendo en cuenta los aspectos básicos de la biología molecular de un gen, hay una serie de SNPs claramente candidatos a ser funcionales. Estos SNPs afectarán a los distintos procesos del funcionamiento de un gen, desde su empaquetamiento, transcripción, procesamiento del RNA mensajero para eliminar los intrones, exportación al citoplasma, o traducción a la proteína, principalmente. Los más fácilmente identificables serían SNPs en la región codificante que sean no sinónimos (alterando la secuencia aminoacídica de la proteína) o sin sentido (provocando la terminación temprana de la traducción proteica, lo que origina una proteína truncada).

La otra estrategia es el método indirecto, o de mapeo por desequilibrio de ligamiento (DL), que no trata de genotipar el SNP causal sino que asume que éste es desconocido y trata de obtener información sobre él genotipando varios SNPs a lo largo del gen con la intención de que alguno presente un grado de DL elevado con el SNP funcional, de forma que sea válido para detectar asociación. El desequilibrio de ligamiento es simplemente la presencia conjunta de dos alelos próximos a una frecuencia significativamente distinta a la esperada en función de sus frecuencias individuales. Así, siendo A una variante del SNP1, y B una variante del SNP2, $D = f_{AB} - f_A \cdot f_B$. El problema de esta medida, D, es que depende de las frecuencias, por lo que se han propuesto distintas medidas alternativas, siendo las más comunes en genética humana D' y r^2 , que se calculan: $D' = D/D_{max}$, $r^2 = D^2 / [frec(A) \cdot frec(a) \cdot frec(B) \cdot frec(b)]$; siendo D_{max} , el máximo valor de D que puede alcanzarse en función de las frecuencias alélicas concretas. Ambas medidas tienen valores de 0 a 1, aunque su interpretación es distinta: si el alelo de menor frecuencia de un SNP está siempre asociado a uno de los dos alelos del otro SNP, el valor de D' será de 1. r^2 sólo será 1 si cada uno de los alelos de un SNP está asociado a un único alelo del otro SNP (mismas frecuencias). Por tanto, r^2 es una medida más restrictiva que D' . En ausencia de recombinación y con la misma historia mutacional (los dos SNPs aparecen en el mismo linaje), tanto D' como r^2 tienen un valor de 1. En cambio, si la historia mutacional es distinta (cada SNP surge en una rama distinta del árbol genealógico de los distintos haplotipos) $r^2 < 1$; sin embargo, $D' = 1$ siempre que no haya recombinación.

Si comparamos los métodos directo e indirecto: el mapeo por DL no precisa conocimiento previo sobre la funcionalidad del SNP, permitiendo analizar variantes funcionales, aunque no sean conocidas. Por otra parte, presenta menor potencia que el método directo, a no ser que el DL sea perfecto. Además, generalmente, se requieren más SNPs/gen. Por tanto, la estrategia funcional permite analizar más genes, aunque menos exhaustivamente.

Como se ha puesto de manifiesto en los últimos años (Patil et al, 2001, Science 294:1719-1723; Gabriel et al, 2002, Science 296:2225-2229), el DL origina una estructura del genoma humano caracterizada por la existencia de bloques haplotipos intercalados entre regiones de alta recombinación. Los bloques haplotípicos son regiones con baja diversidad haplotípica y alto grado de DL (estas dos características están claramente asociadas). Existen diversas definiciones basadas en la existencia de baja diversidad haplotípica (por ejemplo, un bloque haplotípico es una región del genoma en la que los haplotipos comunes, frecuencia mayor del 5%, representan el 90% de los haplotipos de la región); DL (por

ejemplo, un bloque haplotípico es una región del genoma en que el valor de D' entre SNPs consecutivos es mayor que 0,7), o la regla de los cuatro gametos (por ejemplo, un bloque haplotípico es una región del genoma en que sólo aparecen 3 de los 4 posibles haplotipos entre dos SNPs consecutivos).

En los bloques haplotípicos, la información obtenida genotipando diferentes SNPs es muy redundante, de forma que con genotipar unos pocos SNPs de entre los que forman parte del bloque es posible distinguir qué haplotipos comunes de la región son portados por cada individuo. La selección de los SNPs más apropiados para este fin, llamados taggerSNPs o tagSNPs, permiten, por tanto, ahorrar mucho esfuerzo en la genotipación de las muestras. Así, en el ejemplo de la Figura 1, se presenta un bloque haplotípico, constituido por 10 SNPs, identificado por el programa informático Haploview (Barret et al, 2005, *Bioinformatics* 21:263-265) en el gen DISC1 a partir de los datos de muestras de origen europeo generados por el proyecto HapMap Internacional (descrito a continuación). De los múltiples haplotipos que podrían existir al combinar los 10 SNPs, sólo hay 3 a frecuencias superiores al 1%. La genotipación de dos de los 10 SNPs (indicados con un triángulo en la parte superior) permite distinguir los distintos haplotipos del bloque, ahorrando la genotipación de 8 SNPs.

Figura 1. Ejemplo de bloque haplotípico en el gen DISC1

Cada columna representa la variante del SNP presente en cada haplotipo (representados en cada fila). Los valores numéricos indican la frecuencia de cada haplotipo. Los triángulos identifican los tagSNPs.

▼	▼	
		CGGAGGATCC .575
		TAAGCAGATT .308
		TAAACGATCC .083

Con esta idea nace el proyecto HapMap internacional (www.hapmap.org/index.html), que pretende describir la variabilidad haplotípica existente en distintas poblaciones humanas, modelo de los grandes grupos geográficos (europeos, asiáticos y africanos), con el objetivo de poder seleccionar tagSNPs que limiten el esfuerzo de genotipación necesario para analizar esta variabilidad. La primera fase del proyecto HapMap significó la genotipación de más de 1 millón de SNPs, a una densidad de 1 SNPs/5kb. En la segunda fase, se han genotipado SNPs adicionales (hasta un total próximo a 6 millones) en aquellas regiones en las que el DL era menor. El objetivo final del proyecto es el de facilitar el descubrimiento de variantes de susceptibilidad a enfermedades comunes.

Una cuestión clave es saber cuál es el grado de DL útil para mapear por DL. Para ello es interesante destacar que el incremento del tamaño muestral preciso para mantener la potencia en un estudio de asociación caso-control es inversamente proporcional a r^2 . Por ejemplo, si se precisan 1000 casos y controles asumiendo que genotipamos el SNP causal, se precisarán 2000 casos y controles usando un marcador con $r^2 = 0,5$. Por tanto, la selección de SNPs para mapeo por DL puede basarse en el valor de r^2 entre SNPs no necesariamente consecutivos (a diferencia de la selección basada en bloques haplotípicos). Tras identificar un subconjunto de SNPs del total de posibles SNPs del gen que presenten un valor de r^2 elevado entre ellos, por ejemplo mayor que 0,8, a partir de datos como

los generados por HapMap, se genotiparía en nuestras muestras sólo un SNP de cada subconjunto. El algoritmo Tagger, incluido dentro del programa informático Haploview, permite realizar esta selección fácilmente a partir de los datos de HapMap.

Problemas metodológicos de los estudios de asociación

Los estudios de asociación presentan un serio problema: una parte importante de las supuestas asociaciones iniciales no son reproducidas en estudios posteriores encaminados a confirmar la asociación en muestras independientes. Así, una revisión de supuestas asociaciones revela que de 166 estudios, 97 fueron observados de nuevo, aunque sólo 6 fueron reproducidos en el 75% de los estudios (Hirschhorn et al, 2002, Genet Med 4:45-61). Sin embargo, debemos tener presente que la variabilidad en la significación estadística de los estudios de replicación no es controvertida, sino que es un hecho esperado del contraste de hipótesis en muestras finitas. Eso sí, gran parte de las causas de la irreproducibilidad se debe a errores de diseño, por lo que pueden ser subsanables. Así, los errores de tipo I (falsos positivos), pueden deberse básicamente al azar o a la estratificación (o subestructura) poblacional. El efecto del azar se ve agravado por el problema del sesgo en la publicación, al existir una tendencia a publicar resultados positivos; y por la realización de múltiples comparaciones, muchas veces con subgrupos ad-hoc al no encontrar asociación en la muestra total. La estratificación poblacional (existencia de subgrupos poblacionales de distinta procedencia dentro de nuestra muestra) puede generar falsos positivos cuando existe diferente prevalencia del trastorno de estudio entre las poblaciones y diferentes frecuencias alélicas entre las poblaciones. Por tanto, debe intentarse un emparejamiento de casos y controles lo más perfecto posible en relación con el origen geográfico. Otras soluciones son la detección y corrección de la estratificación (generalmente mediante el muestreo de marcadores neutros), así como el uso de diseños alternativos al caso-control, como pruebas basadas en familias (como la prueba de desequilibrio de la transmisión o TDT, de sus siglas en inglés). Finalmente, errores de genotipación sesgados también podrían generar falsas asociaciones.

Los errores de tipo II (falsos negativos) pueden estar generados, básicamente, por la baja potencia de la prueba estadística o una clasificación incorrecta del fenotipo. La baja potencia estadística se debe al uso de un tamaño muestral insuficiente, por lo que es interesante realizar un cálculo de la potencia de la prueba estadística a priori, así como tener presente que el efecto estimado del alelo asociado en el estudio inicial es, generalmente una sobreestima del efecto real. La clasificación incorrecta del fenotipo puede darse debido a la existencia de heterogeneidad del carácter, o de fenocopias (fenotipos sin base genética). Por tanto, es importante recurrir a un diagnóstico estandarizado. También se ha propuesto el uso de fenotipos intermedios (o endofenotipos), que serían caracteres asociados con la enfermedad y presentes en familiares no afectados a mayor frecuencia que en la población general, como, por ejemplo, déficits cognitivos en esquizofrenia. Además, es de esperar que este tipo de caracteres estén condicionados por un número menor de factores genéticos y ambientales, por lo que su identificación será más fácil.

Finalmente, la ausencia de reproducibilidad de una asociación puede ser debida a diferencias reales entre poblaciones, tales como heterogeneidad alélica o génica (existencia de distintos alelos/genes de susceptibilidad en las distintas poblaciones), diferencias en riesgo genético (debido a interacción con factores genéticos y/o ambientales específicos de determinadas poblaciones), o diferencias en el patrón de DL (en el caso de mapeo por DL). Estas diferencias son debidas a la historia evolutiva de las distintas poblaciones (selección,

deriva, migración...). Debemos tener presente que la especie humana ha sufrido grandes cambios ambientales en un periodo evolutivo reciente (expansión desde su origen en África, invención de la agricultura, vida sedentaria...). La selección adaptativa es el factor que más drásticamente puede generar diferencias reales entre poblaciones en un corto periodo de tiempo.

Como conclusión, podemos afirmar que muchos de los problemas asociados a la ausencia de replicación de asociaciones son debidos a problemas de diseño. Para que una asociación sea fiable debería: replicarse en poblaciones independientes, basarse en tamaños muestrales grandes, presentar valores de significación bajos, presentar asociaciones que tengan sentido biológicamente, y detectar alelos funcionalmente distintos (mediante ensayos bioquímicos, animales transgénicos...).

El Centro Nacional de Genotipado

Es interesante destacar que la comunidad científica española dispone desde finales de 2003 del Centro Nacional de Genotipado (CeGen, www.cegen.org), una de las plataformas tecnológicas auspiciadas por la Fundación Genoma España, cuyo objetivo es el de proporcionar los elementos de conocimiento y la infraestructura necesaria para realizar proyectos de genotipado de SNPs a gran escala a grupos de investigación en institutos, universidades, hospitales y empresas con la finalidad de conseguir competitividad a nivel internacional. El CeGen está organizado siguiendo una estructura nodal, con tres sedes geográficamente separadas (nodos de Barcelona, Centre de Regulació Genòmica; Madrid, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas; y Santiago de Compostela, Universidade de Santiago de Compostela) y una Estructura Central de coordinación, dirigida por el Dr. Jaume Bertranpetit, y con sede en Barcelona, en la Universitat Pompeu Fabra. El nodo de Santiago de Compostela, dirigido por el Dr. Ángel Carracedo, cuenta con las plataformas MassArray de Sequenom y SNPlex de Applied Biosystems, lo que le da una gran flexibilidad en cuanto al volumen de genotipación de los distintos proyectos.

Como reflexión final, la búsqueda de los factores genéticos de susceptibilidad a enfermedades comunes es el objetivo de una disciplina nueva y en auge, la Medicina Genómica. La identificación de estos factores conducirá a incrementar el conocimiento de los mecanismos de enfermedad, permitiendo la identificación de nuevas dianas farmacológicas (farmacogenómica) y una medicina personalizada, tanto a nivel de diagnóstico como de tratamiento (farmacogenética).

Genética de las Adicciones
Sociedad Española de Toxicomanías



Investigación genética en enfermedades complejas

Dr Javier Costas

Centro Nacional de Genotipado
Grupo de Medicina Xenómica
Universidade de Santiago de Compostela

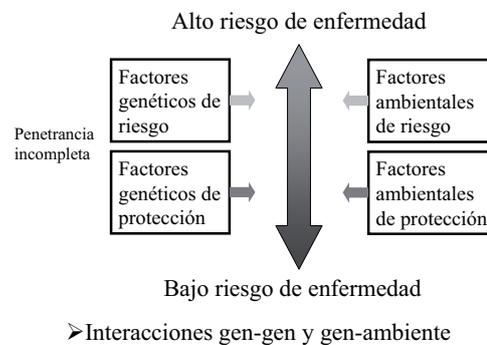


El Proyecto Genoma Humano



- ✓ Primer borrador: febrero 2001
- ✓ Nuevo reto de la genética médica: vulnerabilidad genética a enfermedades complejas

Enfermedades multifactoriales complejas



¿Base genética?

- ✓ Estudios de agregación en familias
 - ✓ Estudios de concordancia en gemelos (monozigóticos vs dizigóticos)
 - ✓ Estudios de adopción
- Heredabilidad proporción de la varianza atribuible a factores genéticos

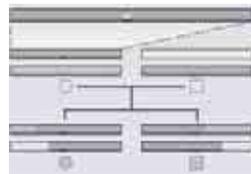
Genética de trastornos psiquiátricos

Patología	Riesgo relativo	Heredabilidad
Trastorno bipolar	7-10	0'60-0'70
Depresión mayor	2-3	0'28-0'40
Pánico	3-8	0'50-0'60
Autismo	50-100	0'90
Esquizofrenia	8-10	0'80-0'84
Abuso de drogas	4-8	0'30-0'50
Trastorno de ansiedad	4-6	0'30-0'40

- Riesgo relativo: proporción de afectados entre familiares de primer grado de pacientes *versus* controles
- Heredabilidad: proporción da varianza atribuible a factores genéticos

Mapeo genético de enfermedades mendelianas

➤ Ligamiento en familias: cosegregación de marcador y enfermedad, según un modelo de herencia (autosómico dominante, autosómico recesivo, ligado al X, ligado al Y)

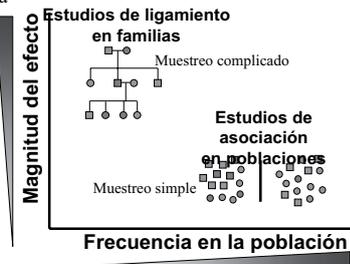


Recombinación

Cardon and Bell, *Nat Rev Genet* 2001

Asociación frente a ligamiento

- ✓ Estudios de asociación, más potencia para detectar genes de efecto modesto (Risch & Merikangas, *Science* 1996)
- ✓ Análisis de ligamiento, robusto frente a heterogeneidad alélica



Estudios de asociación

Hipótesis enfermedad común/variante común

El riesgo genético a padecer enfermedades comunes podría ser generalmente debido a alelos de predisposición que segregasen a frecuencias relativamente elevadas en la población (Lander, *Science* 1996)

Hipótesis alternativa: enfermedad común/variante rara

- ✓ Ej: ApoE4 y Alzheimer, frec ≈10-20%

Diseño caso-control

✓ Muestreo de dos grupos de individuos: individuos afectos no emparentados y controles "sanos" no emparentados

✓ Prueba estadística estándar (χ^2 de Pearson, regresión logística) para contrarar la hipótesis nula de igual frecuencia de alelos (o genotipos) en casos y controles

Cálculo del riesgo: OR (odds ratio)

	Casos	Controles
A1	a	b
A2	c	d

$$OR = \frac{\frac{a}{b}}{\frac{c}{d}} = \frac{ad}{bc}$$

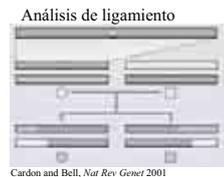
✓ Si $OR < 1$, factor protector

✓ Interpretación no intuitiva, aunque $OR \sim RR$ (riesgo relativo), excepto si la prevalencia o OR altos

✓ Ej: ApoE4 y Alzheimer, $OR = 3.3$

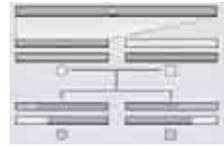
$$IC\ 95\% = \exp(\ln OR \pm 1.96 SE) \quad SE = \left(\frac{1}{a} + \frac{1}{b} + \frac{1}{c} + \frac{1}{d} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Diseño de estudios de asociación



Marcadores moleculares

Análisis de ligamiento



- Microsatélites (Simple tandem repeats, STRs)
- ✓ Repeticiones de secuencias cortas
ACTT CGT CGT CGT CGT CAAT
- ✓ Muy variables

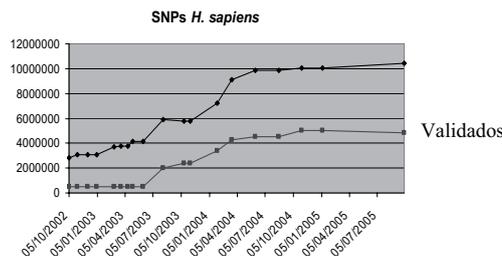
Estudios de asociación



- SNPs (Single nucleotide polymorphisms)
- ✓ Cambios de un nucleótido (frec > 1%)
AAG T TACG
AAG A TACG
- ✓ Muy abundantes (1 SNP/300 bp)
- ✓ Fáciles de analizar a gran escala



Single Nucleotide Polymorphism



Selección de SNPs

Método directo: SNPs funcionales (causales)

Método indirecto: mapeo por disequilibrio de ligamiento (LD)

Desequilibrio de ligamiento (LD)

➤ Presencia conjunta de dos alelos próximos a una frecuencia significativamente distinta a la esperada en función de sus frecuencias individuales

		Marcador 2	
		B	b
Marcador 1	A	$f_{AB} = f_A \cdot f_B + D$	$f_{Ab} = f_A \cdot f_b - D$
	a	$f_{aB} = f_a \cdot f_B - D$	$f_{ab} = f_a \cdot f_b + D$

Problema: depende de las frecuencias

$$D' = D/D_{\max} \quad 0 < D' < 1$$

$$r^2 = D^2 / (f_A \cdot f_a \cdot f_B \cdot f_b) \quad 0 < r^2 < 1$$

Desequilibrio de ligamiento: D' vs r^2

Frecuencias haplotípicas

Frec	D	D'	r^2
A=0,30	0,21	1	1
T=0,30			
B=0,70	0,09	1	0,18
C=0,90	0,03	1	0,05

Zondervan and Cardon, *Nat. Rev. Genet.* 2001

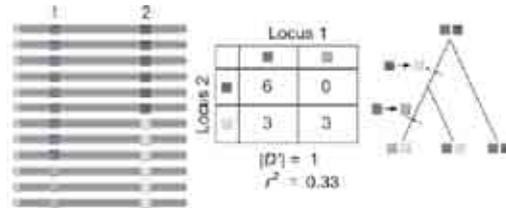
- ✓ Si el alelo de menor frecuencia de un SNP está siempre asociado a uno de los dos alelos del otro SNP, el valor de D' será de 1
- ✓ r^2 sólo será 1 si cada uno de los alelos de un SNP está asociado a un único alelo del otro SNP (mismas frecuencias)
- ⇒ r^2 es una medida más restrictiva que D'

Origen del LD

Flint-Garcia SA, Thornsberry JM, Buckler ES 4th. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003;54:357-74.

- ✓ Ausencia de recombinación
- ✓ Misma historia mutacional

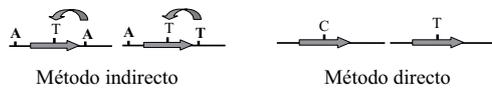
Origen del LD



Flint-García SA, Thornsberry JM, Buckler ES 4th. Annu Rev Plant Biol. 2003;54:357-74.

- ✓ Ausencia de recombinación
- ✓ Mutación en diferentes linajes

Mapeo por LD vs SNPs funcionales

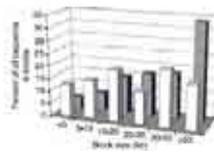
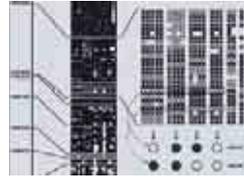


- ✓ Mapeo por LD: no precisa conocimiento previo sobre la funcionalidad del SNP
- ✓ Permite analizar variantes funcionales, aunque no sean conocidas
- ✓ Menor potencia que el método directo, a no ser que el LD sea perfecto
- ✓ Generalmente, se requieren más SNPs/gen. Por tanto, la estrategia funcional permite analizar más genes, aunque menos exhaustivamente

Blocks of Limited Haplotype Diversity Revealed by High-Resolution Scanning of Human Chromosome 21

Nita Ferré, Anthony J. Barna, David A. Hinds, Wade A. Barrett, Jigna M. Doshi, Colleen B. Haecker, Curtis B. Knicker, Danyu H. Lee, Claire Marjoram, David P. McDermott, Rick T. H. Nguyen, Michael C. Havril, John B. Shalhoub, Naiping Shen, David Stern, Ramon F. Stokowski, Daryl J. Thomas, Mark O. Troberson, Kanan R. Vyas, Kelly A. Frazer, Stephen P. A. Fodor, David R. Cox*

SCIENCE VOL 294 23 NOVEMBER 2001



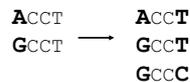
The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome

Stacey B. Gabriel, Stephen F. Schaffner, Huy Nguyen, Jamie M. Moore, Jessica Roy, Brendan Blumenstiel, John Higgins, Matthew Dufelice, Amy Lochner, Haara Faggart, Shao Nuan Liu-Cordero, Charles Sorin, Adhonorale Adeyemo, Richard Cooper, Ryk Ward, Eric S. Lander, Mark J. Daly, David Altshuler

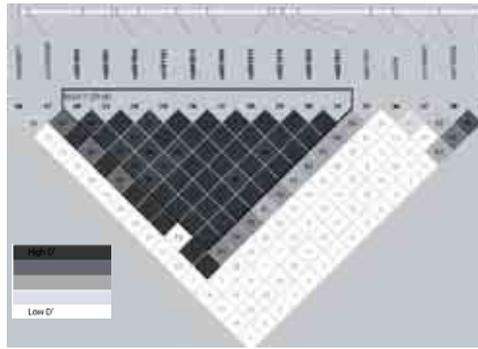
SCIENCE VOL 296 21 JUNE 2002

Bloques haplotípicos

- ✓ Regiones del genoma humano con baja diversidad haplotípica y alto LD
- ✓ Definición:
 - Diversidad haplotípica
 - LD
 - Prueba de los 4 gametos (⇒ recombinación)



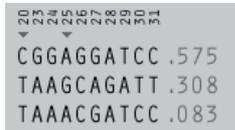
Bloques haplotípicos: LD



Software: Haploview

Bloques haplotípicos

Haplotipos > 1%



Bloque: 10 SNPs

- ✓ Si hay recombinación: $2^N = 1024$ haplotipos
- ✓ Sin recombinación: $N + 1 = 11$ haplotipos

Software: Haploview

International HapMap Project

- ✓ Desarrollar un mapa haplotípico del genoma humano
- ✓ Información disponible públicamente
<http://www.hapmap.org/index.html.en>
- ✓ Muestras de 4 poblaciones representativas:
 - ✓ CEU: 30 trios de residentes en Utah con ascendencia en norte y oeste de Europa (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, 1980)
 - ✓ CHB: 45 chinos Han de Pekín
 - ✓ JPT: 45 japoneses de Tokio
 - ✓ YRI: 30 trios de Yoruba de Ibadan (Nigeria)

International HapMap Project

Fase I finalizada: densidad 1 SNP/5Kb

Populations	CEU	CHB	JPT	YRI
Genotyped SNPs	1,105,072	1,088,689	1,088,426	1,076,451

Fase II: incrementar densidad de SNPs en las regiones con poco LD

Populations	CEU	CHB	JPT	YRI
Total QC+ SNPs	3,901,408	3,903,524	3,902,623	3,806,920
Total Genotyped SNPs	5,894,684	5,812,990	5,812,990	5,857,466

- ✓ Selección apropiada de SNPs (tagSNPs) para realizar estudios de asociación mediante mapeo por LD
- Facilitar el descubrimiento de variantes de susceptibilidad a enfermedades comunes

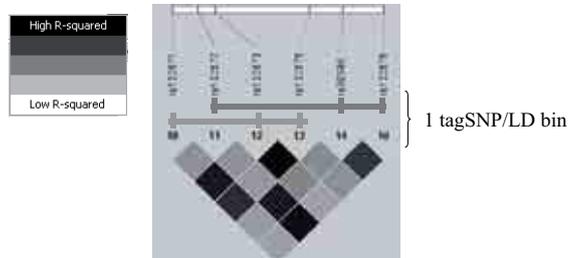
Selección SNPs para mapeo por LD: LD útil

✓El incremento del tamaño muestral preciso para mantener la potencia en un estudio de asociación caso-control es inversamente proporcional a r^2

Ej: Si se precisan 1000 casos/controles asumiendo que genotipamos el SNP causal, se precisarán 2000 casos/controles usando un marcador con $r^2 = 0,5$

Selección SNPs para mapeo por LD: r^2

“LD bins”: conjunto de SNPs, no necesariamente consecutivos, que presentan una r^2 elevada entre ellos



Software: Tagger (Haploview)

PROBLEMAS DE LOS ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

- ✓Una parte importante de las supuestas asociaciones iniciales no son reproducibles
- ✓Revisión (Hirschhorn et al, *Genet Med* 2002): de 166 estudios (> 2 publicaciones), 97 observados de nuevo. Sólo 6 reproducidos en el 75% de los estudios
- ✓La variabilidad en la significación estadística de los estudios de replicación no es controvertida, sino que es un hecho esperado del contraste de hipótesis en muestras finitas

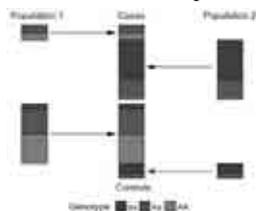
Causas de la irreproducibilidad

- Errores de tipo I (falsos positivos)
 - Azar
 - ✓ Sesgo en la publicación
 - ✓ Múltiples comparaciones, subgrupos *ad-hoc*
 - Estratificación poblacional
 - ✓ Diferente prevalencia entre poblaciones y diferentes frecuencias alélicas entre poblaciones
 - ✓ Emparejamiento de casos y controles, pruebas basadas en familias (TDT), detección y corrección de la estratificación (muestreo de marcadores neutros)
 - Errores de genotipación

Causas de la irreproducibilidad

- Errores de tipo I (falsos positivos)

- Azar
 - ✓ Sesgo en la publicación
 - ✓ Múltiples comparaciones, subgrupos *ad-hoc*
- Estratificación poblacional



- ✓ Diferente prevalencia entre poblaciones
- ✓ Diferentes frecuencias alélicas entre poblaciones

Marchini et al. 2004. Nat. Genet. 36:512

Causas de la irreproducibilidad

- Errores de tipo I (falsos positivos)

- Azar
 - ✓ Sesgo en la publicación
 - ✓ Múltiples comparaciones, subgrupos *ad-hoc*
- Estratificación poblacional
 - ✓ Diferente prevalencia entre poblaciones y diferentes frecuencias alélicas entre poblaciones
 - ✓ Emparejamiento de casos y controles, pruebas basadas en familias (TDT), detección y corrección de la estratificación (muestreo de marcadores neutros)
- Errores de genotipación

Causas de la irreproducibilidad

- Errores de tipo II (falsos negativos)

- Baja potencia de la prueba estadística
 - ✓ Tamaño muestral insuficiente → cálculo de la potencia de la prueba estadística *a priori*
 - ✓ Non tener en cuenta que el efecto estimado del alelo en el estudio inicial es, generalmente una sobreestima del efecto real
- Clasificación incorrecta del fenotipo
 - ✓ Heterogeneidad del carácter, existencia de fenocopias
 - ✓ Diagnóstico estandarizado, fenotipos intermedios (endofenotipos)
 - o Asociado con la enfermedad
 - o Presente en familiares no afectados a mayor frecuencia que en la población general

Causas de la irreproducibilidad

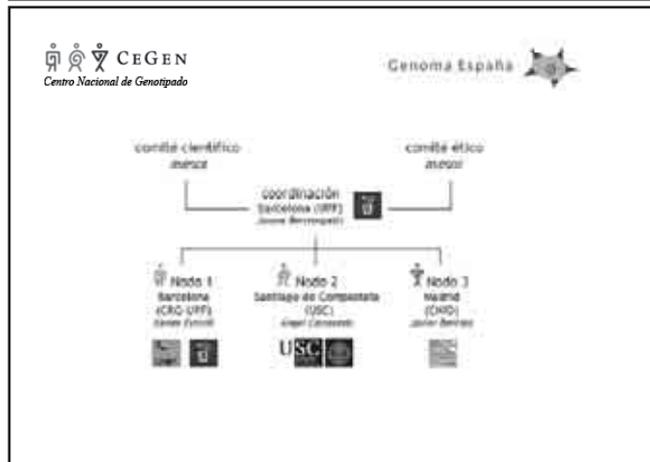
- Diferencias reales entre poblaciones

- Heterogeneidad alélica o génica
- Diferencias en riesgo genético
- Diferencias en el patrón de LD
- ✓ Debidas a la historia evolutiva de las distintas poblaciones (selección, deriva, migración...)
- ✓ La selección adaptativa es el factor que más drásticamente puede generar diferencias reales entre poblaciones en un corto periodo de tiempo
- ✓ Grandes cambios ambientales en un periodo evolutivo reciente

Causas de la irreproducibilidad

Conclusiones

- ✓ Muchos de los problemas asociados a la no replicación de asociaciones son debidos a problemas de diseño
- ✓ Para que una asociación sea fiable debería:
 - Replicarse en poblaciones independientes
 - Basarse en tamaños muestrales grandes
 - Presentar valores de significación bajos
 - Presentar asociaciones que tengan sentido biológicamente
 - Detectar alelos funcionalmente distintos (ensayos bioquímicos, animales transgénicos...)



Genotipación de SNPs

Tecnología MassArray de Sequenom

Tecnología SNPlex de Applied Biosystems

Medicina genómica

- Incrementar conocimiento de los mecanismos de la enfermedad compleja
- Medicina personalizada
 - Diagnóstico
 - Tratamiento

**PARTE II. MESA DE DEBATE Y REFLEXIÓN:
CONTRIBUCIÓN DE LA GENÉTICA A LA ETIOLOGÍA DE LAS
ADICCIONES**

Modera:

D. Javier Ballesteros.
Departamento Neurociencias.
Universidad del País Vasco.

Aportaciones de la genética y la genómica al estudio de los trastornos adictivos.

David Arteta
PROGENIKA Biopharma S.A.

**Cannabis y Esquizofrenia: un modelo para la comprensión de la interacción
genes ambiente.**

Araceli Rosa de la Cruz
Unidad de Antropología. Facultat de Biologia.
Universidad de Barcelona.

Aportaciones de la genómica y la proteómica al estudio de los trastornos adictivos

David Arteta
PROGENIKA Biopharma S.A

Muchas gracias por la invitación a la Sociedad Española de Toxicomanías. Bueno yo os voy a explicar brevemente como funciona la técnica de los microarrays de DNA y qué aportaciones está encontrando en el estudio de los trastornos adictivos.

Primero me gustaría dejar claros unos conceptos para saber a qué nivel estamos trabajando. Como ya hemos oído innumerables veces en los medios de comunicación todas las células del cuerpo humano tienen el mismo código genético, y al conjunto de los genes se les llama el genoma. La comparación del perfil genético entre individuos se hace a dos niveles; el primero de ellos sería a nivel de DNA en el que estudiaríamos mutaciones y SNPs de los que ya hemos oído hablar. El segundo nivel es el RNA, en donde nos interesamos en las diferencias de expresión génica. A partir del genoma y mediante el proceso de transcripción, los genes que se expresen en determinado momento en una determinada situación, se transcribirán a RNA mensajero, constituyendo lo que se llama el transcriptoma. Y es el transcriptoma el que nos da información de qué genes están participando en los estados patológicos que nos interesan. Comentar brevemente, que el RNA mensajero se traduce para obtener la información necesaria para la producción de las proteínas funcionales, en lo que se denomina el proteoma.

Los estudios genéticos clásicos se basan en experiencias y en resultados bibliográficos y experimentales y entonces mediante la selección de un grupo pequeño de genes, van a proceder al rastreo de algún mecanismo funcional que esté alterado en los trastornos que estamos estudiando. Lo que nos permite la genómica es, partiendo de hipótesis más generales, hacer un estudio de la totalidad del transcriptoma que nos da una visión global de los procesos implicados en el fenómeno de interés. Por eso la cantidad de resultados que se obtiene es mucho mayor y son necesarias herramientas informáticas para su análisis.

Como ya he comentado las hipótesis de trabajo son más generales, preguntas como ¿qué es lo que ocurre en el cerebro de un adicto a cocaína? son preguntas muy comunes. Como se ve en esta revisión que esta basada en el estudio del alcoholismo, pero que se puede generalizar para las demás adicciones, los modelos de trabajo parten de la existencia de una sustancia de abuso, que en determinado momento puede hacer que una persona o un animal comience a abusar del mismo, produciendo una serie de desajustes neuroquímicos. Con las herramientas a disposición de las distintas ómicas, como la genómica, proteómica,

podemos obtener cantidad de información acerca de estos procesos, incluso en algunos casos nos podría permitir crear herramientas de diagnóstico y pronóstico. A lo largo de todo el proceso es muy importante la utilización de herramientas informáticas debido a la cantidad de datos que se generan.

Una de las herramientas más utilizadas en el estudio del transcriptoma son los microarrays (ya hemos oído hablar esta mañana acerca de varios tipos de microarrays como son los arrays de CGH o los arrays de SNPs. En este caso hablamos de los microarrays de oligonucleótidos. En su superficie se hallan impresas miles de secuencias de DNA. Lo más novedoso de esta tecnología es que en un espacio muy reducido, se condensan gran cantidad de sondas y mediante la utilización de una pequeña cantidad de muestra podemos analizar de una vez todo el transcriptoma que estemos estudiando. Las sondas son secuencias de DNA que representan a un gen. Las sondas de oligonucleótidos son sintetizadas a medida se unen al soporte sólido de silicio. La robótica juega un papel fundamental. Las sondas están distribuidas en forma de Probe Sets. Un Probe set es un conjunto de sondas diseñadas para detectar la secuencia diana. Cada set está formado por un conjunto de sondas diseñadas para ser perfectamente complementarias a una secuencia determinada, que son las sondas llamadas Perfect match, y un conjunto de sondas diseñadas para ser complementarias a la misma secuencia que la sonda PM excepto por un nucleótido y se llaman Mismatch. Estas sondas sirven como control de las hibridaciones inespecíficas. A partir de estos resultados, el software calcula el funcionamiento de las sondas a partir de las intensidades de las celdas y se comparan las diferencias de intensidad entre las celdas PM y MM. Estos valores son utilizados para determinar el significado biológico de los resultados, como la presencia o ausencia de transcritos de un determinado gen.

La técnica de los arrays se basa en la hibridación, el chip se hibridará con la muestra de RNA que queremos analizar. El RNA hibridará con su respectiva sonda siempre y cuando el RNA esté presente. Este RNA como está marcado con un fluoróforo, hará que cuando hibride, produzca una fluorescencia que puede ser detectada por medio de un láser. La expresión diferencial de genes se analiza escaneando los arrays hibridados con el láser, produciendo unas imágenes que se estudian para calcular los niveles de expresión relativos para cada gen e identificar genes expresados diferencialmente. El protocolo de marcaje de las muestras es sencillo, y consiste en una serie de transcripciones y retrotranscripciones junto con el marcaje de los transcritos expresados con un fluoróforo.

Esta revisión de Bunney y colaboradores nos muestra las distintas etapas que estarían englobadas dentro de un análisis genómico completo con el objetivo de encontrar genes candidatos de enfermedades psiquiátricas. Se puede dividir en varios grupos; el primer paso sería el procesamiento de las muestras y de los arrays. Un segundo grupo engloba el análisis de los resultados que obtenemos mediante técnicas estadísticas y bioinformáticas. Como tercer paso haríamos una validación de los resultados. Posteriormente se realiza también una validación a nivel animal, mediante la utilización de modelos, y que también serviría para producir y validar nuevos modelos a partir de los resultados obtenidos. Por último deberíamos establecer la causalidad de los hallazgos.

Probablemente el paso más importante de todo el proceso sea la adquisición de las muestras de trabajo. Estas muestras han de ser seleccionadas de manera rigurosa según los parámetros que queramos estudiar. Los historiales de los pacientes a estudiar deben estar lo más detallados posible. De esta manera, una vez seleccionadas las muestras, éstas han de almacenarse correctamente para su posterior uso en la obtención del material genético.

Otro paso clave es comprobar que la calidad del material obtenido es óptima para este tipo de experimentos, mediante la inspección con técnicas de electroforesis en geles de agarosa.

Como ya he explicado anteriormente, una vez que el RNA se ha extraído se siguen los métodos de síntesis, marcaje e hibridación en los chips utilizando las estaciones de hibridación y lavado, y mediante el escáner, se obtiene los datos de expresión para ser analizados con las herramientas bioinformáticas.

A partir de los chips se obtiene una gran cantidad de datos de expresión que ha de estudiarse con el objetivo de obtener conclusiones biológicas. Como ya he comentado anteriormente, es muy importante la utilización de herramientas bioinformáticas porque la cantidad de datos que se obtienen es enorme. Como ejemplo, los resultados que se pueden obtener en un estudio de comparación entre sujetos alcohólicos y no alcohólicos. Podemos obtener los perfiles de expresión sujetos alcohólicos y no-alcohólicos. También nos permitiría en algunos casos poder discernir si una muestra viene de un grupo de sujetos alcohólicos o de un grupo de sujetos no-alcohólicos.

Otro ejemplo de un análisis de expresión sería la obtención de un listado de genes implicados en los procesos que estamos estudiando. La obtención de información biológica a partir de cientos de genes se hace prácticamente imposible. Las herramientas bioinformáticas también nos permiten a partir de estos resultados realizar estudios de grupos funcionales que nos faciliten el trabajo y la obtención de conclusiones biológicas, mediante la detección del enriquecimiento significativo de alguno de estos grupos. Como podemos ver aquí en este gráfico en el que hemos agrupado los genes en grupos como por ejemplo genes de unión a ADN, o genes de metabolismo.

De cualquier manera, no es oro todo lo que reluce y como se ve reflejado en este artículo los experimentos con microarrays tienen también problemas como pueden ser la heterogeneidad de las muestras, un problema importantísimo en estudios en humano, o la integridad del RNA mensajero. También son importantes los falsos positivos que ya se han comentado también esta mañana debidos a la cantidad de comparaciones que se hacen, entre 30.000 y 50.000. Pero éste no es el caso de todos los experimentos que se hacen con microarrays porque, por ejemplo, en este estudio comparativo en el que se comparan células obtenidas de melanomas vemos como, si las muestras están bien tipificadas, generalmente la variabilidad de las muestras no es tan grande como la variabilidad que podamos encontrar en estudios, por ejemplo, del sistema nervioso central en pacientes diagnosticados con Alzheimer. Además como se puede apreciar, la magnitud del cambio en expresión es mucho más notable en muestras de cáncer. Hoy por hoy, los avances en las tecnologías de experimentación nos están permitiendo reducir esa variabilidad como es el caso de la extracción de células únicas a partir de técnicas de microdissección por láser, en la que podemos obtener células individuales y obtener así un grupo homogéneo de células en las que estudiar nuestro modelo patológico; hoy por hoy se pueden hacer chips a partir de una única célula.

El siguiente paso que se indica en la revisión de Bunney y colaboradores sería una vez obtenidos los resultados de los arrays comprobar si existe una co-expresión entre los genes que nos indique que esos genes verdaderamente están funcionando a la vez y creando una situación patológica. También, en algunos casos, nos permitiría inferir la función de algunos genes desconocidos, mediante un proceso que se ha denominado "culpabilidad por asociación". Les muestro aquí otro ejemplo bastante completo en el que

se ve perfectamente cómo el perfil de expresión de un grupo de muestras control es diferente al perfil de expresión de un grupo de muestras patológicas. Una vez más se hacen estudios funcionales de los genes resultantes dividiéndolos en grupos para facilitar el posterior análisis y la obtención de conclusiones.

Tenemos que tener en cuenta que la técnica de los microarrays es una técnica exploratoria, y por tanto todos los resultados han de ser validados. Una de las técnicas más utilizadas para la validación de resultados a nivel de RNA sería la PCR cuantitativa. Y aquí les muestro unos resultados del grupo del Profesor Meana en cerebro humano post-mortem en el que aun apreciando también esa variabilidad que les he comentado entre distintos pacientes, se sigue viendo una tendencia general de estos genes a estar diferencialmente expresados entre el grupo experimental y el control.

Para presentarles algunos resultados de los estudios que existen en la actualidad en cerebro humano, podemos ver que para el abuso de cocaína, por ejemplo, se han reconocido proteínas específicas de Glia y de formación de mielina como pueda ser la proteína básica de mielina, y en estudios de abuso de alcohol, aparte del ejemplo que ya les he mostrado anteriormente, se han encontrado por ejemplo genes codificadores de proteínas mitocondriales como citocromos, enzimas implicadas en metabolismos energéticos y genes implicados en formación de mielina, como la lipoproteína D.

¿Qué ocurre con las dianas clásicas tan estudiadas mediante técnicas neuroquímicas clásicas, como puedan ser receptores y transportadores de monaminas, receptores opioides, acetilcolina? Pues que muchos experimentos no pueden reproducir estos resultados y en muchos casos estos genes se nos escapan. Una de las posibles razones es que sean falsos negativos, debido a que el número de muestras que estamos analizando no sea lo suficientemente grande, y por tanto estamos perdiendo información. Puede ser también porque la expresión a nivel de Sistema Nervioso Central es tan baja en algunos casos que estamos llegando a los límites de detección de la tecnología.

Posteriormente, tenemos que comprobar que efectivamente un cambio en la expresión de un gen supone un cambio funcional a nivel proteico. Otro de los análisis a nivel genómico, y que ya ha sido comentado por algunos ponentes a lo largo de esta mañana, es el estudio de sitios calientes en cromosomas y SNPs, que indiquen una vulnerabilidad a la enfermedad, como es el caso en el que encuentran varios SNP que indicarían vulnerabilidad a la adicción.

Como ya he comentado, las validaciones son un paso muy importante en estos experimentos y una validación a nivel de proteína se realizaría mediante técnicas de Western blot o técnicas de inmunohistoquímica que confirmaría que nuestra diferencia en expresión génica efectivamente supone un cambio en la expresión de proteína y su actividad funcional. Como les muestro en este ejemplo de abuso de cocaína, un ejemplo muy completo, a partir de los resultados con microarrays hacen una validación con técnicas de PCR y vemos que existe correlación en algunos resultados y no en otros, y posteriormente hacen una validación de proteínas utilizando técnicas de inmunohistoquímica.

En muchas ocasiones es muy difícil obtener muestras humanas para el estudio de estas patologías, y entonces los modelos animales se hacen muy importantes. En el estudio de abuso de sustancias, los estudios en modelos animales de las adicciones son más numerosos que en cerebro humano post-mortem, y los resultados nos pueden dar una idea de qué es lo que sucede en el cerebro humano. Existen varios tipos de modelos animales, modelos que a su vez permiten validar los resultados obtenidos en cerebro humano. Así les muestro

un par de estudios, el primero, un ejemplo de un análisis muy completo como ya hemos comentado, con una validación a nivel funcional de algunas proteínas tras el tratamiento con THC. Otro ejemplo muy bonito es el del grupo de Jean-Luc Dreyer, en el que mediante técnicas de RNA de interferencia bloquean el gen CD81, y en los posteriores estudios comportamentales tras tratamiento con cocaína, comprueban que el silenciamiento de este gen hace que las actividad locomotora de estos animales se reduzca.

Por último, después de todo este proceso, podríamos establecer la causalidad en la enfermedad estudiada del cambio observado. Es importante también que los resultados sean validados por otros grupos, ya que estamos trabajando en grupos de sujetos bastante pequeños, y puede que haya diferencias en poblaciones.

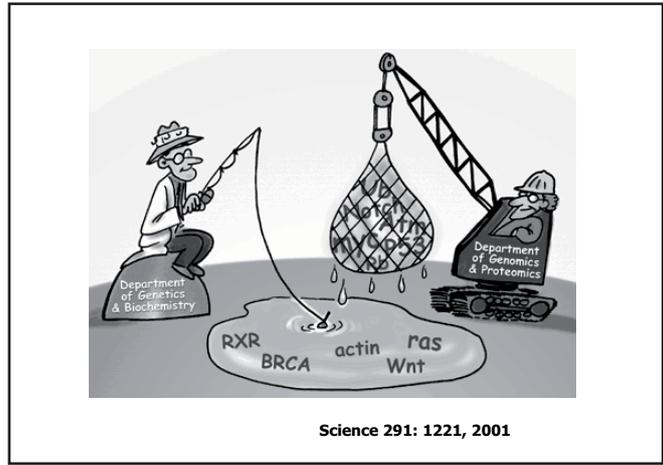
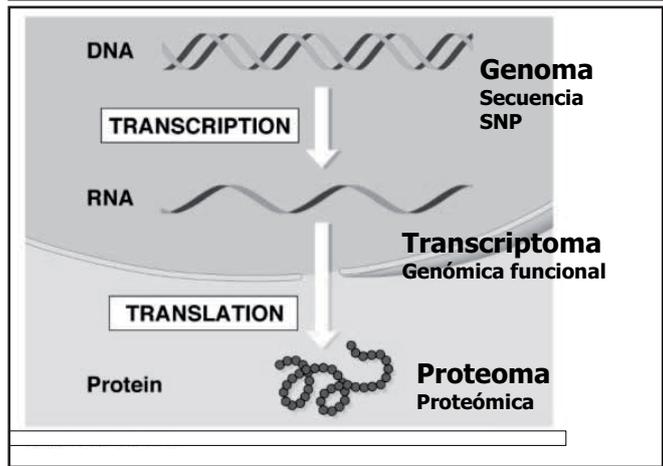
Para acabar, voy a presentar brevemente unas imágenes que muestran lo que un análisis a nivel del proteoma puede aportar al estudio de estas enfermedades psiquiátricas. Con las técnicas de proteómica podemos obtener un mapa de lo que ocurre a nivel proteico en un cerebro patológico y en uno normal, a partir del cual se pueden seleccionar los spots o proteínas que nos interesen y que pueden ser identificados mediante digestiones y técnicas de espectrometría.

En esta imagen se puede observar perfectamente cómo la expresión de estos tres spots en muestras de cerebro de sujetos alcohólicos es menor que en el cerebro de los controles. Por último enseñarles una revisión de estudios neuroproteómicos, que sería paralela a la revisión de Bunney, en las que se muestran todos los pasos necesarios para hacer un estudio completo de proteómica. y demuestran la validez de estas aproximaciones en los estudios de adicción a drogas. Muchas gracias.

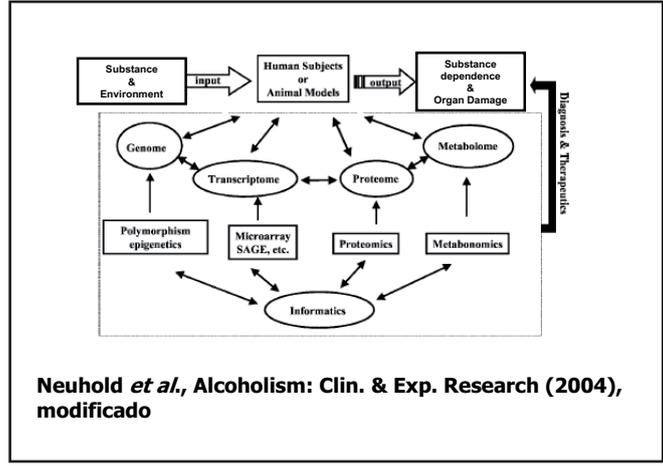


Aportaciones de la genómica y la proteómica al estudio de los trastornos adictivos

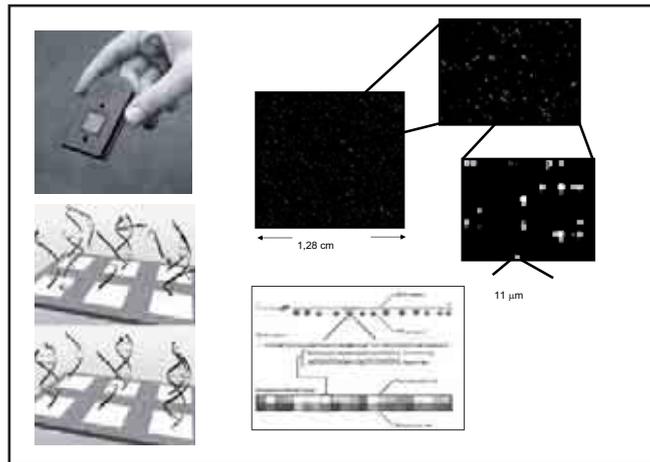
Madrid, 2006



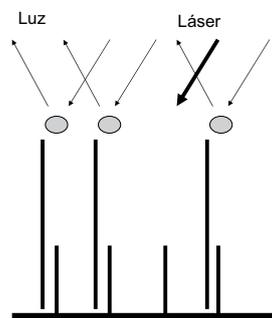
Science 291: 1221, 2001



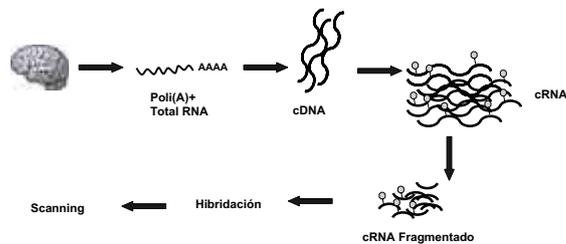
Neuhold *et al.*, Alcoholism: Clin. & Exp. Research (2004), modificado



HIBRIDACIÓN: ES LA CLAVE



PROTOCOLO GENECHIP



Etapas en el proceso de búsqueda de genes candidatos de vulnerabilidad para enfermedades psiquiátricas mediante la utilización de la tecnología DNA-chip

(Bunney et al, Am J Psychiatry 2003; 160: 657-666)

- 1.- Adquisición de muestras de casos y controles
- 2.- Procesado y almacenamiento
- 3.- Disección de regiones cerebrales
- 4.- Extracción del RNA y DNA del tejido
- 5.- Evaluación de la integridad del RNA
- 6.- Preparación de arrays y muestras
- 7.- Incubación; obtención de datos
- 8.- Análisis bioinformático y estadístico de la expresión
- 9.- Análisis de co-expresión en función de significación biológica
- 10.- Validación molecular mediante PCR cuantitativa
- 11.- Determinación de la significación funcional de cada gen
- 12.- Evaluar los hallazgos en función de su localización cromosómica y la información disponible. Búsqueda de SNPs
- 13.- Validación funcional de las proteínas codificadas
- 14.- Modelos animales: transgénicos, KO, iRNA,
- 15.- Establecimiento de la causalidad de los hallazgos

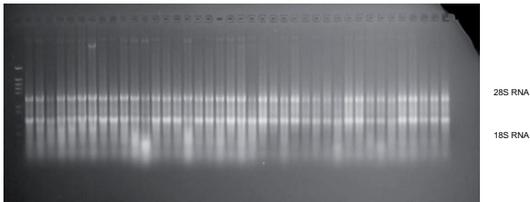
1.- Adquisición de muestras de casos y controles

2.- Procesado y almacenamiento

3.- Disección de regiones cerebrales

4.- Extracción del RNA y DNA del tejido

5.- Evaluación de la integridad del RNA



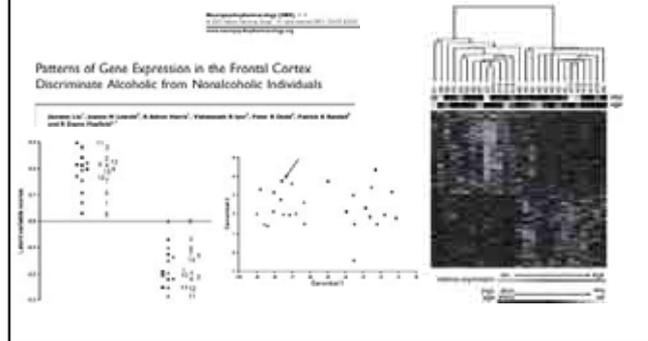
6.- Preparación de arrays y muestras

7.- Incubación; obtención de datos

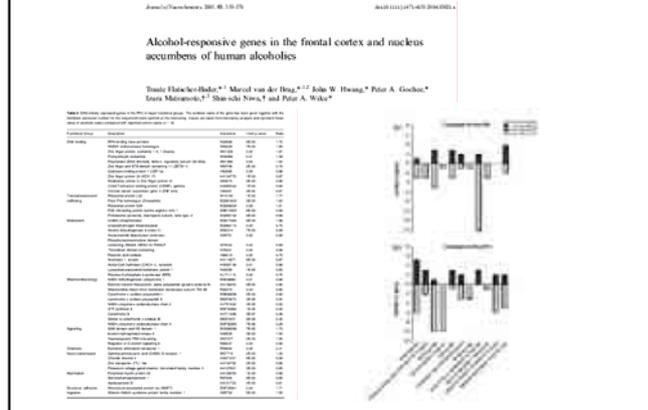


GENECHIP FLUIDICS STATION HYBRIDIZATION OVEN 640 GENECHIP™ SCANNER

8.- Análisis bioinformático y estadístico de la expresión diferencial entre casos y controles; listado de genes alterados



Dorsolateral Prefrontal Cortex and Nucleus Accumbens analysis



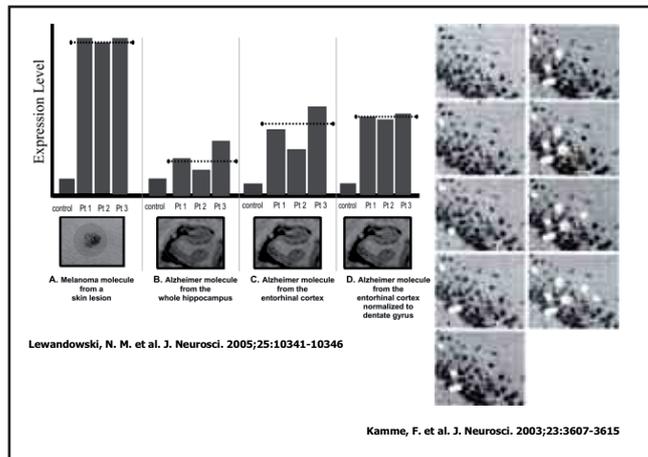
The Journal of Neuroscience, November 9, 2005 • 25(45):10341–10346 • 10341

Brain Microarray: Finding Needles in Molecular Haystacks

Nicole M. Lewandowski and Scott A. Small
 The Taub Institute for Research on Alzheimer's Disease and the Aging Brain, Department of Neurology, and Center for Neurobiology and Behavior, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, New York 10032

Key words: entorhinal; gene; mRNA; dentate gyrus; IMR; Alzheimer's disease

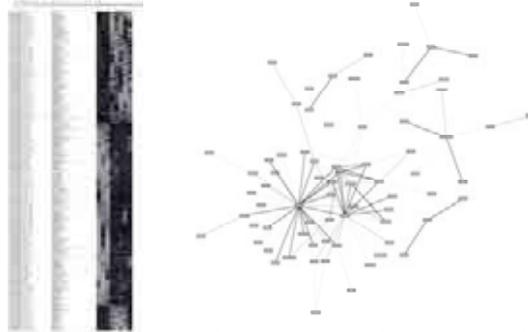
Heterogeneidad de las muestras
Integridad del RNAm
Heterogeneidad celular
Relevancia biológica
Falsos positivos



Lewandowski, N. M. et al. J. Neurosci. 2005;25:10341-10346

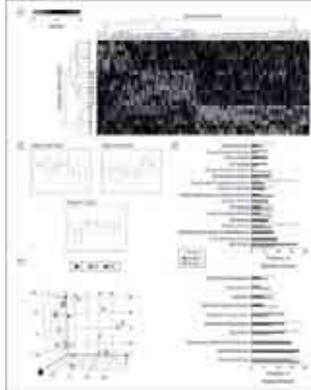
Kamme, F. et al. J. Neurosci. 2003;23:3607-3615

9.- Análisis de co-expresión en función de significación biológica



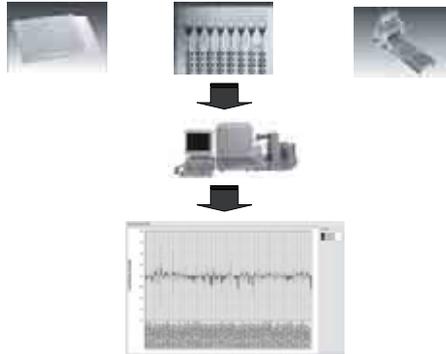
(Lee et al. Genome Research 2004; 14: 1085-1094)

Dorsolateral prefrontal cortex (Brodmann area [BA] 8/9) analysis

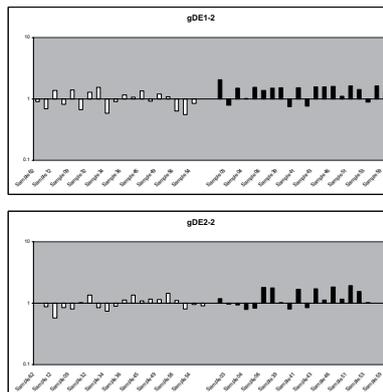


Sequeira, A. et al. Arch Gen Psychiatry 2006;63:35-48.

10.- Validación molecular mediante PCR cuantitativa



10.- Validación molecular mediante PCR cuantitativa



Resultados generales de genes en abuso de cocaína

Proteínas específicas de la glía y de formación de mielina (MBP, PLP, MOBP)

Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin

Diana N. Adamec¹, Sarah Prasad², Carl J. Schmidt¹, Donald M. Kuhn¹, Gregory Kapur¹ and Michael J. Barron^{1,2}

Resultados generales de genes en abuso de alcohol

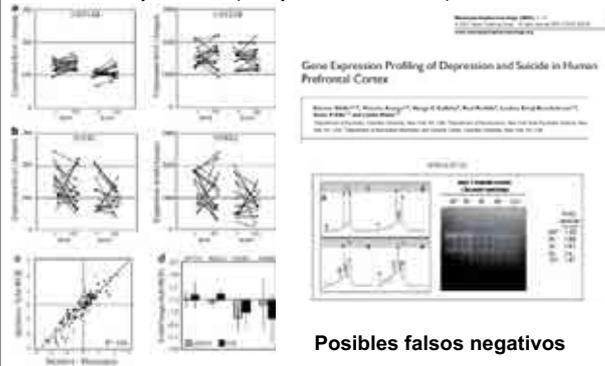
Genes codificadores de proteínas mitocondriales (Citocromos, enzimas implicadas en metabolismos energéticos) y de formación de mielina (ApoD, PMP22, SPP1)

Alcohol-responsive genes in the frontal cortex and nucleus accumbens of human alcoholics

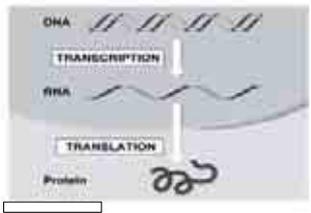
Thomas Fritschy-Buden¹, Marcel van der Bree^{1,2}, John W. Hwang³, Peter A. Goheen⁴, Lena Maccioni¹, Shin-ichi Nawa¹ and Peter A. Wolf¹

¿Qué ocurre con las dianas clásicas?

Receptores y transportadores de monoaminas, opioides, receptores GABA, receptores cannabinoides, Acetilcolina ...



11.- Determinación de la significación funcional de cada gen candidato



12.- Evaluar los hallazgos en función de su localización cromosómica y la información disponible. Búsqueda de SNPs



13.- Validación funcional de las proteínas codificadas

Journal of Neuroscience, 2004, 24, 1131-1134

Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin

Darin N. Absher,^{1*} Ruth Preuss,^{1*} Carl J. Schmidt,² Donald M. Kahn,^{1,2} Gregory Kapatos,¹ and Michael J. Stanton,^{1,2} †

¹Department of Psychiatry and Behavioral Neuroscience, Washington University School of Medicine and Center for Genome Sciences and Policy, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri 63110

14.- Modelos animales: transgénicos, KO, iRNA,

Journal of Neuroscience, 2004, 24, 1131-1134

DNA Microarray Analysis of Cannabinoid Signaling in Mouse Brain in Vivo

SONG P, PARKER-GATEVA, KURLAN, LIN, HE, KAO, GU, WANG, and DAVID, A. SPRENGER

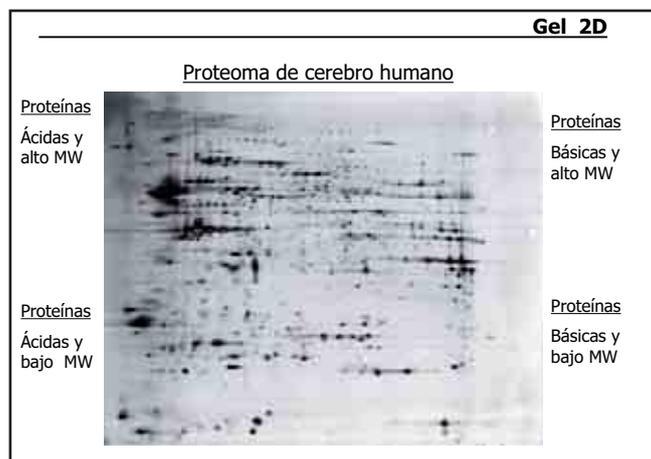
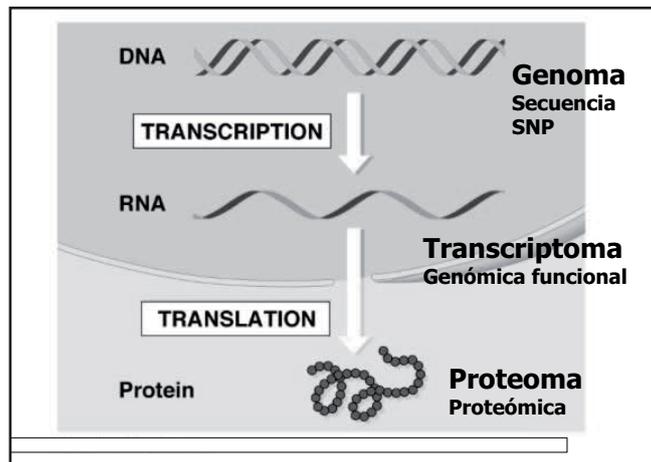
14.- Modelos animales: transgénicos, KO, iRNA,

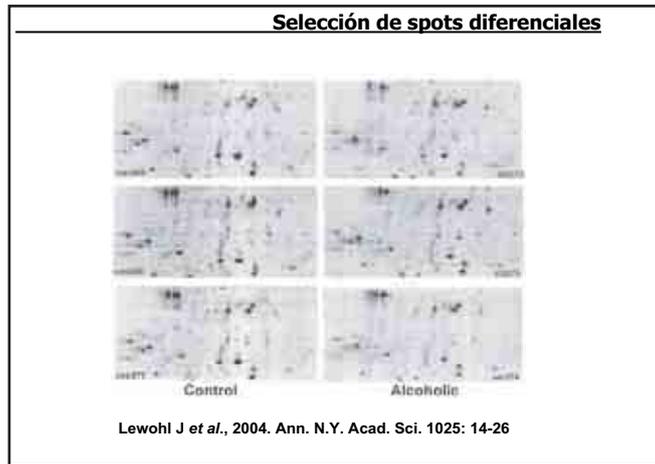
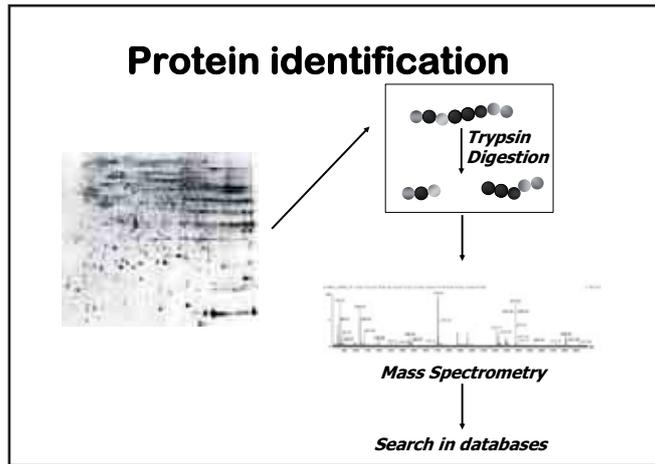
Journal of Neuroscience, 2004, 24, 1131-1134

In vivo gene silencing of CD81 by lentiviral expression of small interference RNAs suppresses cocaine-induced behaviour

Amine Habi, Frédéric Boyer, Manoj Kulkarni and Jean-Luc Dreyer

Institute of Biochemistry, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland





Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT[®]

NEURO
SCIENCE

Recent advances in neuroproteomics and potential application to studies of drug addiction

Kenneth Williams^a, Terence Wu^b, Christopher Colangelo^a, Angus C. Neay^{b,c}

^aDepartment of Molecular Pharmacology and Biochemistry, Mount Sinai JIC Molecular Medicine, P4B, P-100, School of Medicine, 270 University Avenue, New York, NY 10029, USA

^bDepartment of Psychiatry, P4B, P-100, School of Medicine, 14 East 64th Street, New York, NY 10021, USA

Cannabis y esquizofrenia: un modelo para la comprensión de la interacción genes-ambiente (GxE)

**Araceli Rosa De la Cruz.
Unidad de Antropología.
Facultat de Biologia. Universidad de Barcelona.**

En primer lugar quisiera dar las gracias a la organización por habernos invitado a participar y presentar nuestros resultados, en esta jornada cuyo programa nos pareció muy atractivo desde el principio.

La esquizofrenia es una enfermedad compleja a todos los niveles. En primer lugar es complicada para el paciente que en un momento vital y temprano de su vida empieza a sufrir una serie de síntomas que le van a dificultar una vida normal. También es compleja y dura para los familiares que sufren los síntomas de la enfermedad en sus seres queridos día a día. A nivel clínico, los psiquiatras aquí presentes pueden confirmar, como los síntomas que sufre un mismo paciente a lo largo de su vida son, en muchos casos, de curso episódico y con gran variabilidad en la manifestación de los síntomas a lo largo de la vida del paciente y entre pacientes con el mismo diagnóstico.

Bleuler, hace más de 50 años en sus primeras definiciones de la esquizofrenia ya intuyó su heterogeneidad y complejidad en la siguiente frase: "Llamo a la demencia precoz esquizofrenia. Uso la palabra en singular aunque es aparente que el grupo incluye diversos trastornos... sin embargo, no hemos sido capaces de encontrar ninguna línea natural de división en su clínica... la subdivisión del subgrupo de esquizofrenias es una tarea para el futuro". Con esta frase nos pasó el testigo a las generaciones futuras dedicadas a la investigación de la esquizofrenia desde diferentes disciplinas y probablemente nos dió la pauta para conseguir algunos resultados en la comprensión del trastorno.

Desde un punto de vista epidemiológico la esquizofrenia no es una enfermedad excepcional en las poblaciones humanas, sino un fenómeno descrito en todas las culturas y sociedades, con prevalencias no inferiores al 1%. La enfermedad afecta a hombres y mujeres jóvenes, quienes raramente se casan o tienen descendencia, sin embargo, pese a la baja fertilidad de los enfermos, la prevalencia del trastorno parece haberse mantenido estable a lo largo de los años. Este dato unido a la evidencia de que entre la población general es posible detectar un amplio rango (entre 4 y 17%) de experiencias psicóticas, debería hacernos pensar que los factores genéticos relacionados con el riesgo para desarrollar esquizofrenia podrían estar presentes en las poblaciones humanas con relativa frecuencia. ¿Esto qué quiere decir? Esto quiere decir que el fenotipo de la

enfermedad no podría explicarse por una o pocas variantes de riesgo, sino por varias variantes que confieren riesgos pequeños, y que en última instancia el ambiente acabaría explicando, al menos en parte, la aparición del trastorno. En este sentido, los estudios epidemiológicos han corroborado la existencia de diferentes factores de riesgo de origen ambiental implicados en la etiología del trastorno. Éstos podríamos dividirlos en dos grupos: factores que predisponen a la enfermedad y factores que precipitan la enfermedad. Entre los primeros se situarían aquellos que acontecen durante el neurodesarrollo como podrían ser infecciones de origen vírico (gripe, respiratorios, del Sistema Nervioso Central, etc...), sufrir complicaciones obstétricas y perinatales, presentar anomalías dermatoglíficas y anomalías físicas menores y alteraciones cerebrales. En el segundo bloque de factores de riesgo ambiental se encontrarían pertenecer a algunos grupos de inmigrantes, vivir en una gran ciudad, sufrir acontecimientos vitales estresantes y por último el uso del cannabis. En cualquier caso los riesgos que confieren estos factores son pequeños (inferiores a 5) y en el caso del cannabis, estudios recientes han demostrado que el riesgo se puede duplicar si el consumo tiene lugar durante la adolescencia. En cualquier caso, de todos los factores descritos hasta el momento, el que confiere mayor riesgo para esquizofrenia (RR=10) sería tener un familiar de primer grado afectado por la enfermedad, evidenciándose la importancia de los factores genéticos en la etiología de la esquizofrenia.

Los estudios familiares, de gemelos y adopción llevados a cabo desde la Epidemiología Genética ponen de manifiesto que el riesgo para padecer la enfermedad está en función del número de genes que compartimos con una persona que esté afectada de esquizofrenia. El hecho que este riesgo no aumente proporcionalmente al número de genes compartido con un enfermo, es decir, no se ajuste a una recta sino a una función exponencial, aboga una vez más por la existencia de múltiples genes de efecto menor implicados en la enfermedad. Esto implica que mientras una persona de la población general (sin antecedentes de enfermedad psiquiátrica) tiene un riesgo aproximado del 1% de tener un brote psicótico, otra persona con un familiar de segundo grado afectado (con el que comparte el 25% de sus genes) tiene un riesgo del 3% y de la misma manera los familiares de primer grado que comparten el 50% de sus genes con el paciente tienen un riesgo del 10%.

También cabe destacar que los gemelos monozigóticos, que comparten el 100% de sus genes, presentan concordancias situadas alrededor del 50%; este resultado nos debería hacer pensar en la importancia de los factores ambientales en la etiología de la enfermedad. De qué manera los factores ambientales (prenatales o postnatales) van a influir en la expresión diferencial de los genes de riesgo es una cuestión de estudio de gran interés y que constituye una nueva estrategia de investigación aplicada a las enfermedades complejas. Su objetivo es intentar tener en cuenta tanto la correlación como la interacción entre determinadas variantes genéticas de riesgo y algunos factores ambientales.

La interacción gen-ambiente (GxE) hace referencia a nuestra sensibilidad genéticamente mediada a determinados factores ambientales. Esto implicaría que determinados genotipos (genotipos de riesgo) aumentan más la probabilidad de sufrir el trastorno comparado con otros (genotipos de no-riesgo) ante una misma exposición a un factor de riesgo ambiental. De acuerdo con este modelo los individuos difieren en su sensibilidad a factores ambientales adversos, de manera que los individuos genéticamente vulnerables poseen más riesgo de sufrir la enfermedad cuando se exponen en la misma dosis a un determinado factor de riesgo ambiental.

En un trabajo reciente, Moffit y colaboradores sugieren que la Genética Psiquiátrica podría beneficiarse sustancialmente de una estrategia de investigación capaz de comprender la interacción entre ambos factores. De acuerdo con estos autores, existirían una serie de pasos que se debería seguir para poder llevar a cabo este tipo de investigación. En primer lugar deberían consultarse los datos de los estudios de gemelos y adopción que evidencian la implicación de genes y ambiente en el trastorno (Genética cuantitativa del trastorno). El siguiente paso será seleccionar un factor ambiental candidato para el trastorno. ¿Qué características ha de tener este factor ambiental? En primer lugar deber presentar una respuesta diferencial entre las personas expuestas, es decir, que no todas las expuestas desarrollen el trastorno, de esta manera la respuesta diferencial puede ser explicada por diferencias existentes entre los individuos. Por otro lado, el mecanismo de acción del factor de riesgo debería estar implicado en un sistema biológico implicado en la fisiopatología de la enfermedad. Una vez seleccionado el factor candidato de riesgo ambiental se deberá encontrar una manera de cuantificarlo, en este sentido identificar factores de riesgo acostumbra a ser mucho más fácil que medirlos. El tercer paso, será identificar el gen candidato que queremos investigar en relación con el factor ambiental. Debe ser un gen que presente variabilidad en la población y que codifique para una proteína cuya función pudiera jugar un papel en la fisiopatología de la enfermedad y en las vías de acción del factor ambiental. Los últimos pasos serán analizar la posible interacción GxE e intentar replicar nuestros resultados en muestras independientes.

Otro factor que debería tenerse en cuenta en el estudio de enfermedades complejas sería el grado de vulnerabilidad que presentan los individuos. De acuerdo con la definición de María Moliner en el diccionario de uso del español ser vulnerable implica: "ser susceptible de ser herido o vulnerado, de recibir daño o perjuicio o, de ser afectado, conmovido, convencido o vencido por algo que se expresa". En el caso de la esquizofrenia tener historia familiar de esquizofrenia o niveles altos de esquizotipia constituyen factores de vulnerabilidad.

En un estudio reciente llevado a cabo por Henquet y colaboradores se ha demostrado la existencia de una interacción entre un factor ambiental de riesgo para psicosis (consumo de cannabis) y predisposición-vulnerabilidad para psicosis. Estos autores llevaron a cabo un estudio longitudinal en una cohorte alemana de aproximadamente 2500 individuos de la población general, a los cuales se evaluó sus niveles de esquizotipia y consumo de cannabis al inicio del estudio. Cuatro años más tarde la cohorte fue re-evaluada midiéndose en los individuos la presencia de síntomas psicóticos. Cuando se clasificó a todos los individuos en dos grupos (de alta vulnerabilidad y de baja vulnerabilidad), se vio que los individuos con baja predisposición para psicosis que no habían consumido cannabis, presentaban un riesgo de síntomas psicóticos en un 15% de los casos, mientras en el mismo grupo los que habían consumido cannabis presentaban un riesgo del 21%. En el grupo de individuos con alta predisposición a la enfermedad, los no expuestos al cannabis presentaban 26% de riesgo de síntomas psicóticos, mientras los que habían consumido cannabis en un 50%. La diferencia de riesgo en el grupo con predisposición era significativamente superior que en el grupo sin predisposición (24% vs 6%), en concreto 4 veces superior.

De acuerdo con los datos aportados por el proyecto genoma humano, nuestro genoma está constituido por unos 30000 genes, el 50% de ellos se expresan en el cerebro. Cualquiera de estos genes podría considerarse un buen candidato para esquizofrenia. Actualmente los genes implicados en la plasticidad sináptica, son los principales genes

candidatos para el trastorno, uno de estos genes es el gen de la COMT (catecol-O-metil transferasa). localizado en el brazo largo del cromosoma 22. El gen de la COMT codifica para un enzima implicado en la degradación de dopamina a nivel intersináptico, de manera que cuando la dopamina es liberada desde la neurona pre-sináptica la COMT degrada al neurotransmisor regulando en última instancia la dopamina que se unirá a los receptores post-sinápticos. El gen de la COMT ha sido considerado un importante gen candidato en esquizofrenia no solo por su función sino también por su localización cromosómica en una región donde diversos estudios de ligamiento han detectado lod scores elevados. Este gen presenta un polimorfismo funcional (Val158Met) con dos variantes (G y A) que dan lugar a un cambio de aminoácido en la proteína que codifican (Val o Met respectivamente). Los individuos homocigotos para la variante G (genotipo Val/Val) presentan un enzima que degrada rápidamente la dopamina, los homocigotos para la variante A (genotipo Met/Met) presentan una variante del enzima que degrada la dopamina lentamente, mientras los heterocigotos (Val/Met) tienen una actividad del enzima intermedia. Tres estudios recientes (dos americanos y uno llevado a cabo por nuestro equipo en Barcelona) han relacionado la variabilidad de este gen con la ejecución de tests de función frontal (Wisconsin Card Sorting Test-WCST) en población sana. En concreto estos estudios ponen de manifiesto como los individuos Met/Met (con una variante del enzima menos eficiente y por tanto con mayor disponibilidad de dopamina en el espacio intersináptico) ejecutan peor el WCST llevando a cabo un mayor número de errores perseverativos. Por el contrario los individuos Val/Val cometen un mayor número de errores perseverativos en el test y los heterocigotos Val/Met obtienen puntuaciones intermedias.

Caspi y colaboradores en un estudio longitudinal de una cohorte de individuos de Nueva Zelanda (Dunedin) nacidos entre 1972 y 1973, han estudiado la posible relación entre este gen, la presencia de síntomas psicóticos y el consumo de cannabis. Los autores han llevado a cabo un seguimiento exhaustivo de los individuos de la cohorte desde su nacimiento hasta los 26 años para diferentes variables entre las que se incluía el consumo de cannabis en la adolescencia. En la última evaluación llevada a cabo cuando los individuos tenían 26 años, se evaluó la presencia de síntomas psicóticos y diagnóstico de trastorno esquizofreniforme. Los resultados del estudio pusieron de manifiesto que los individuos que habían consumido cannabis durante la adolescencia y poseían el genotipo Val/Val presentaban mayor riesgo para sufrir síntomas psicóticos y trastorno esquizofreniforme.

Como hemos podido ver a lo largo de esta introducción, el cannabis se presenta como un factor de riesgo para psicosis; de la misma manera el gen que codifica para la COMT presenta variabilidad funcional que podría estar implicada tanto en el riesgo para síntomas psicóticos como para algunos déficits cognitivos presentes en pacientes con esquizofrenia. El trabajo de Caspi y colaboradores ha puesto de manifiesto la existencia de una interacción entre uso de cannabis en la adolescencia, genotipo de la COMT y psicosis, pero resulta de vital importancia la replicación de estos estudios en muestras independientes. Precisamente este fue el objetivo del estudio que les voy presentar a continuación en el cual se estudio la posible interacción GxE (cannabis x COMT) y se incluyó una nueva variable, la vulnerabilidad. Este trabajo ha sido llevado a cabo en colaboración con investigadores de la Universidad de Maastricht liderados por el profesor Jim van Os.

Se llevó a cabo un estudio experimental doble ciego, en el cual participaron 30 pacientes con esquizofrenia (según criterios diagnósticos DSM-IV), 12 familiares de primer grado de los pacientes y 32 controles. Por razones éticas todos los individuos habían consumido cannabis

en algún momento de su vida. A todos ellos se les midieron los niveles de esquizotipia (por medio de la escala CAPE y estas puntuaciones se utilizaron como medida de vulnerabilidad), se les pasó una batería neurocognitiva (memoria verbal y visual, atención) y presencia de síntomas psicóticos (mediante el CAPE). De manera breve el diseño fue el siguiente, en una sesión inicial se explicó a los participantes el estudio y se les pidió su consentimiento informado, se les tomó una muestra de saliva que se utilizó para la extracción de ADN y genotipado del polimorfismo Val158Met de la COMT. Se les pasaron las escalas de esquizotipia y se les hizo un pequeño entrenamiento para los tests neurocognitivos que iban a llevar a cabo en las sesiones siguientes. En una primera sesión se les hizo fumar un cigarrillo (con placebo o delta-9-THC, principal componente psicoactivo del cannabis) y se les pidió que ejecutaran los tests neurocognitivos comentados anteriormente y se les midió la presencia de síntomas psicóticos. En una segunda sesión una semana más tarde, los participantes volvían a fumar un cigarrillo (si en la primera sesión habían fumado placebo en ésta delta-9-THC o al revés) y volvían a realizar las mismas pruebas que la semana anterior (tests neurocognitivos y síntomas psicóticos).

Los resultados en referencia a la presencia de síntomas psicóticos pusieron de manifiesto que ninguno de los factores estudiados (vulnerabilidad, consumo de cannabis y genotipo de la COMT) de manera independiente jugaba un papel en la aparición de síntomas psicóticos en la muestra analizada. Sin embargo, se observó una interacción entre los tres factores de manera que los individuos con alta predisposición para psicosis, con el genotipo Val/Val, cuando fumaban cannabis presentaban con mayor frecuencia síntomas psicóticos.

De manera similar se estudió la relación entre estas tres variables y la ejecución de los tests neurocognitivos. En esta ocasión se vio que el consumo de cannabis estaba directamente relacionado con peores puntuaciones en todos los tests neurocognitivos realizados (excepto atención selectiva). Este efecto se vio que era mucho más importante en los individuos con el genotipo Val/Val, observándose una interacción positiva entre estos dos factores. En este caso no se observó una interacción clara con la predisposición para psicosis.

Estos resultados que os he presentado, nos hacen pensar que tanto el cannabis como el gen del COMT interactúan participando de alguna manera en una desregulación del sistema dopaminérgico que en última instancia puede estar implicado en la aparición de los síntomas de la enfermedad y los déficits neurocognitivos asociados.

A la luz de los diferentes resultados que he ido presentando a lo largo de esta charla, tan solo señalar, a modo de conclusión, que muy probablemente una parte importante de los esfuerzos en la futura investigación en enfermedad mental habrán de orientarse hacia la comprensión de la interacción entre el ambiente (entendido en su acepción más amplia) y los factores de riesgo genético, así como al uso de fenotipos homogéneos y biológicamente distinguibles. Tal vez este entendimiento pueda conducir al descubrimiento de la verdadera base neurobiológica de los fenómenos que tienen lugar en el cerebro de los pacientes y de la población sana y así permitir el avance en la investigación.

Antes de finalizar querría dar las gracias a nuestro grupo de Barcelona y el grupo de Maastricht con el que colaboramos desde hace ya algunos años.

“20 Aniversario del Plan Nacional sobre Drogas”
GENÈTICA de las ADICCIONES
10 de Mayo de 2006

**Cannabis y esquizofrenia:
un modelo para la comprensión de la interacción
genes-ambiente (GxE)**

Araceli Rosa

I call *dementia praecox* “schizophrenia”... I use the word in the singular although it is apparent that the group includes several diseases.... so far, we have been unable to discover any natural lines of division within the described clinical picture ... the subdivision of the group of schizophrenias is a task for the future.

E. Bleuler, 1950

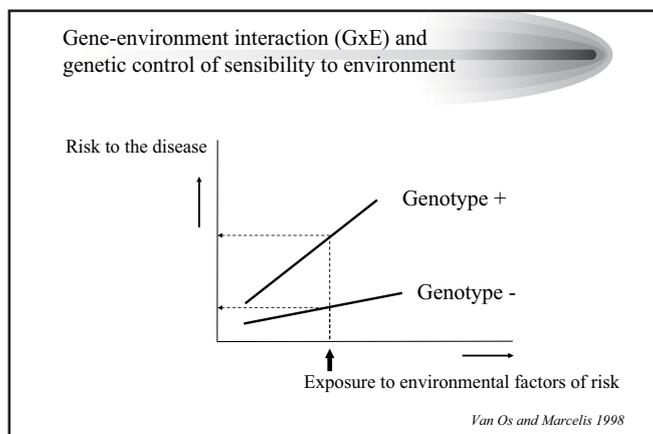
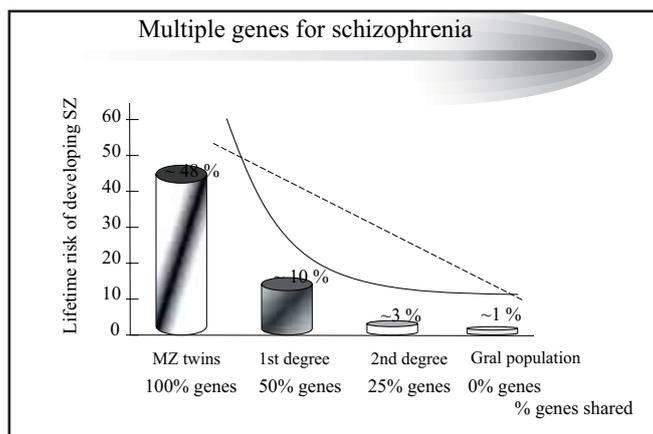
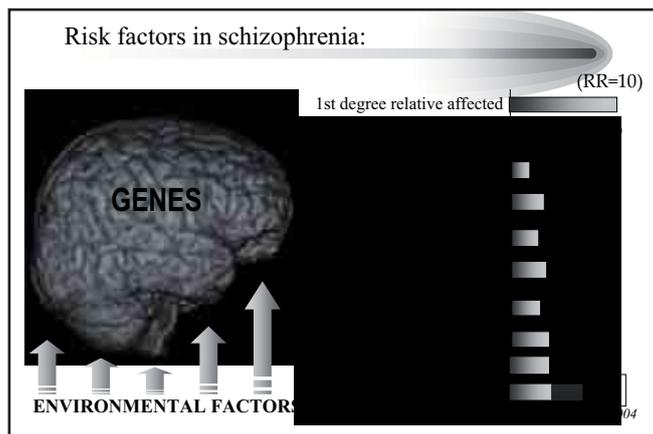


- ✓ Schizophrenia, present in all cultures
- ✓ Life time risk: 1%.
- ✓ Fertility rates in schizophrenic patients (Eisen-Moller, 1955)
- ✓ General population 4-17% experienced psychotic experiences (van Os et al 2000)

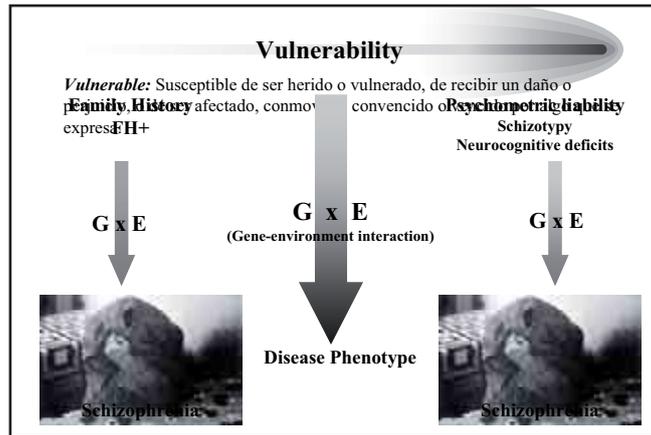
Genetic factors related to the risk to develop schizophrenia should have relative frequency in human populations

Life time risk for schizophrenia 1%





- ### Steps for research into measured gene-environment interaction (GxE)
1. Quantitative behavioral-genetic studies
 2. Identifying a candidate environmental risk factor for the disorder
 - ✓ Variability in response among people exposed to the E risk
 - ✓ Plausible effect of the E risk on biological systems involved in the disorder
 - ✓ Evidence that putative risk is a true E pathogen having causal effects
 3. Optimize environmental risk measurement
 4. Identify candidate susceptibility genes
 5. Testing for an interaction GxE
 6. Replication and meta-analysis
- Moffit et al. 2005. Arch. Gen. Psychiatry*



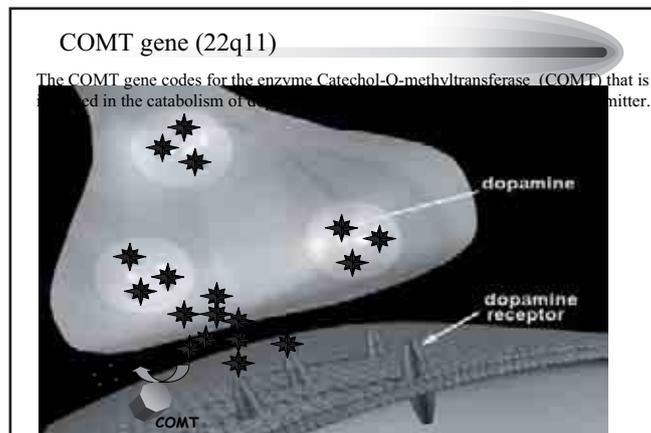
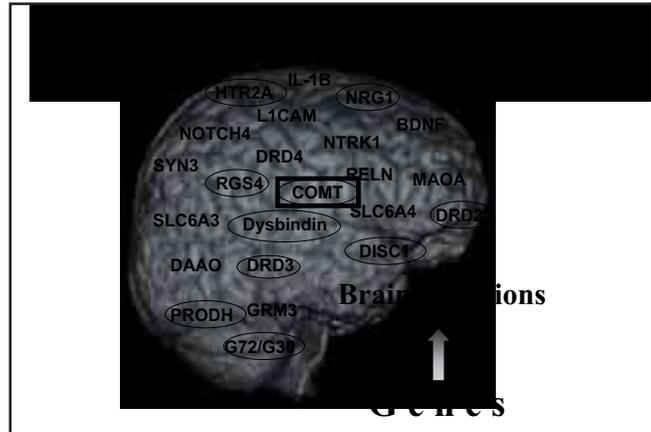
Interactions between any cannabis use and predisposition to psychosis

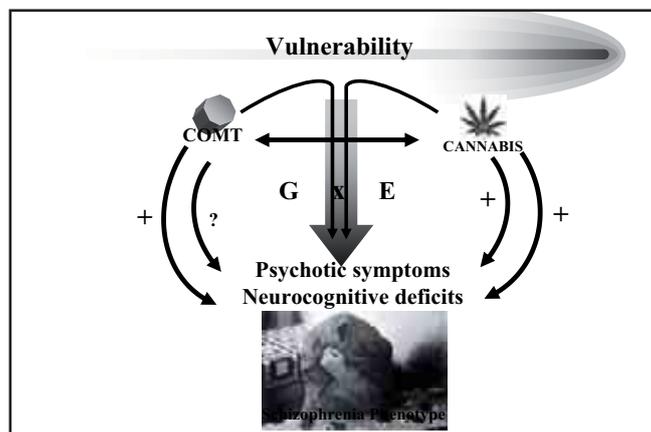
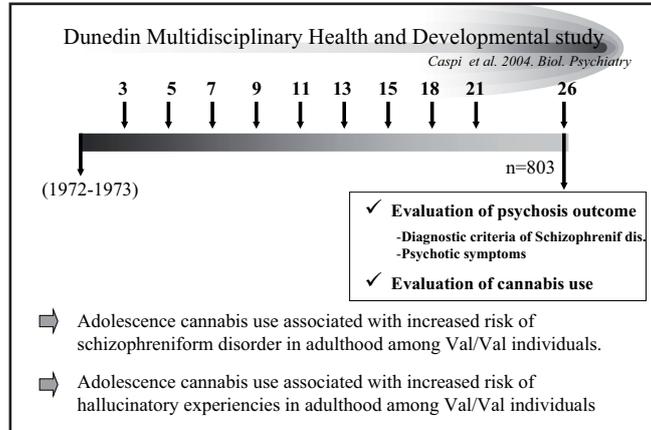
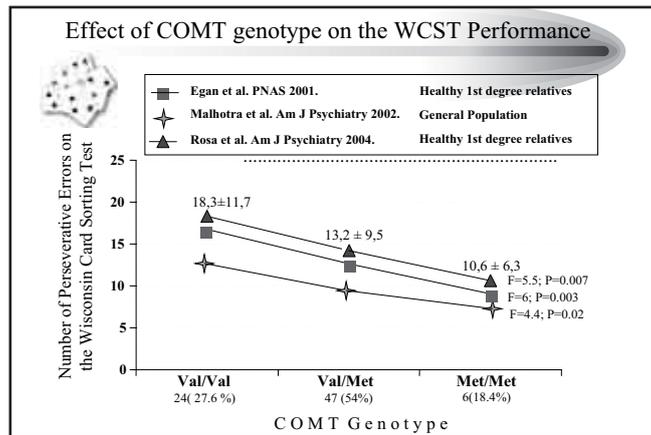
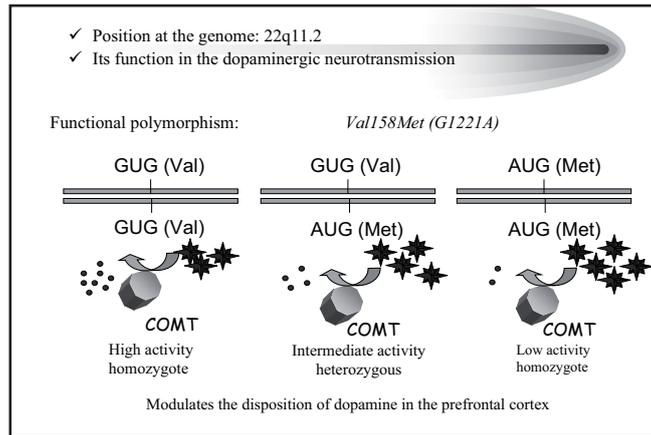
EDSP study: 2,437 participants
 4 year follow-up

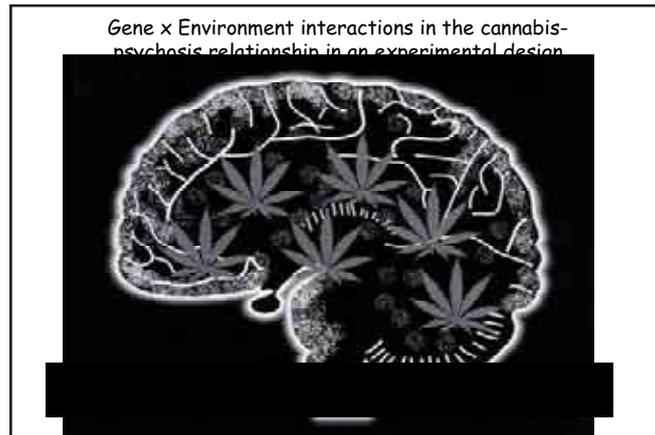
18.3 ± 3.3 → 21.8 ± 3.4

	Risk of psychotic symptoms	Difference in risk (95% CI)
NO - Psychosis predisposition	15%	6% (0.4 to 10.8) P= 0.033
	21%	
Psychosis predisposition	26%	24% (7.9 to 39.7) P=0.003
	50%	

Henquet et al.(2004) British Medical Journal







Design and assessment:

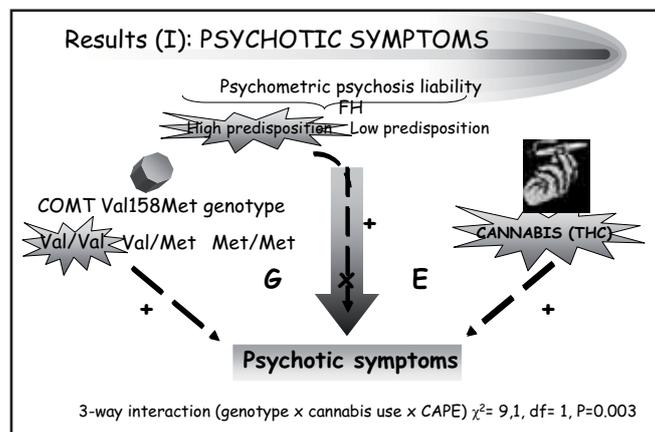
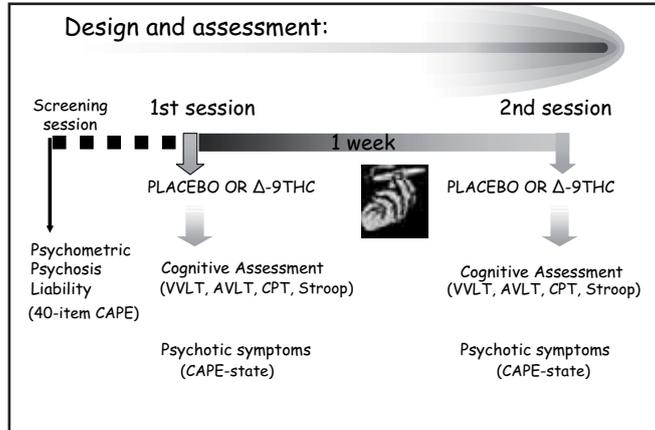
Design: two-day double blind placebo controlled cross-over design

Sample: 30 psychotic patients (DSM-IV), 12 first-degree relatives, 32 controls

Assessment:

- Psychometric psychosis liability: 40 item CAPE
- Cognitive assessment: - Verbal and visual memory (VVLTV)
- Sustained and selective attention (CPT/ Stroop)
- Psychotic symptoms: - CAPE-state

Genotyping: COMT (Val158Met polymorphism)



Results (I): COGNITION

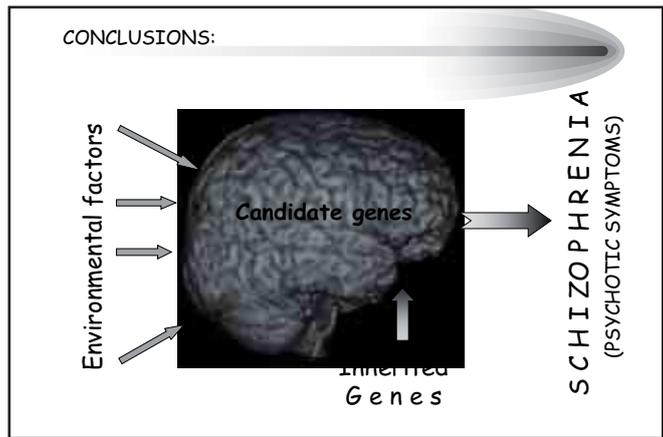


Cannabis (Δ -9THC)

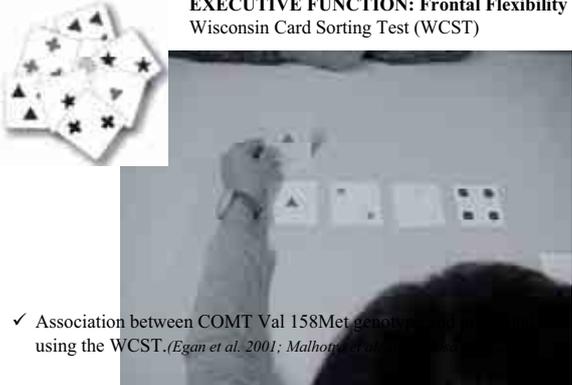
- VERBAL MEMORY: Immediate and delayed free recall** *Val/Val
 $\beta = -2.6$, 95% CI = -4.6; -0.6, $P = 0.01$; $\beta = -0.7$, 95% CI = -1.3; -0.1, $P = 0.01$
- VISUAL MEMORY: Delayed recognition** *Val/Val
 $\beta = -1.6$, 95% CI = -2.5; -0.6, $P = 0.001$
- ATTENTION: Sustained attention** *Val/Val
 False hits on the CPT: $\beta = 0.7$, 95% CI = 0.2; 1.3, $P = 0.007$
Selective attention
 Stroop interference score: $\beta = 0.06$, 95% CI = -0.02; 0.13, $P = 0.16$

Subjects with the Val/Val genotype (compared to Val/Met or Met/Met subjects) were significantly more sensitive to the effect of THC on some functions (*Val/Val).

The conditionality on psychometric psychosis liability was less evident than for the psychotic symptoms.



EXECUTIVE FUNCTION: Frontal Flexibility
 Wisconsin Card Sorting Test (WCST)



✓ Association between COMT Val 158Met genotype and executive function using the WCST. (Egan et al. 2001; Malhotra et al. 2005)

PARTE III A. MESA DE DEBATE Y REFLEXIÓN: LA INVESTIGACIÓN BÁSICA EN DROGODEPENDENCIAS

Modera:

José Miñarro López.
Departamento de Psicobiología.
Universitat de València.

Sustrato neurobiológico en la adicción de drogas.

Olga Valverde Granados.
Laboratori de Neurofarmacologia. Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud.
Universitat Pompeu Fabra de Barcelona.

Genética de la susceptibilidad individual a la drogadicción.

Emilio Ambrosio Flores.
Departamento de Psicobiología.
Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED).

Sustrato neurobiológico en la adicción de drogas

Olga Valverde Granados
Laboratori de Neurofarmacologia.
Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universitat Pompeu Fabra de Barcelona.

Esta presentación tratará sobre el estudio del sustrato neurobiológico en la adicción de drogas de abuso.

La adicción de drogas es considerada como un trastorno psiquiátrico según el manual DSMIV, que se caracteriza por:

- el consumo compulsivo de la droga,
- pérdida de control sobre el consumo,
- consumo de la droga a pesar de las consecuencias negativas de dicho consumo y
- recaídas frecuentes incluso tras largos periodos de abstinencia

Sin embargo, el estar en contacto con la droga no lleva de forma automática al desarrollo del proceso adictivo. Existen factores que condicionan dicho desarrollo tras la exposición inicial a la droga como son:

- la vulnerabilidad individual
- el ambiente
- el tipo de droga o drogas consumidas y su vía de administración.

Entre los factores ambientales que influyen en el desarrollo de la adicción podríamos citar el estrés, el aprendizaje, la exposición a la droga a edades tempranas y los trastornos psicológicos o psiquiátricos que aparezcan de forma concomitante a la adicción.

Entre los factores que aportan vulnerabilidad genética, podríamos citar los polimorfismos y enfermedades neurológicas y psiquiátricas con un componente genético.

Entre los factores ambientales, es importante señalar, la trascendencia que tiene la exposición temprana a las drogas de abuso o a otros tóxicos, ya que según estudios epidemiológicos, existe una alta incidencia entre la población adolescente a experimentar por primera vez con las drogas.

El estudio de los polimorfismos genéticos nos están proporcionando datos relevantes acerca de las diferencias individuales en la sensibilidad a los efectos de distintas drogas de abuso como los opioides, psicoestimulantes, nicotina, etc. En este sentido, distintos genes han sido evaluados como posibles candidatos para explicar la vulnerabilidad a padecer

determinados procesos adictivos. Entre ellos, podríamos citar los receptores opioides, los receptores de dopamina, serotonina y también polimorfismos en el receptor cannabinoide CB1 y en la enzima de degradación de los cannabinoides FAAH.

Así, la variante A118G de receptor mu-opioide se ha asociado con la adicción de opioides. En el caso del receptor cannabinoide CB1, la variante de este receptor conocida como haplotipo TAG aparece con una frecuencia significativamente mayor en politoxicómanos en diferentes grupos de población.

En el proceso adictivo, uno de los fenómenos mas relevantes está relacionado con los efectos reforzantes inducidos por las drogas. De hecho, es condición necesaria que las drogas ejerzan algún tipo de efecto placentero para que se desarrolle y consolide el proceso adictivo. Diferentes equipos han estudiado los distintos sistemas neuroquímicos que modulan los efectos reforzantes de las drogas de abuso. Entre ellos destaca el sistema dopaminérgico. Este sistema tiene funciones importantes en refuerzo, control motor y cognición. Las distintas drogas de abuso, de forma independiente de su particular mecanismo de acción estimulan la descarga de las neuronas dopaminérgicas en el sistema meso-cortico-límbico. Los cuerpos neuronales de las neuronas dopaminérgica se ubican preferentemente en el mesencéfalo, en el área tegmental ventral y desde esta zona proyectan a áreas límbicas como el núcleo accumbens y al córtex prefrontal. Esta vía es estimulada por las drogas de abuso. Además es modulada por otros sistemas de neurotransmisión, como son el glutamatérgico originado en el cortex prefrontal y que proyectan al núcleo accumbens y al área tegmental ventral, o proyecciones gabaérgicas, opioides y cannabinoides. Así, conocemos cuales son las localizaciones preferenciales donde las distintas drogas de abuso pueden modular este complejo sistema que media los efectos de recompensa.

Si bien el inicio del proceso adictivo, parece tener su sustrato neurobiológico en el sistema límbico y se relaciona con los efectos reforzantes de las drogas, la consolidación de este proceso involucra otros procesos y otros sustratos anatómicos. El proceso adictivo es actualmente considerado como un trastorno tipo obsesivo compulsivo y por tanto, existe una alteración en los procesos de toma de decisiones, desarrollo de estrategias que involucran áreas corticales. Estudios de neuroimagen, muestra la implicación de áreas límbicas durante el inicio del proceso adictivo. Sin embargo, tras la instauración de la adicción aparece una disminución en el metabolismo de la glucosa en zonas del cortex prefrontal, en concreto en la corteza orbitofrontal, relacionada con el proceso de toma de decisiones.

En nuestro laboratorio, hemos abordado la participación de diversos sistemas de neurotransmisión en las propiedades adictivas de ciertas drogas de abuso. Hoy les presentaré algunos de los resultados que hemos obtenidos tras la manipulación genética del sistema opioide y del sistema cannabinoide.

Con respecto a la manipulación del sistema opioide, hemos investigado los efectos de distintas drogas de abuso en animales deficientes en diferentes componentes del sistema opioide (receptores o péptidos opioides). En uno de los primeros estudios que realizó nuestro equipo mostramos que los receptores opioides mu son necesarios para que se manifiesten los efectos de recompensa de fármacos opioides como la morfina. Estudios posteriores de nuestro mismo grupo han demostrado que el receptor mu-opioide es también necesario para la expresión de los efectos de recompensa de otras drogas de abuso con distinto mecanismo de acción, como es el caso de la nicotina. Además, hemos observado que los animales deficientes en el gen de la pre-proencefalina (un péptido opioide que se

une preferentemente a los receptores de tipo mu y delta), no muestran efectos reforzantes tras la administración de nicotina. En este mismo sentido, la administración de nicotina no incrementa de forma significativa los niveles de dopamina en el núcleo accumbens en el ratón deficiente en la pre-proencefalina.

Otra de las drogas de abuso que nos ha interesado evaluar, han sido los cannabinoides, y en particular, el delta9-tetrahidrocannabinol (THC), el principio activo de la marihuana. Hemos demostrado que los receptores opioides participan en los efectos adictivos de este compuesto. Estudios realizados en nuestro laboratorio con animales mutantes deficientes para cada uno de los receptores opioides (mu, delta y kappa) han demostrado que los receptores mu son necesarios para que se manifiesten las propiedades reforzantes del THC, mientras que los receptores kappa modulan los efectos aversivos asociados a dosis elevadas de THC. Sin embargo, la eliminación del receptor opioide delta no modificó ni los efectos reforzantes ni los aversivos inducidos por la administración de cannabinoides. Evaluamos también, la participación de las encefalinas en la capacidad adictiva del THC. Los animales deficientes en el gen que codifica estos péptidos mostraron una atenuación en el desarrollo de la dependencia física, y cuando evaluamos la abstinencia global al THC, observamos una atenuación en los animales deficientes en el gen de la preproencefalina. Así, podemos afirmar que existe una interacción recíproca entre distintos sistemas de neurotransmisión.

Nos hemos interesado en la evaluación de los efectos de recompensa de otro tipo de drogas como, el MDMA, un psicoestimulante. Hasta ahora, los efectos de recompensa de las distintas drogas evaluadas estaban disminuidos cuando nosotros manipulábamos el sistema opioide (el THC, la nicotina, la morfina). En el caso del MDMA, los efectos de recompensa del MDMA se mantienen en los animales deficientes en los receptores opioides mu. Al observar los niveles extracelulares de dopamina en el núcleo accumbens, observamos el mismo incremento que en el animal wild-type. Por tanto el receptor mu opioide, no es importante para el refuerzo primario del psicoestimulante MDMA. Para profundizar en esta respuesta, utilizamos modelos más complejos como el modelo de autoadministración intravenosa en el ratón. Hasta ahora, en los modelos comportamentales que les he mostrado, el animal recibía a droga de manera pasiva, pero en el modelo de autoadministración, el animal va a administrarse la droga, si ésta tiene efectos reforzantes. La autoadministración es un modelo operante, en el que el animal aprende a discriminar entre dos palancas o dos agujeritos. Uno de ellos será activo y otro inactivo. El aprendizaje le permitirá accionar sobre el sistema activo y recibirá una infusión de droga.

La utilización de este modelo nos ha permitido investigar como responden los animales deficientes en el péptido opioide dinorfina ante el agonista cannabinoide (WIN 55,212-2). La dinorfina es un ligando opioide con preferencia por los receptores de tipo kappa opioide y participa en la expresión de los efectos aversivos, relacionados con los cannabinoides. En este experimento observamos que tras eliminar el gen de la prodinorfina, los efectos de recompensa del agonista cannabinoide WIN 55,212-2 están incrementados. Al observar la curva dosis-respuesta, vemos un desplazamiento hacia la izquierda de dicha curva en el animal knockout. Esto se traduce como una mayor sensibilidad hacia la droga que estamos utilizando. Es decir, la droga presenta un aumento de sus efectos reforzantes en los animales que carecen del gen de la prodinorfina.

En el siguiente esquema, podemos resumir lo que hemos hablado hasta ahora de cómo el receptor mu-opioide y de los ligandos endógenos que se van a fijar sobre este

receptor. Las áreas límbicas van a ser el sustrato neurobiológico de las primeras fases de la adicción, el refuerzo primario, para la morfina y para otras drogas prototípicas (alcohol, cannabinoides, y la nicotina). En el caso de los psicoestimulantes el receptor mu-opioide, no parece participar de forma esencial en los efectos reforzantes primarios de estas drogas.

En la segunda parte de la presentación, me centraré en la participación del sistema endocannabinoide y en particular de los receptores cannabinoides CB1 en los efectos adictivos de las drogas de abuso. El sistema endocannabinoide es un sistema capaz de modular la adicción de una manera general. Y en este caso, todos los resultados que les mostraré pertenecen a estudios realizados en un animal que carece del receptor cannabinoide CB1. La estimulación de este receptor es el responsable de los efectos psicotrópicos de los cannabinoides. En los primeros estudios realizados con el animal mutante deficiente en los receptores CB1, mostramos por primera vez, la ausencia de refuerzo primario para la morfina en el modelo de preferencia de plaza en el animal carente de los receptores CB1. En el modelo de autoadministración aguda, observamos una disminución de los efectos reforzantes de la morfina en el animal que carece de este receptor CB1. Nuestros estudios muestran que la presencia de los receptores CB1 es imprescindible para que se manifiesten los efectos reforzantes de la morfina. Además, el desarrollo de la dependencia física, fue evaluado observando el síndrome de abstinencia de morfina. Nuestros estudios demostraron que la dependencia está significativamente atenuada al eliminar el receptor CB1. La escala global de abstinencia nos muestra una disminución significativa de los efectos de la abstinencia en los animales CB1 knockout.

Evaluamos en estos animales CB1 knockout los efectos de la nicotina en el modelo de preferencia de plaza y observamos que la nicotina no muestra efectos de recompensa en el animal CB1 knockout, de forma similar a lo observado en el animal mu knockout. Sin embargo, los psicoestimulantes no parecen requerir del receptor cannabinoide CB1 para que se manifieste el refuerzo primario asociado a su administración. Este efecto lo observamos con la cocaína y con el MDMA.

Otros trabajos farmacológicos mostraron resultados contradictorios con nuestros estudios y demostraban que el receptor cannabinoide CB1 ejerce una función importante en algunos de los fenómenos adictivos, (por ejemplo en los fenómenos de recaída). De hecho, la administración de un agonista cannabinoide, facilita la recaída al consumo de cocaína en un modelo de autoadministración en ratas. Para profundizar en estos resultados, evaluamos modelos más complejos. Si el refuerzo agudo estaba preservado, ¿qué ocurría a nivel neuroquímico en el núcleo accumbens? La utilización del modelo de microdiálisis "in vivo" nos permitió observar que la cocaína es capaz de incrementar los niveles de dopamina en el núcleo accumbens de los animales CB1 knockout y al mismo tiempo, observamos una respuesta reforzante en un modelo comportamental. Sin embargo, los estudios de autoadministración encontramos diferencias entre el animal wild-type y el animal CB1 knockout. Así, el animal CB1 knockout no muestra una autoadministración de cocaína. Estas diferencias se van a pronunciar si exigimos una respuesta más importante al ratón para que obtenga la dosis correspondiente de cocaína. Es decir, no muestra una motivación por la droga.

La evolución de la autoadministración de cocaína en distintos días muestra también diferencias muy evidentes entre los animales wild-type y los CB1 knockout. En esta diapositiva mostramos patrones de respuesta. En los animales normales el patrón de respuesta pues es continuo, mientras que en los animales CB1 knockout, las respuestas

son de carácter esporádico. En los patrones de respuesta de razón progresiva para la autoadministración de cocaína, las diferencias entre animales normales y CB1 knockout son también muy importantes. Para estudiar este efecto a nivel farmacológico, utilizamos animales normales a los que les administramos un antagonista CB1, el rimonabant. El rimonabant a dosis de 1 a 3 mg/kg, disminuye significativamente "el punto de ruptura" en un programa de razón progresiva en el modelo de autoadministración, confirmando los resultados en el animal manipulado genéticamente.

Por último, evaluamos los efectos psicoestimulante MDMA en el animal sin receptores CB1, obteniendo resultados similares a los ya mostrados con la cocaína.

De esta segunda parte podemos concluir que el refuerzo primario de los psicoestimulantes, a diferencia que ocurre con otras drogas como la nicotina, o la morfina, se mantiene en los animales que no tienen receptores CB1. Sin embargo, estos receptores CB1, son requeridos para que exista una motivación por la droga. Por otra parte, la ausencia de los receptores CB1, se evidencia de una manera más importante cuando le exigimos un mayor esfuerzo al animal, para conseguir la droga.

Todo esto lo podemos esquematizar en esta imagen, en la cual representamos las vías dopaminérgicas que parten del área tegmental ventral y que proyectan al núcleo accumbens. Los endocannabinoides se encuentran en distintas estructuras cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo, la amígdala, que van a ser fundamentales para la consolidación del proceso adictivo. Es decir, los cannabinoides no son esenciales para el refuerzo primario de los psicoestimulantes, pero son necesarios para pasar del refuerzo agudo a la consolidación de un proceso adictivo.

Y como conclusiones de todo lo que hemos hablado hasta ahora, podríamos decir, que los animales modificados genéticamente, son una buena herramienta para estudiar los fenómenos adictivos y para estudiar la participación de los distintos sistemas de neurotransmisión en el fenómeno adictivo. Así, el receptor mu-opioide, y en general el sistema opioide, están modulando el refuerzo primario y la dependencia física de gran parte de drogas de abuso prototípicas. El receptor kappa-opioide ejerce un fenómeno opuesto al que origina el receptor mu, es decir propiciando los efectos disfóricos. El sistema endocannabinoide, se perfila como un sistema común, global, para la génesis y el desarrollo de la adicción. Los receptores cannabinoides CB1 son necesarios para que se consolide este proceso y para que se mantenga la motivación por el consumo de la droga.

Deseo agradecerles su atención y agradecer a todos los compañeros del grupo de Neurofarmacología su contribución a estos estudios. Muchas gracias.



Sustrato neurobiológico en la adicción de drogas

Olga Valverde

Laboratorio de Neurofarmacología
Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud
Universitat Pompeu Fabra

La adicción como trastorno psiquiátrico

Uso

↓

Abuso

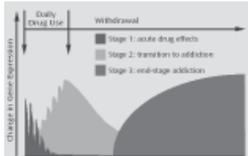
↓

Adicción

Trastorno psiquiátrico (DSM IV)

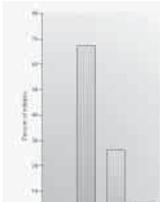
- Uso compulsivo
- Recidivas tras la abstinencia
- Pérdida del control
- Consumo de la droga a pesar de las consecuencias negativas

- Vulnerabilidad
- Ambiente
- Droga y vía de administración



- Polimorfismos
- Trastornos neurológico
- Trastornos psiquiátrico

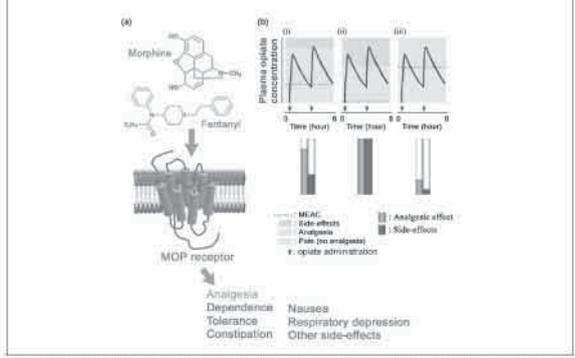
- Estrés
- Aprendizaje
- Exposición temprana a drogas o tóxicos
- Trastornos psicológicos y psiquiátricos

	ADULTOS (15 a 64 años)	ADULTOS JÓVENES (15 a 24 años)
Consumo a lo largo de la vida	3-30%	11-44%
Consumo en los últimos 12 meses (consumo reciente)	1-11%	3-22%
Consumo en los últimos 30 días (consumo actual)	0,5-5%	1,5-13%

FUENTE: Elaboración propia a partir del Observatorio Europeo de las Drogas y Toxicomanías (OEDT), Informe anual 2005.

Diferencias individuales en la sensibilidad a los efectos de los opioides



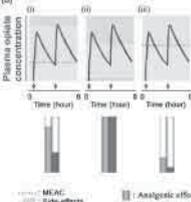


Figure 3. Individual differences in opiate sensitivity. (A) Opiate analgesics, such as morphine and fentanyl, act mainly on the opioid peptide (MOP) receptors and induce analgesia together with various side effects such as dependence, tolerance, constipation, nausea and respiratory depression. (B) Opiate sensitivity differs among individuals at least partly because of the differences in the OPRN gene. Although the plasma opiate concentration after the administration (analgesic) changes in the same manner in different patients (i.e., the plasma response can differ between patients because of 3-10-fold inter-patient differences in the minimal effective analgesic concentration (MEAC) indicated blue lines), the plasma opiate concentration needed to produce non-analgesic, sedative/analgesic and/or respiratory depression effects (side-effects) is 10-fold higher than the MEAC.

Genes evaluados como candidatos a estar asociados con trastornos adictivos

System	Connection with addiction	Gene product	Function
Opioid	Target for opiates	MOP	Receptor
		DOP	Receptor
		KOP	Receptor
		Proenkephalin Prodynorphin	Endogenous ligand Endogenous ligand
Dopamine	Part of the common reward system; target for cocaine	D2	Receptor
		D4	Receptor
		GAT1	Transporter
		DBH	Metabolism
		MAO-A	Metabolism
Serotonin	Involved in aggressive behaviour, as observed in alcoholics	COMT	Metabolism
		HTT	Receptor
		5-HTT	Transporter
		TPH	Synthesis
GABA	Possible target for alcohol	GABRA1	Receptor subunit
		GABRA6	Receptor subunit
Alcohol metabolism	Essential for alcohol detoxification	GABRB1	Receptor subunit
		ADH1B	First metabolic step
		ADH1C	First metabolic step
		ADH2	First metabolic step
		ALDH2	Removes a toxic metabolite
Cannabinoid	Target for cannabis products	CB1	FAAH Synthesis of endogenous ligand

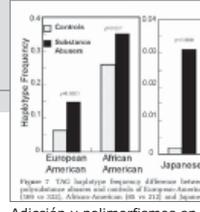
5-HTT, serotonin transporter; ADH, alcohol dehydrogenase; ALDH, aldehyde dehydrogenase; COMT, catechol-O-methyltransferase; DAT, dopamine transporter; DBH, dopamine-beta-hydroxylase; DOP, δ -opioid receptor; FAIM2, fatty acid amide hydrolase; GABA, γ -aminobutyric acid; KOP, κ -opioid receptor; MAO, monoamine oxidase; MOP, μ -opioid receptor; TPH, tryptophan hydroxylase.

Estudios que muestran una asociación genética entre adicción y la variante A118G del receptor mu-opioide (Asn40Asp).

Case	Association ^a	Population (number, ethnic group)
Opioid addiction	No	303; African-American, European-American, Hispanics
	No	891; African-American, European-American, Hispanics, Japanese, Ethiopians, Bedouins, Jews
	Yes (-)	540; Chinese
	Yes (+)	297; Chinese
	No	552; German
	No	193; Chinese
	No	400; European-American, African-American
Alcohol addiction	No	109; European-American, African-American
	Yes (-)	500; Indians
	No	Malays, Chinese
Dopaminergic supersensitivity	Yes (+)	309; Swedes
	No	791; European-American, Finns, Southwestern American-Indians
	No	867; Germans
Response to naltrexone therapy in alcoholics	Yes (+)	230; European-American
	No	647; Germans
	Yes (+)	386; Germans
Response to nicotine replacement	Yes (+)	470; European-American
	Yes	667; Germans
Response to nicotine replacement	Yes	141; Europeans
	Yes	320; Europeans

^a (+) indicates A118G allele is a risk factor; (-) indicates A118G is protective against addiction.

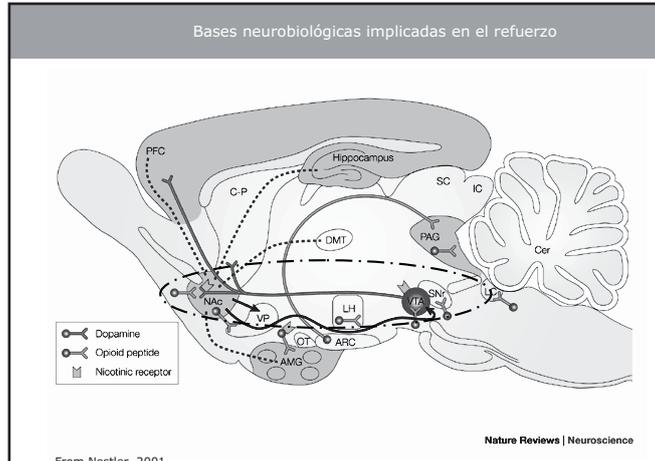
(Mayer y Hill, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 4, 2005)

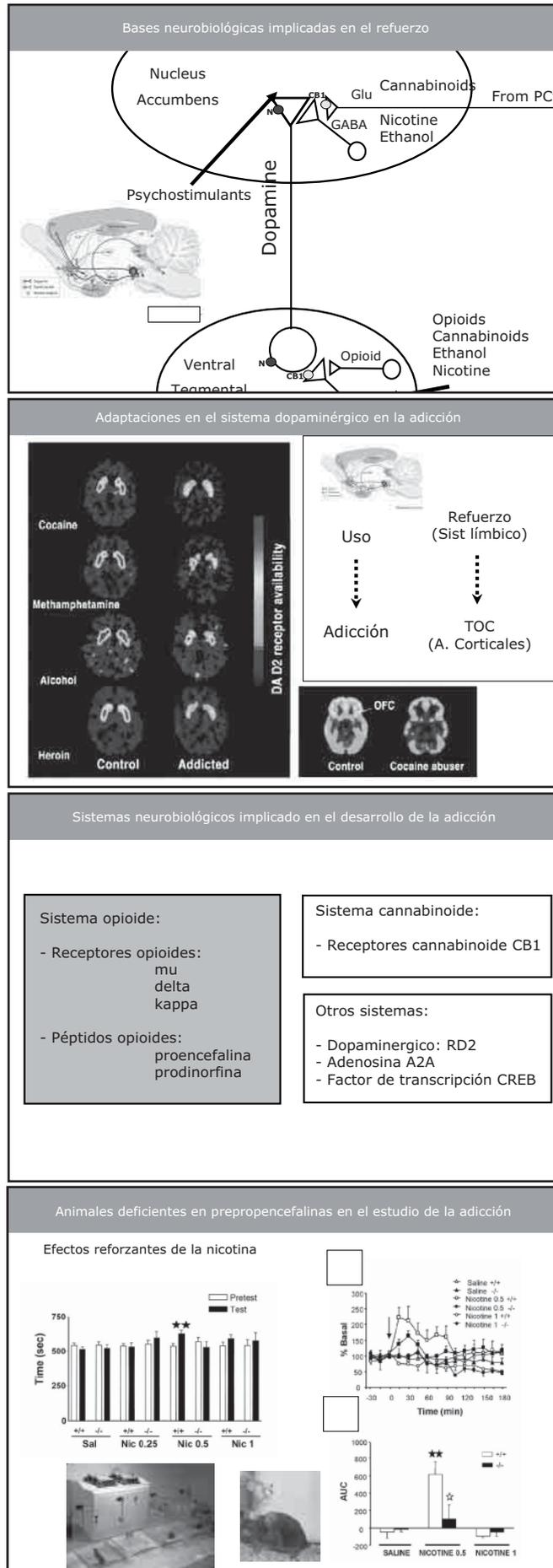


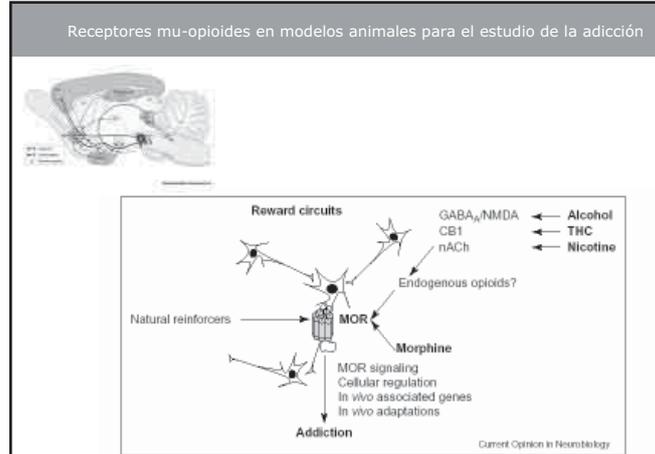
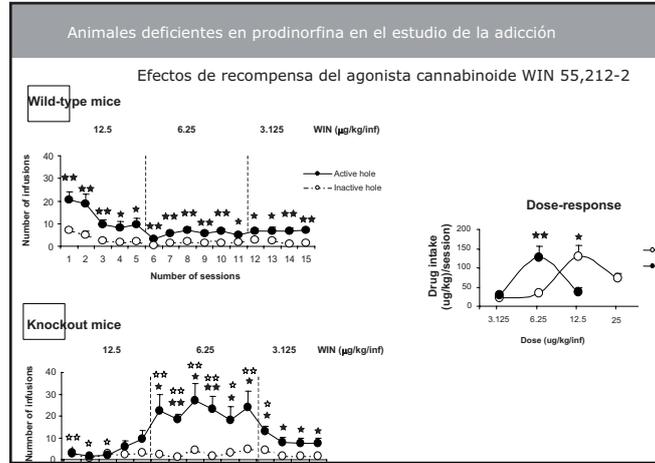
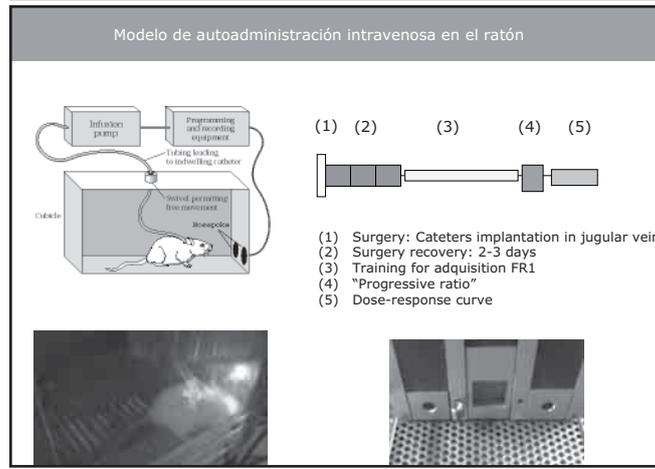
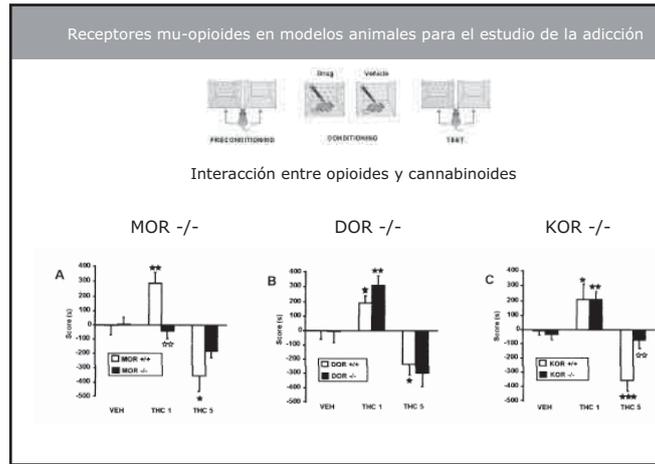
Efectos reforzantes y drogas de abuso

Drug	Action	Receptor signalling mechanism
Opiates	Agonist at μ -, δ - and κ -opioid receptors ¹	G _i
Cocaine	Indirect agonist of dopamine receptors by inhibiting dopamine transporters ²	G _i and G _s ³
Amphetamine	Indirect agonist of dopamine receptors by stimulating dopamine release ²	G _i and G _s ³
Ethanol	Facilitates GABA _A receptor function and inhibits NMDA receptor function ⁴	Ligand-gated channels
Nicotine	Agonist at nicotinic acetylcholine receptors	Ligand-gated channels
Cannabinoids	Agonist at CB ₁ and CB ₂ cannabinoid receptors ¹	G _i
Phencyclidine (PCP)	Antagonist at NMDA glutamate receptors	Ligand-gated channels
Hallucinogens	Partial agonist at 5-HT _{2A} serotonin receptors	G _i
Inhalants	Unknown	

Nestler, 2001







Sistemas neurobiológicos implicado en el desarrollo de la adicción

Sistema opioide:

- Receptores opioides: mu, delta, kappa
- Péptidos opioides: proencefalina, prodinorfina

Sistema cannabinoide:

- Receptores cannabinoide CB1

Otros sistemas:

- Dopaminergico: RD2
- Adenosina A2A
- Factor de transcripción CREB

Animales deficientes en receptores cannabinoide CB1 en el estudio de la adicción

Efectos de recompensa y abstinencia de morfina en el ratón CB1 KO

Animales deficientes en receptores cannabinoide CB1 en el estudio de la adicción

Efectos de la nicotina

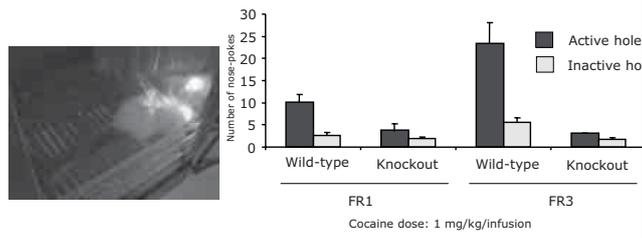
Efectos de la cocaína

Efectos de MDMA

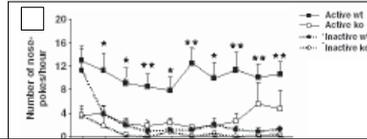
Animales deficientes en receptores cannabinoide CB1 en el estudio de la adicción

Niveles extracelulares de DA en el N Accumbens en el ratón CB1 KO

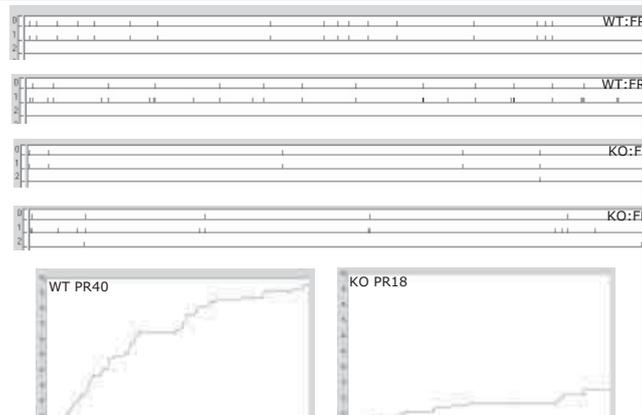
Animales deficientes en receptores cannabinoide CB1 en el estudio de la adicción



Bloqueo de la adquisición de una conducta de auto-administración de cocaína en el animal CB1 KO

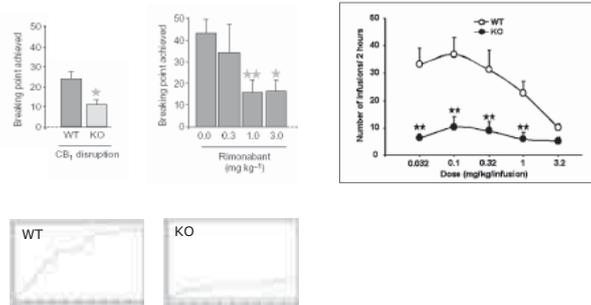


Animales deficientes en receptores cannabinoide CB1 en el estudio de la adicción

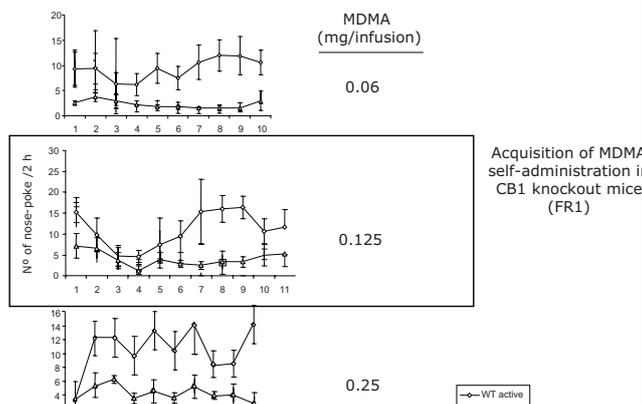


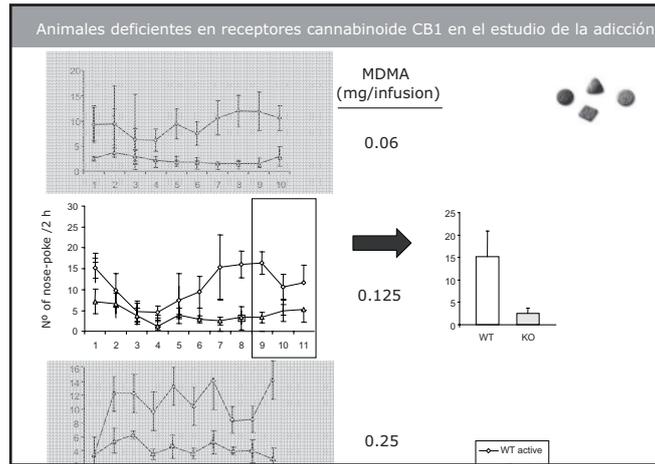
Animales deficientes en receptores cannabinoide CB1 en el estudio de la adicción

En ausencia de los receptores CB1, la cocaína pierde su valor como refuerzo



Animales deficientes en receptores cannabinoide CB1 en el estudio de la adicción

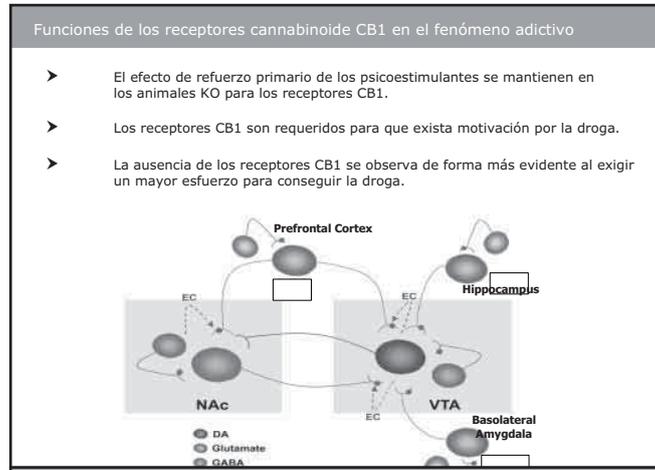




Animales deficientes en receptores cannabinoide CB1 en el estudio de la adicción

Table 1. Changes to the addictive properties of drugs observed in CB₁ cannabinoid receptor knockout mice

Drug	Model	Effect
Morphine	Conditioned place preference	Suppression
	Behavioural sensitization	No change
	Self-administration in restrained mice	Suppression
	Withdrawal syndrome	Suppression
	Withdrawal syndrome	Attenuation
Ethanol	Conditioned place preference	Attenuation
	Two-bottle choice (voluntary consumption)	Attenuation
	Withdrawal syndrome	Attenuation
	Withdrawal syndrome	Suppression
Nicotine	Extracellular dopamine levels (in vivo microdialysis)	Increase
	Conditioned place preference	Suppression
	Self-administration in restrained mice	No change
Cocaine	Withdrawal syndrome	No change
	Conditioned place preference	No change
Amphetamine	Behavioural sensitization	No change
	Self-administration in restrained mice	No change
	Self-administration	Attenuation
	Extracellular dopamine levels (in vivo microdialysis)	No change
	Self-administration in restrained mice	No change



- CONCLUSIONES...**
- La utilización de animales modificado genéticamente en modelo válido para el estudio de los fenómenos adictivos.
 - El sistema opioide, a través de los receptores de tipo mu, modula el refuerzo primario y la expresión de la dependencia física de una gran parte de las drogas de abuso.
 - El receptor kappa opioide participa en el desarrollo del proceso adictivo de una manera opuesta al que ejerce el receptor mu-opioide.
 - El sistema endocannabinoide, a través de los receptores cannabinoides CB1 representa un sistema de neurotransmisión que modula globalmente el desarrollo del proceso adictivo.
 - El sistema endocannabinoide es necesario para mantener la motivación para buscar la droga.

Laboratori de Neurofarmacologia

Rafael Maldonado
 Guadalupe Soria
 Clara Touriño
 Victoria Mendizábal
 Patricia Robledo
 Miquel Martín
 Anna Castañé
 Raquel Martín
 Fernando Berrendero
 Lola Galeote
 Jose M. Trigo
 Patricia Murtra
 Andrea Bura
 Andrés Ozaita
 Ester Aso
 Flavia Barbano

© 2011 Nature Publishing Group <http://medicine.nature.com> ARTICLES

A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking

Taoxi J. Du Yang¹, Yuesi Sui², Jinyan K. Hou², Han Cao²,
 Luciano S. Ferreira², Jerome Dreyer¹, Lena J. M. Van Erp² &
 Armin N.M. Schoffelmeer¹

¹Research Institute Translational Psychogeriatrics, Department of Health/Chemistry, H11 Medical Centre, Amsterdam, the Netherlands
²Behavioral Neuroscience, Advanced Graduate Program, Federal University of Rio de Janeiro, P.O. Box 689, Maracanã, Maracanã 215
 Complexo Estadual, CEP 22251-900, Rio de Janeiro, Brazil

► HU-210 reinstated cocaine-seeking behavior

► Rimonabant attenuated cocaine- and cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior.

Animales deficientes en prodinorfina en el estudio de la adicción

Efectos reforzantes del agonista cannabinoide THC

Bases neuroquímicas de los efectos reforzantes inducidos por las drogas de abuso

Sistemas neuroquímicos:

- dopaminérgico : refuerzo, control motor, cognición.
- opioides : nocicepción, emoción
- endocannabinoides, GABA, Glu, NA, 5HT, NPY...



Tasa de descarga de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas
 Liberación de DA en el núcleo accumbens



Sustrato neurobiológico en la
adicción de drogas

Olga Valverde

Laboratorio de Neurofarmacología
Departamento de Ciencias Experimentales y de la
Salud
Universitat Pompeu Fabra



Sustrato neurobiológico en la
adicción de drogas

Olga Valverde

Laboratorio de Neurofarmacología
Departamento de Ciencias Experimentales y de la
Salud
Universitat Pompeu Fabra



Sustrato neurobiológico en la
adicción de drogas

Olga Valverde

Laboratorio de Neurofarmacología
Departamento de Ciencias Experimentales y de la
Salud
Universitat Pompeu Fabra

Genética de la susceptibilidad individual a la drogadicción

Emilio Ambrosio Flores
Departamento de Psicobiología
Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED).

El objetivo de esta conferencia es fundamentalmente indagar en aquellos fenómenos que pueden subyacer en el hecho que todos sabemos que hay personas que son más vulnerables a los efectos reforzantes positivos de las drogas, que otros. De hecho, está prácticamente demostrado que no todo el mundo que tiene acceso al uso de una sustancia que tenga propiedades adictivas y que la consume, pues llegue a ser adicto tras ese consumo. Siguiendo con esta pequeña introducción, datos globales de las sociedades occidentales, indican que en general, personas mayores de 12 años, tienen más o menos estas características: un 60%, que nunca ha consumido una droga de abuso, un 30% de ellas habitualmente no ha fumado nunca y un 15%, nunca ha probado el alcohol. Hay también personas que tienen facilidad de acceso a drogas como los cannabinoides, la droga ilegal como saben ustedes más consumida, y de esas personas que tienen fácil acceso a esa sustancia, habitualmente el 65% lo consume, y de aquellas personas que tienen un fácil acceso a la heroína, pues en general un 16% lo consume. También sabemos que, una vez que se ha iniciado el consumo la posibilidad de continuar con el mismo, varía entre las personas. Por ejemplo, habitualmente las que se inician en el consumo de alcohol, el 90% de ellas continúan consumiéndolo, igual ocurre con el 60% de lo que se inician con el tabaco, el 19% de heroína, 8% de alucinógenos etc.

Igualmente, sabemos que hay variabilidad en la sintomatología de la dependencia y en la frecuencia del consumo. Por otro lado, es cada vez más admitido que podemos establecer distintas fases en el proceso adictivo. De hecho, se considera que hay una transición desde fases iniciales en las que pueda haber un uso e incluso un abuso importante a lo que llamamos realmente dependencia. En el Sistema Nervioso Central, un punto crítico en esa transición de modo que se producen neuroadaptaciones cerebrales específicas que de alguna manera instauran ya la dependencia. Pero estas fases de inicio, uso y abuso y dependencia, son cada vez más reconocidas. En ese sentido, cuando hablamos de genética a la susceptibilidad individual a la drogodependencia, tenemos que considerar que puede haber tanto factores endógenos como exógenos que regulen la predisposición individual al consumo de drogas y posteriormente a su dependencia.

Entre los factores endógenos cada vez más hay datos acerca de la importancia de lo que podemos llamar factores genéticos, y entre los exógenos cada vez toma más relevancia

lo que llamamos ambiente psicosocial. Obviamente la contribución diferencial de ambos factores es muy compleja, puesto que pueden operar a muy distintos niveles, o sea niveles que hemos dicho de inicio, de uso, de abuso, etc.

Si mantuviéramos constante el ambiente psicosocial, y nos centráramos solamente en los factores genéticos, ellos en sí mismos, fíjense ustedes a cuantos factores diferentes relacionados con el consumo de drogas pueden afectar. Por ejemplo, pueden afectar a las diferentes propiedades reforzantes de las drogas, o sea, en unas personas, las drogas pueden tener especiales propiedades reforzantes positivas y no en otras.

Pueden también los factores genéticos minimizar los factores protectores, haciéndolos mucho más vulnerables a las personas que consuman. Evidentemente también pueden, los factores genéticos alterar la farmacología y en general la farmacocinética de las drogas. Pueden aumentar la toxicidad de las drogas, convirtiéndolas el aumento de la toxicidad en un factor protector en muchos casos, y obviamente pueden también influir sobre rasgos de la personalidad, como la búsqueda de nuevas sensaciones y otros que cada vez más se detectan en la literatura científica.

Entonces, de algún modo podemos concluir que hay factores genéticos que contribuyen al inicio del consumo de drogas, que no tienen nada que ver con aquellos factores que contribuyen a que haya un consumo excesivo, y que tampoco tienen nada que ver con otros factores que van a contribuir o hacer que la dependencia se estanque. Dicho esto, pues por hacer un pequeño resumen también de estudios pioneros en este sentido con humanos, ustedes saben que hace tiempo se consiguió, gracias al empleo de enzimas de restricción, fundamentalmente emplear la TaqI polimerasa, pues centrarnos en el genoma y concretamente en el gen que codifica el receptor de D2 de la Dopamina, un receptor que parece importante en los efectos adictivos de las drogas, fundamentalmente por los efectos reforzantes y que gracias al empleo de este tipo de enzimas de restricción se han determinado que existen en la población humana hasta seis variantes distintas que tienen distintas cantidades de bases. Esas variantes se llaman A1, A2, B1, B2 y C1 C2. Hace más de 15 años que se hicieron estudios en este sentido, por ejemplo el grupo de George Hul en Estados Unidos, comparando la población caucásica con la población negra determinaron que personas que son politoxicómanas, o sea que consumían todo tipo de drogas, las variantes B1, C2 y A1, estaban presentes en esas personas. Además determinaron que esas variantes, en el caso de la población caucásica, no habían sufrido recombinación, pero en el caso de la población negra sí había sufrido recombinación. Estudios posteriores determinaron que en personas que fundamentalmente consumen cocaína, la variante A1, del receptor D2 de la Dopamina, el alelo en definitiva, D1, parece que es más preponderante e igualmente también la variante B1. Simplemente comentarles que incluso en diversos cromosomas humanos se han localizado esas variantes o se ha localizado esa posición y que además gracias a los estudios de neuroimagen, como por ejemplo un esquema que tienen ustedes en las diapositivas de cómo se hacen este tipo de estudios en aparatos que miden el metabolismo cerebral como nos ha explicado la Dra. Valverde, pues podemos incluso hasta determinar en personas, gracias a los estudios del grupo de Nora Volkov, si la presencia o no del receptor D2 de la Dopamina, puede inducir una mayor respuesta euforizante que otra, en distintas personas, por ejemplo, dando metilfenidato. Este grupo con niveles altos del receptor D2, parece que generan una respuesta por así decirlo no placentera. Y esa respuesta no placentera, en este caso puede ser considerada incluso un factor protector repito, mientras que niveles bajos del

receptor D2 en las personas en el cuerpo estriado, como nos señaló en su momento la Dra. Valverde, genera una respuesta mucho más placentera. Quiere decirse que en este caso, tener niveles altos del receptor D2, conferiría menor susceptibilidad a la dependencia en algunas personas. Bien, el hecho es que la combinación de estos datos que provienen hoy en día de la genética molecular y neuroimagen aplicada al estudio con humanos. El grupo de Nestler, planteaban que era posible que deficiencias en ciertos sistemas de neurotransmisores, pues de algún modo fueran los responsables de que algunos sujetos tuvieran mayor vulnerabilidad a la drogadicción, o sea que tuvieran mayor susceptibilidad a los efectos reforzantes positivos. En estudios hechos con animales vieron por ejemplo, que el número de neurofilamentos, esta es una neurona del área tegmental ventral, que como ya sabemos pues fundamentalmente proyectan sobre el núcleo acumbens. Para hacer por ejemplo, que haya una cantidad adecuada de Dopamina en los terminales de las neuronas que proyectan desde el área tegmental ventral, es necesario que haya una buena cantidad de neurofilamentos que transporten las sustancias requeridas para que sintetice Dopamina a partir de la Tiroxina-hidroxilasa.

Estos autores observaron que en algunos sujetos que tenían por así decirlo más vulnerabilidad a la drogadicción, el número de neurofilamentos era mucho menor y ya se lanzó la hipótesis de que podía haber por así decirlo deficiencias en ciertos sistemas de neurotransmisores, que de algún modo explicaran el hecho de que hubiera personas más vulnerables a los efectos positivos reforzantes de las drogas. Este tipo de planteamientos, se ha asociado también a lo que llamamos teoría de la auto-medicación en drogas en el caso de humanos, y para terminar de entre los últimos avances de esta pequeña introducción que quiero hacerles es que los estudios de neuroimagen también nos indican que el consumo de drogas parece ser que implica hipofrontalidad en áreas que tienen que ver como ya se ha dicho en la charla de la Dra. Valverde, como la toma de decisiones, áreas como la corteza prefrontal, la corteza orbitofrontal, etc. Aquí tienen datos de una persona normal, en la parte de arriba, una persona que recibió 40 miligramos por kilo de cocaína, y ven ustedes que a niveles agudos, pues se ve claramente que hay una disminución del metabolismo de la glucosa, el rojo, quiere decir, es una gran incorporación de glucosa, y azul y azul oscuro pues mucha menos incorporación. En la corteza cingulada, y en las áreas motoras y prefrontales, se observa en la fase en la cual el sujeto ha recibido la cocaína, una gran disminución del metabolismo cerebral. Cuando se hacen estudios similares de manera crónica, en ese sentido, estos han sido hechos por el grupo de la Dra. Volkov, ven ustedes igualmente como partiendo de una situación normal a un cocainómano que lleva incluso diez días de abstinencia, pues esa disminución del metabolismo cerebral en la corteza pues está claramente acusado y que incluso después de tres meses y medio la persona no ha recuperado ni muchísimo menos esa actividad cerebral.

Y por tanto, ha conducido de algún modo a la hipótesis de que en general cuando hay un consumo crónico de drogas, la parte que corresponde a la corteza, fundamentalmente la frontal y la orbitofrontal, pues está mucho más disminuida, mientras que están mucho más activas áreas que tienen que ver con el refuerzo, el impulso, la memoria, que están sub-corticales y que hacen que el sujeto funcione digamos de una manera mucho más autónoma.

Todo este conjunto de datos ha ido haciendo que poco a poco se hayan ido asociando una serie de rasgos fenotípicos al de drogadicción, y hoy día, se habla con mucha más frecuencia ya, por así decirlo, un conjunto de genes que tuvieran que ver directamente

con la drogadicción, pues se habla de que ese tipo de genes estarían asociados también con otros que tienen que ver con la búsqueda de sensaciones, con otros que tengan que ver con la atracción por el riesgo, con otros que determinen un aspecto complejo de la personalidad y que llamamos "impulsividad", con conductas desadaptadas como por ejemplo la conducta antisocial o con distintos grados de susceptibilidad y stress.

Y también, cada vez más se habla que en humanos, pues parece que pueden estar implicados una serie de transmisores como la Dopamina, la Serotonina, los opioides. Exactamente igual que como poco a poco va demostrando la investigación preclínica con animales. Bien, hecho este planteamiento, pues evidentemente no podemos olvidar que por encima de todo, lo que llamamos drogadicción, es un fenotipo, es decir, la expresión del resultado de la acción de un genotipo y de un ambiente, y de la interacción del genotipo y del ambiente, es decir que son estos tres factores que están muy, muy claramente imbricados, y es francamente muy difícil de separar. En la charla de esta mañana, y en las que vienen a continuación, ustedes habrán visto que se intenta aislar efectos genéticos individuales que tengan que ver con el consumo de una droga en particular, pero no podemos olvidar vuelvo a repetir, que la influencia del ambiente es extraordinaria, que esa extraordinaria interacción de esas dos simultáneamente, de manera que hay realmente una auténtica unión entre todos ellos, y que es muy difícil de separar.

Para que vean, digamos la importancia del ambiente en este sentido, les traigo datos aquí del grupo Brake, que ya son bastante ilustrativos a mi juicio. Miren, en este caso, se hicieron estudios con monos: Los monos evidentemente tenían la misma dotación genética, eran homogéneos genéticamente y los animales estuvieron alojados individualmente y de manera agrupada. Cuando estaban alojados individualmente y se midió el cuerpo estriado por neuroimagen, los niveles del receptor D2 de Dopamina, pues tenían los niveles que ven ustedes. Cuando por el contrario estos animales se agruparon- ya saben ustedes que se establecen relaciones de dominancia, y en los animales dominantes aumentaron los niveles receptores de D2, comparados con los del subordinado. Lo que es más interesante en este caso, es que cuando se dejó que los animales se auto-administraran droga, es este caso cocaína, eran los animales subordinados los que se auto-administraban mucha más.

Este tipo de datos eran interesantes en relación con lo que estamos estudiando, de la importancia del ambiente psicosocial, en primer lugar, porque nos dicen que en situaciones sociales los niveles de receptores pueden cambiar, y como llevamos viendo es posible que un aumento en el número de receptores concretamente de subtipo de D2, sea un factor protector.

Por tanto, hay que tener en cuenta este tipo de datos cuando en humanos hacemos estudios que tratan de determinar la importancia o la aportación de uno o un grupo de genes a un problema concreto de adicción y tenemos que fundamentalmente basarnos en estudios con animales para tratar de deslindar estos factores de los cuales estamos hablando; los genéticos, los ambientales, e incluso la interacción entre los dos que es francamente difícil de separar.

Y para ello, empleando una estrategia que corresponde al ámbito de estudio de la genética de la conducta, pues habitualmente empleamos animales homocigotos, como nos ha explicado muy bien la Dra. Valverde anteriormente, y lo que solemos hacer es modificar en este caso, las variables ambientales. Nosotros llevamos un tiempo trabajando con dos cepas de ratas que de manera espontánea, tienen distinta preferencia por las drogas y se comportan de distinto modo también, en situaciones de estrés. Empleamos

la metodología de la auto-administración intravenosa de drogas, que es la metodología, que estudia mejor, de manera directa los efectos reforzantes positivos de las drogas que consiste básicamente en que se le implanta un catéter al animal en la vena yugular, se le deja que le salga por la espalda, de manera que el animal pueda moverse libremente en una situación experimental, y apretando una palanquita o introduciendo su nariz en agujeritos, el animal recibe, se auto-administra inyecciones de sustancia.

Los primeros estudios que nosotros hicimos fue precisamente con opiáceos, empleamos programas de razón progresiva, o sea aquellos en los cuales los animales tienen que ir aumentando cada vez más el esfuerzo, para conseguir en este caso, las inyecciones de morfina, y desde el principio se vio claro que una cepa que se llama Lewis se auto-administra mucho más, y más rápidamente, droga, morfina que la cepa que se llama Fischer 3.4.4: Además este efecto parecía específico, puesto que cuando nosotros comparábamos lo que podía ocurrir con un reforzador natural como es la comida, pues no había diferencia, pero sí la había repito cuando los animales se auto-administraban morfina.

Nos preguntamos a que se podía deber ese tipo de diferencias conductuales y tratamos de indagar qué ocurría en el sistema nervioso de los animales. Extrajimos su cerebro, lo hicimos secciones y con metodologías como la hibridación "in situ", y las de auto-radiografía, tratamos de estudiar el sistema opioide precisamente. A grandes rasgos, esa metodología consiste en que una vez cortado el cerebro, se incuban con ligandos marcados radioactivamente que se unen a esos receptores y después, mediante un proceso de secado, se exponen a una película y obtenemos imágenes en negativo, que son auto-radiogramas como ustedes tienen ahí. O sea, los animales Fischer, cuando nosotros quisimos medir los niveles de expresión génica de la proencefalina que ya nos ha dicho la Dra. Valverde que es un precursor de uno de los opioides endógenos, las encefalinas, pues los animales Fischer que repito eran más resistentes, o sea menos vulnerables, menos susceptibles a los efectos reforzantes positivos de la morfina, tenían muchos mayores niveles en áreas importantes para lo que podemos llamar la recompensa, como es el cuerpo estriado de núcleo acumbens, mientras que los animales Lewis tenían muchos menores niveles, como se puede ver claramente en la diapositiva: Eso además se puede cuantificar y tanto en la estria dorsal como el núcleo acumbens, pues había claras diferencias significativas en el sentido de que los animales Lewis, que son más susceptibles, más vulnerables a los efectos reforzantes de la morfina, tenían menos expresión génica de ese precursor de las encefalinas.

Hicimos estudios similares para ver que ocurría con los receptores "mu", ya saben ustedes que los receptores "mu", son aquellas proteínas a los que se unen los opiáceos fundamentalmente, para producir reforzantes positivos, e igualmente pueden ver ustedes que hay una clara diferencia entre los animales Lewis y los Fischer. Los animales Lewis tienen menos, vuelvo a repetir el patrón ese que decimos de que los animales Lewis tienen menos receptores, menor nivel de receptores "mu" que los Fischer. Eso no solamente ocurría en áreas como las que hemos señalado antes que correspondían al cuerpo estriado del núcleo acumbens, sino a otras áreas como el tálamo, como ven ustedes aquí. En fin, queriendo seguir en esta línea, de tratar de indagar que podía ocurrir con estas dos cepas que son homogéneas genéticamente, tratamos de ver si había diferencias en lo que podemos llamar la eficacia del aprendizaje, o sea nos interesan también comportamientos entre estos animales, y para medir la eficacia en el nivel del aprendizaje, empleamos programas en los que se crean los que se llaman intervalos fijos de modo que el animal no va a poder obtener nunca un reforzador hasta que no pase un tiempo, y voy a tratar

de explicarme, o sea dejamos a los animales que durante 5 minutos no tengan acceso a la posibilidad de conseguir ningún reforzador y cuando pasen esos 5 minutos las primeras respuestas que ejecuten los animales van a ser reforzados con una bolita de comida. Y comparando esas dos razas, créanme que este tipo de datos se verifican, vimos que la eficacia del aprendizaje del animal Fischer, es muchísimo mayor que en el animal Lewis, o sea este tipo de datos se pueden tratar matemáticamente y se puede establecer lo que se llama una pendiente en la curva de respuestas y en general, en el animal Lewis da 1,67 respuestas por minuto más que el animal Fischer, para conseguir los mismos refuerzos, quiero decirles , el animal Lewis trabajaba por así decirlo mucho más para conseguir al final, la misma cantidad de reforzamiento, y en ese sentido se puede decir que el animal Lewis no ejecuta una conducta que sea adaptada. Es decir, no una conducta que tenga una buena relación esfuerzo, por así decirlo, consecución de resultados.

Cuando vemos registros acumulativos, parecidos a los que nos ha enseñado antes la Dra. Valverde, vemos que en el caso de los animales Lewis, hay un mantenimiento constante de esas respuestas, de esas presiones de palanca para obtener bolitas de comida, pero es claramente diferente lo que ocurre en los animales Fischer. Y por tanto, ese tipo de datos nos sugería, que había repito conductas desadaptadas en estos animales, y que de algún modo parecía que existía un tipo de conducta que podemos llamarla compulsiva, de modo que ante la presencia de un posible reforzador, los animales no dejaban de presionar y no tenían una estrategia ,repito, de más eficiencia, de más entre comillas inteligencia por así decirlo, para optimizar el refuerzo. Por lo tanto decidimos hacer experimentos de conducta impulsiva en animales, que se hacen también simuladamente en humanos, y que consisten básicamente en que de dos palancas que hay en la caja de condicionamiento operante, en la palanca de la izquierda, se le da al animal un refuerzo inmediato si presiona esa palanca, que consiste insisto en una bolita de comida, la magnitud la podemos llamar pequeña, pero si presiona la palanca de la derecha va a obtener un refuerzo mucho mayor, que son 5 bolitas de comida, con la condición de que el animal espere, esperaría en un primer caso 0 segundos, después 10 segundos, 20, 40 y así sucesivamente. Repito, el animal va a obtener una bolita de comida si presiona la palanca de la izquierda de manera inmediata, la bolita de comida suma una magnitud pequeña, y va a obtener 5, si presiona la palanca de la derecha, pero en ese caso la condición es que tiene que esperar. De algún modo tratamos de medir lo que llamamos conducta impulsiva en estos animales y miren los resultados indican claramente, que los animales Lewis son muy impulsivos, muy, muy impulsivos comparados con los Fischer. Además hicimos estudios de si este tipo de comportamiento basal con comida podía estar influido por la administración de distintas dosis de morfina, les dimos a los animales, cuatro dosis distintas de morfina, no había diferencias en lo que hace referencia al comportamiento basal previo que acabamos de describir, y dejamos además que los animales se auto-administraran estas 4 dosis de morfina, y vean ustedes lo que ocurre en los animales Lewis, para estos animales no importa mucho la dosis de morfina que le des, desarrollan un comportamiento muy parecido, por el contrario, si hay diferencia en el caso de los animales Fischer, fíjense la curva dosis-respuesta de los animales Lewis es prácticamente plana, se auto-administran igual cualquier dosis que le des, mientras que en el caso de los Fischer, es la dosis de 0,5 la que muestra mayor eficacia reforzante para estos animales. Este tipo de resultados en los animales Lewis especialmente nos indicó, que aparte de que haya factores de comportamiento como la conducta impulsiva, estudiada en animales de este modo, para nosotros parece claro que seguramente son también

esenciales las deficiencias en el sistema opioide que puedan tener estos animales, en lo que estos animales muestran con mayor vulnerabilidad, mayor preferencia por la morfina en los estudios de auto-administración, o sea que habría factores, vamos a llamarlos así, endógenos, que estarían relacionados seguramente con los niveles de opioides que hay en el sistema nervioso de estos animales, y también unos factores, entre comillas, si ustedes quieren de personalidad de la rata, que tendrían más que ver con esa conducta impulsiva que estamos diciendo.

Bueno, en ese sentido, quisiéramos sacar unas conclusiones: la mayor susceptibilidad que tiene esta animal para los efectos reforzantes positivos de la morfina, tienen que ver; con diferencias en los elementos reguladores de la transmisión opioidérgica y también con una mayor conducta impulsiva. Hemos seguido investigando en esta línea y preguntándonos ¿En aquellos sujetos más vulnerables, o sea los animales Lewis, el consumo de droga, concretamente morfina, produciría además adaptaciones neuroespecíficas? Y en este sentido, en colaboración con el Dr. Javier de Felipe del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, hemos hecho una serie de estudios midiendo los cambios neuromorfológicos en las células piramidales de la corteza. Por hacerles un pequeño resumen a ustedes para que vean como son este tipo de neuronas, son neuronas que suelen tener un árbol dendrítico basal muy grande. Las neuronas de la corteza piramidal, en todos los mamíferos son extraordinariamente importantes puesto que integran el 80% de toda la información que llega a nuestro sistema nervioso. Estas neuronas abundan en la corteza frontal, en la corteza órbito-frontal y otras como la cingulada y nos pareció interesante hacer este tipo de estudios en estos animales.

Para ellos el grupo de Javier de Felipe inyectó amarillo lucifer que es un colorante que se puede inyectar directamente en las neuronas, es un procedimiento muy demandante puesto que los animales nada más acabar la auto-administración tienen que ser inyectados, ven ahí lo que se marca con el cursor es una pipeta, una punta de una pipeta y lo que está marcado con la flecha en negro, son neuronas. Todas esas cositas blanquitas que ustedes ven, son neuronas. Había que hacer inyecciones durante 36 horas seguidas y el hecho es que un porcentaje alto de neuronas incorporan el colorante y cuando lo incorporan así se ve la neurona.

Con programas estadísticos adecuados, este tipo de neuronas se pueden estudiar, o sea el árbol dendrítico, se puede ir marcando por distintas fases. Se puede averiguar la longitud de cada una de las dendritas, se puede saber si hay más o menos espinas dendríticas en cada una de ellas, ya saben que es en las esquinas donde se cree que se unen cada uno de los botones sinápticos, de neuronas que proyectan sobre las piramidales etc. Y haciendo este tipo de estudios nosotros comparamos distintos parámetros como por ejemplo el área basal de las dendritas, la longitud del árbol dendrítico basal, el número total de espinas, etc. Y los datos son muchos, hay muchas tablas, muchas imágenes y yo no quiero pues abrumarles a ustedes con todo este tipo de datos y les he traído aquí resumidos pues realmente lo más interesante de la comparación entre esas dos razas, después repito de que se hayan auto-administrado morfina. O sea el experimento era que los animales se auto-administraban morfina e inmediatamente después se hacía este estudio de neuromorfología con estos animales. Entonces fíjense, se producen una serie de cambios neuromorfológicos en los animales Lewis que no se producen en los Fischer. Repito que los Fischer son los más resistentes por así decirlo, y entre ellos los más relevantes son; que hay un aumento de la longitud de las dendritas en la corteza prelímbica y también un

incremento del número de espinas en esa área de la corteza cerebral, siempre hablando de las células piramidales. Hay una disminución del número de ramas del árbol dendrítico en la corteza frontal y también hay un aumento del número de espinas en la corteza motora y lo que es más relevante en los animales Fischer que se han auto-administrado morfina ninguno de estos cambios se produce. Parece entonces que en los sujetos más vulnerables es donde se originan esas neuroadaptaciones específicas, y por tanto para concluir un poquito pues desde nuestro punto de vista, parece que factores genéticos asociados a ciertos rasgos comportamentales, pueden inducir neuroadaptaciones específicas que por el contrario, van a generar drogodependencia, o sea si este tipo de datos nosotros los generalizáramos a humanos de algún modo tratamos de decir que puede que en algunas personas haya ciertos genes o grupos de genes que de alguna manera induzcan una susceptibilidad especial a la drogadicción.

En ese tipo de personas puede haber además asociado con esos genes, o sea que se hayan transmitido juntos, incluso a lo mejor genes digamos ligados con esos. Se han podido transmitir digamos rasgos comportamentales como algunos que hemos citado, por ejemplo el de búsqueda de sensaciones, o el de impulsividad o el de aprecio por conductas de riesgos, y a eso sujetos los ha hecho más vulnerables a los efectos adictivos de las drogas. Esos sujetos se han hecho consumidores crónicos de esas drogas. En ellos se han producido neuroadaptaciones y además se ha generado ya ese cambio, ese punto que decíamos en el Sistema Nervioso Central, que induce lo que llamamos drogodependencia y que hace que el sujeto sea, pues un sujeto dependiente toda su vida, en el sentido de que aunque deje de consumir la sustancia será siempre un exadicto. Nosotros no sabemos si en humanos puede ocurrir igual, pero desde luego estos datos con estos animales apuntan en esta dirección. Y puesto que esto es una mesa de debate y reflexión, luego no se si habrá debate y habrá reflexión, pero yo quería de alguna manera exponerles que a mi me parece interesante que debatamos sobre este tipo de cuestiones en el sentido de que si esto es así quizá la política científica que deben de tomar los distintos países respecto a las drogas, sea más de indagar en este tipo de factores, vamos a llamarlos genéticos y comportamentales, con el objeto de alguna manera de identificar poblaciones vulnerables y tratar de centrar por así decirlo, la mayor carga de recursos en esas personas. Si les parece interesante este tipo de reflexiones pues lo comentamos luego. Por último, simplemente quería dar las gracias a todas las personas que aquí tienen ustedes, que me ayudan a hacer estas investigaciones y dar las gracias al Plan Nacional sobre Drogas y al Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación que nos da y que nos permite continuar en esta línea. Muchas gracias a todos ustedes por su atención.

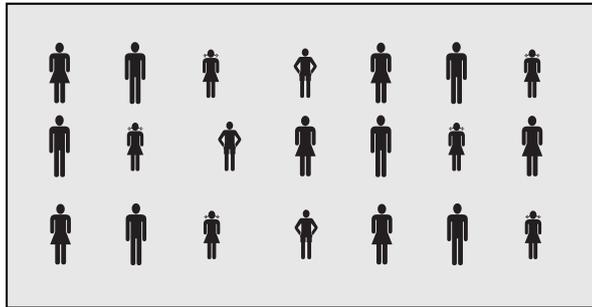


GENÉTICA DE LA SUSCEPTIBILIDAD INDIVIDUAL A LA DROGADICCIÓN

EMILIO AMBROSIO FLORES

Departamento de Psicobiología
UNED

VULNERABILITY TO DRUG ADDICTION



INTRODUCCIÓN

- LAS PERSONAS SON DIFERENTES EN LO QUE SE REFIEREN A LA VULNERABILIDAD A LA DEPENDENCIA DE DROGAS.
- NO TODO EL MUNDO QUE TIENE ACCESO AL USO DE UNA SUSTANCIA ADICTIVA LA CONSUME, NI TODO EL QUE LA CONSUME LLEGA A SER ADICTO.

INTRODUCCIÓN (cont.)

PERSONAS MAYORES DE 12 AÑOS:

- 60% NUNCA HA CONSUMIDO UNA DROGA DE ABUSO.
- 30% NUNCA HA FUMADO.
- 15 % NUNCA HA PROBADO EL ALCOHOL.

PERSONAS CON ACCESO A CANNABINOIDES:

- 65% LO CONSUMEN.

PERSONAS CON ACCESO A HEROÍNA:

- 16% LO CONSUMEN.

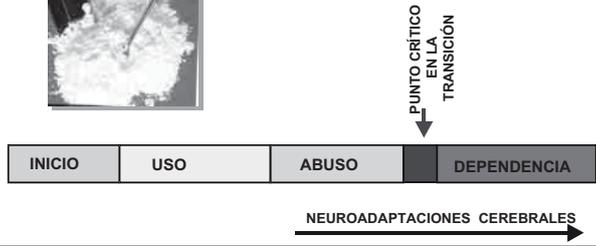
INTRODUCCIÓN (cont.)

LA POSIBILIDAD DE CONTINUAR CON EL CONSUMO TAMBIÉN VARIA ENTRE PERSONAS:

- 90% CONTINUAN CONSUMIENDO ALCOHOL.
- 60% TABACO.
- 19 % HEROÍNA.
- 8% ALUCINÓGENOS

HAY TAMBIÉN VARIABILIDAD EN LA SINTOMATOLOGÍA DE LA DEPENDENCIA Y EN LA FRECUENCIA DEL CONSUMO

TRANSICIONES EN EL DESARROLLO DE LA DEPENDENCIA DE DROGAS

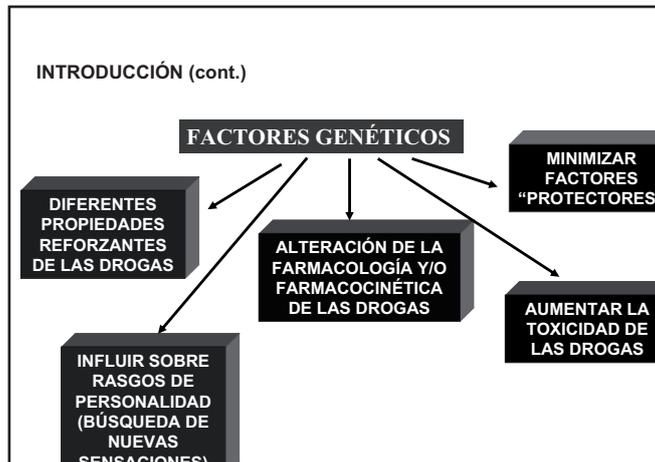


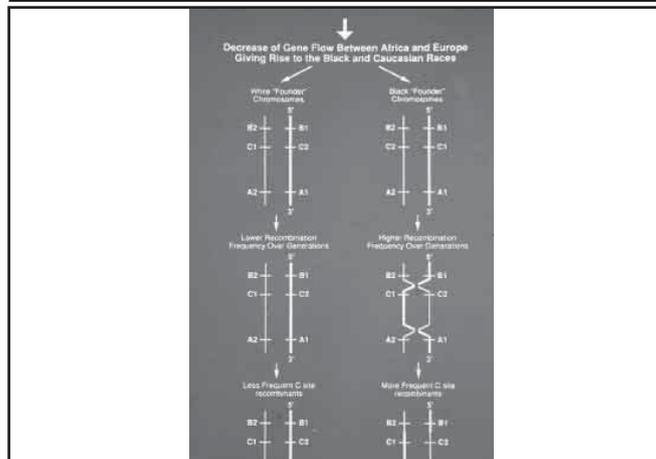
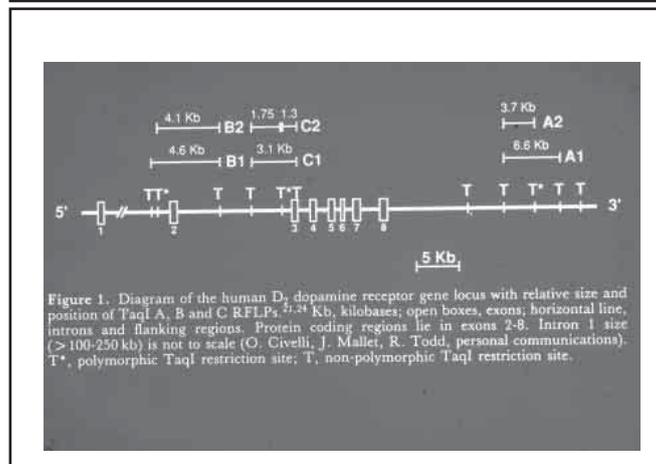
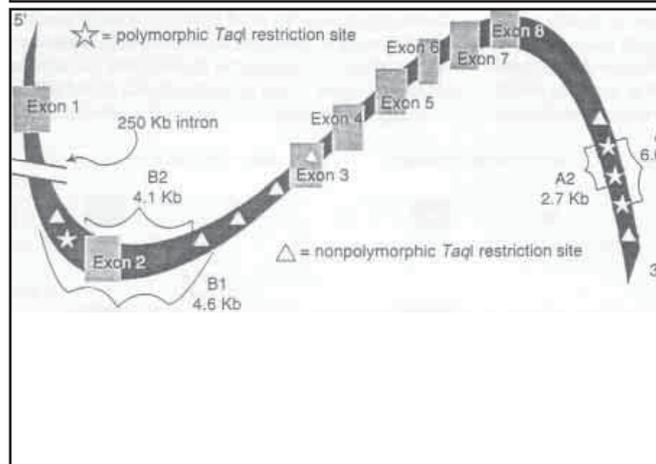
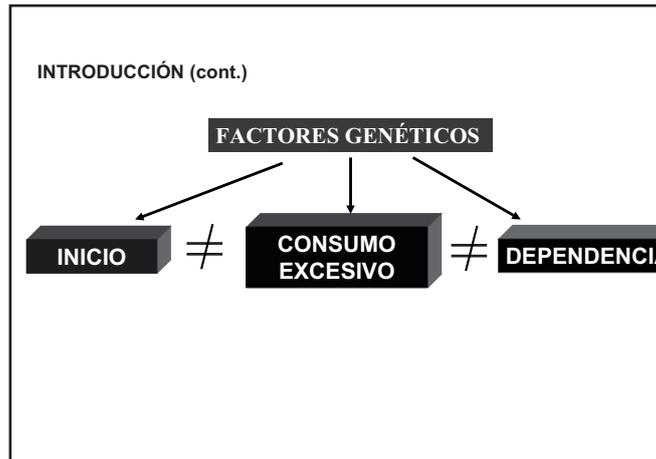
INTRODUCCIÓN (cont.)

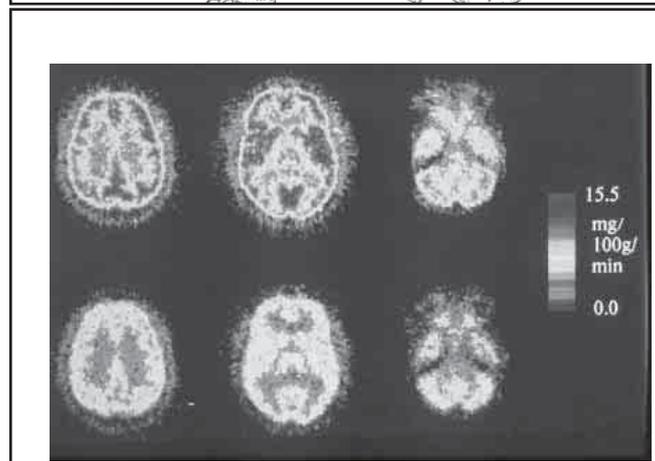
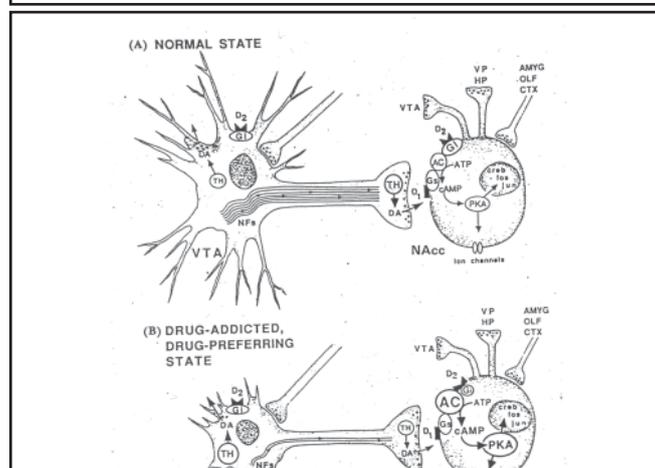
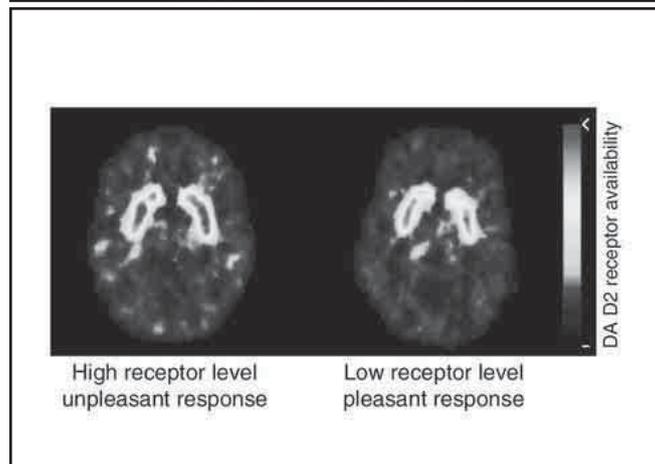
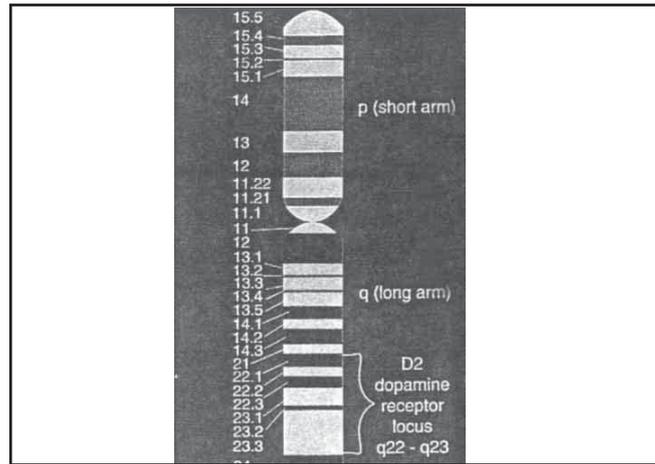
HAY FACTORES ENDÓGENOS Y EXÓGENOS QUE REGULAN LA PREDISPOSICIÓN INDIVIDUAL AL CONSUMO DE DROGAS Y EL PASO DEL USO DE UNA DROGA A SU ABUSO.

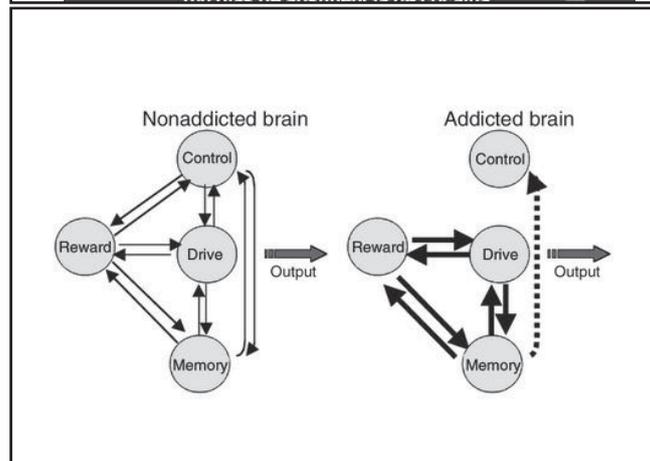
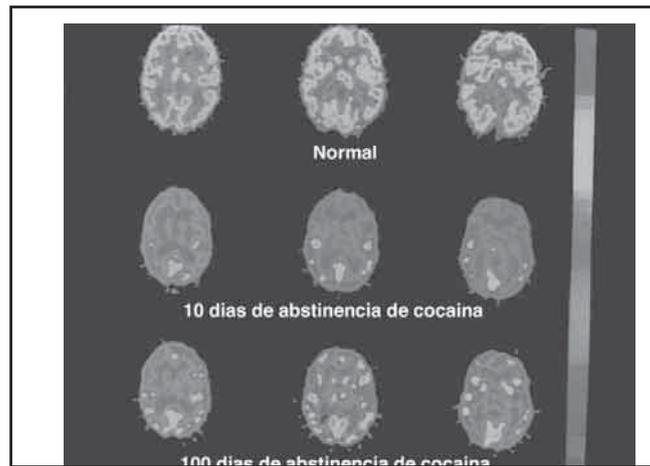
- **ENDÓGENOS:** ----- GENÉTICOS
- **EXÓGENOS:**----- AMBIENTE PSICOSOCIAL

LA CONTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE AMBOS FACTORES ES MUY COMPLEJA, YA QUE PUEDEN OPERAR A MUY DISTINTOS NIVELES.









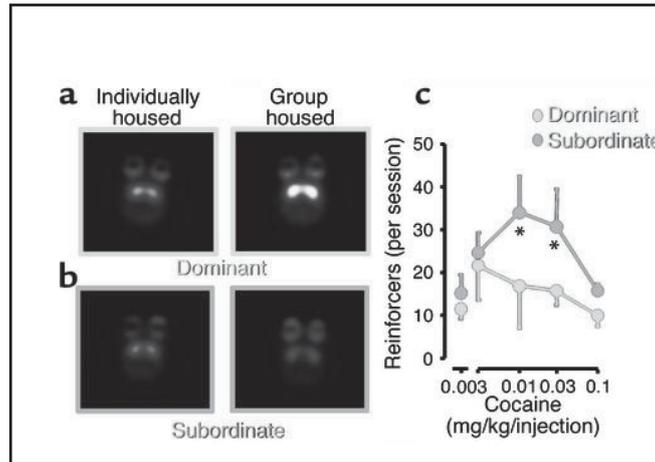
Rasgos fenotípicos asociados al de drogadicción

1. Búsqueda de sensaciones
2. Atracción por el riesgo
3. Impulsividad
4. Conductas desadaptadas(p.e. condta antisocial)
5. Grados de susceptibilidad al estrés

Neurotransmisores implicados:

- Dopamina
- Serotonina

$$\text{FENOTIPO} = \text{GENOTIPO} + \text{AMBIENTE} + \text{INTERACCIÓN G x A}$$

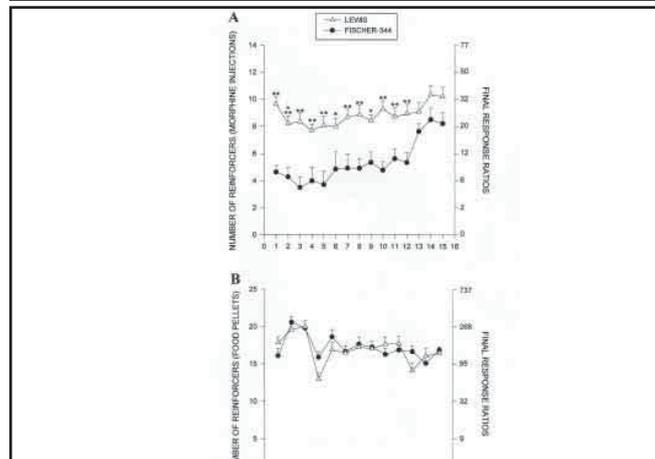


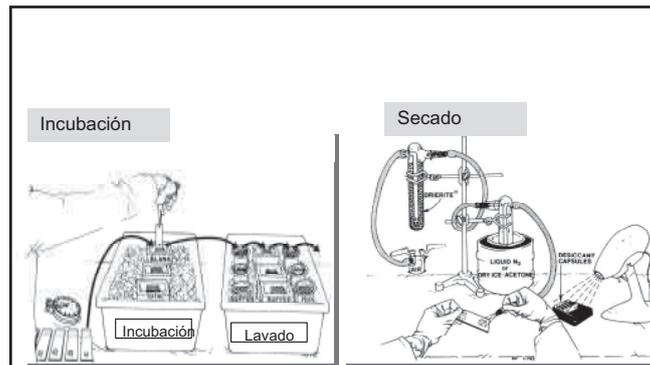
ENFOQUE DE LA GENÉTICA DE LA CONDUCTA.

- UTILIZACIÓN DE ANIMALES HOMOCIGOTOS
- MODIFICACIÓN DE LAS VARIABLES AMBIENTALES



Caja clásica de autoadministración

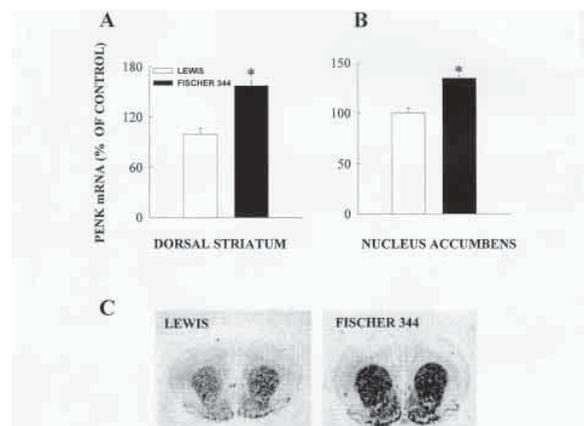
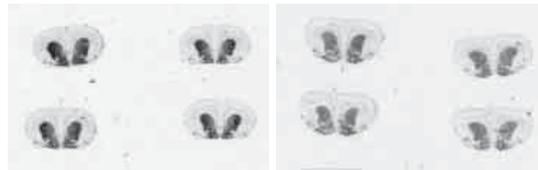




BASAL LEVELS OF PROENKEFALINE GENE EXPRESSION

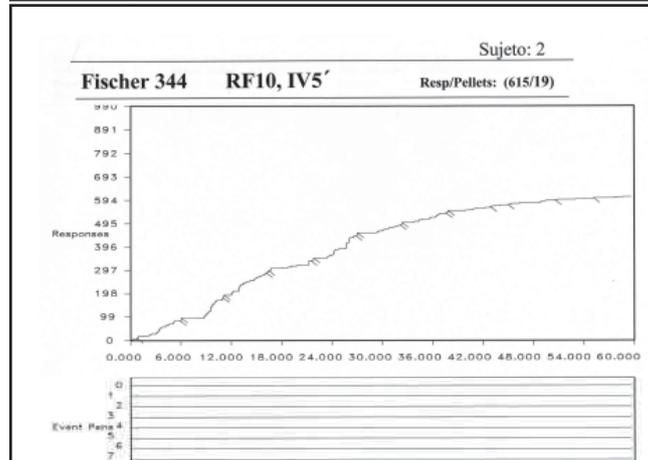
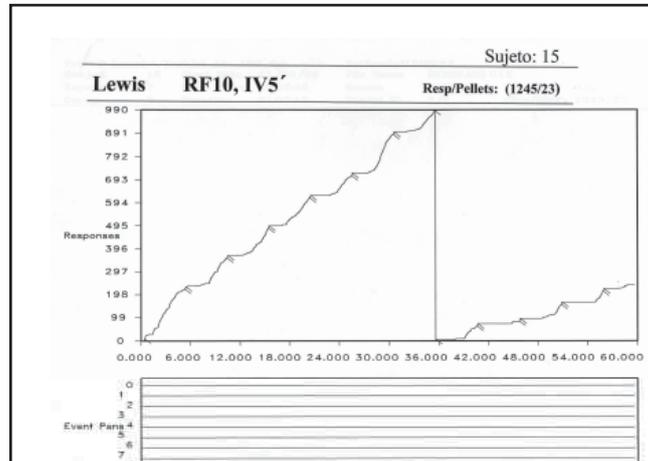
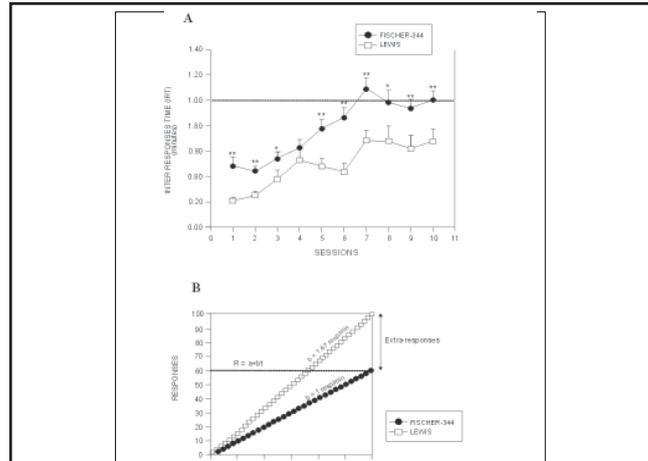
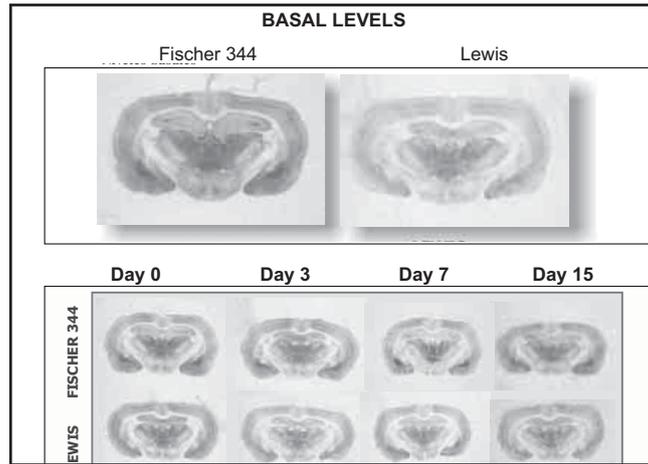
FISCHER 344

LEWIS



BASAL LEVELS





PROCEDIMIENTO PARA EL ESTUDIO OPERANTE DE LA CONDUCTA IMPULSIVA

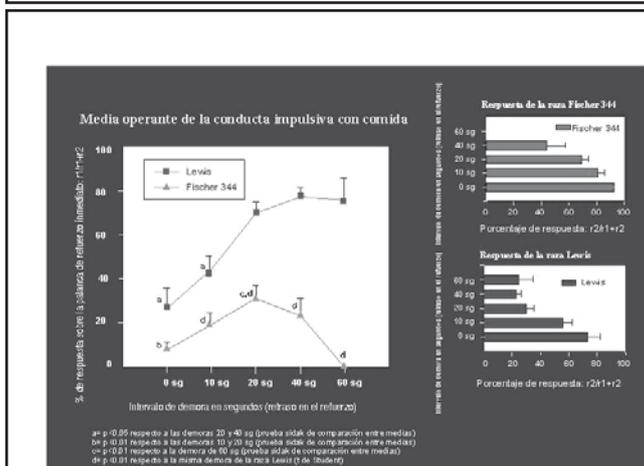
ELECCIÓN DE UN REFORZADOR

INMEDIATO - MAGNITUD PEQUEÑA UNA BOLITA DE COMIDA

DEMORADO - MAGNITUD MAYOR CINCO BOLITAS DE COMIDA

TIEMPOS DE DEMORA:

0, 10, 20, 40, 60 segundos



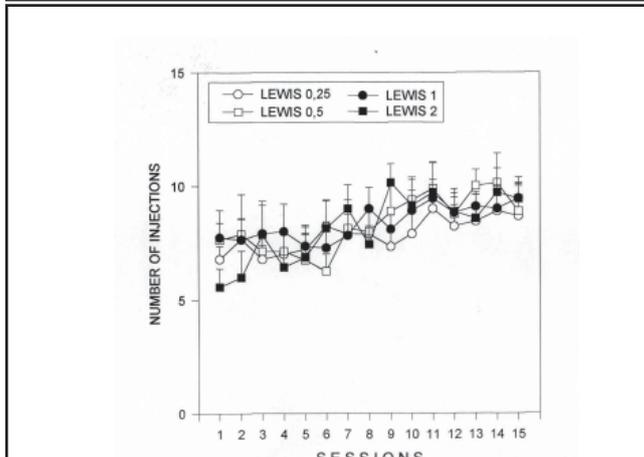
CURVA DOSIS-RESPUESTA

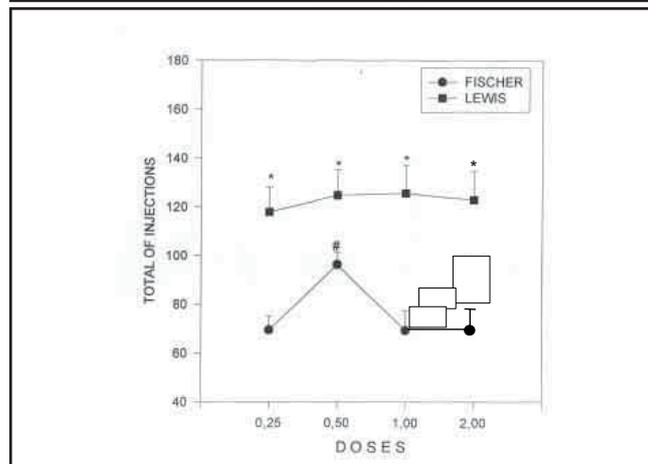
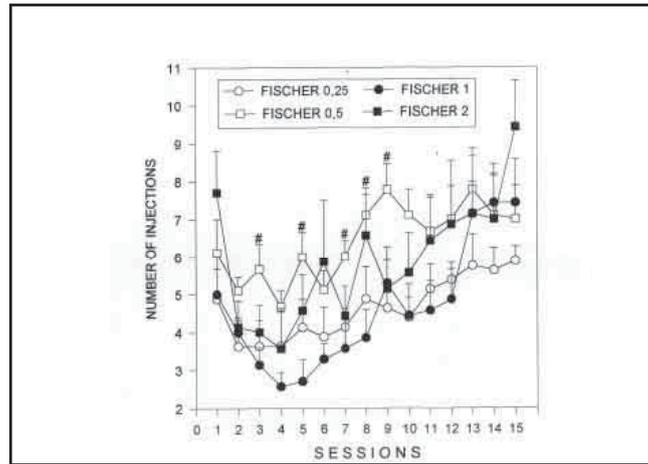
DOSIS DE MORFINA:

0,25 - 0,50 - 1 - 2 mg/Kg de peso

AUTOADMINISTRACIÓN INTRAVENOSA

Duración de la sesión: 12 horas





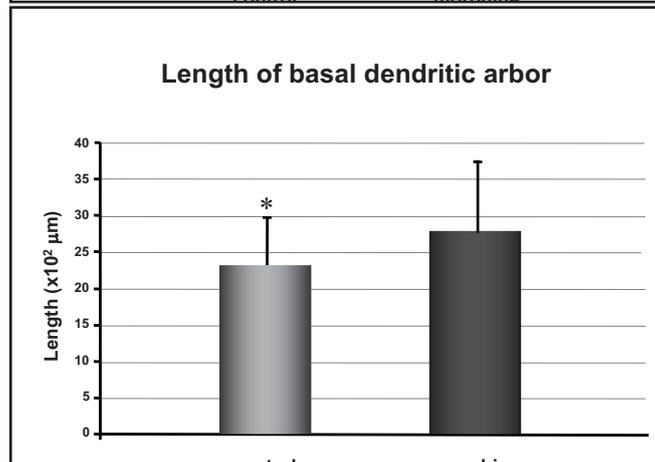
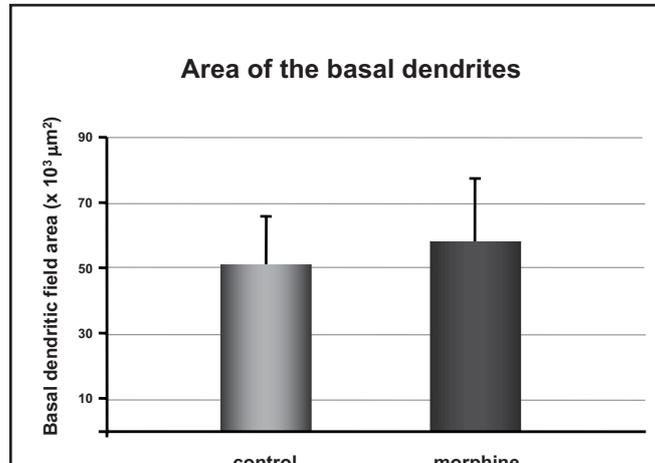
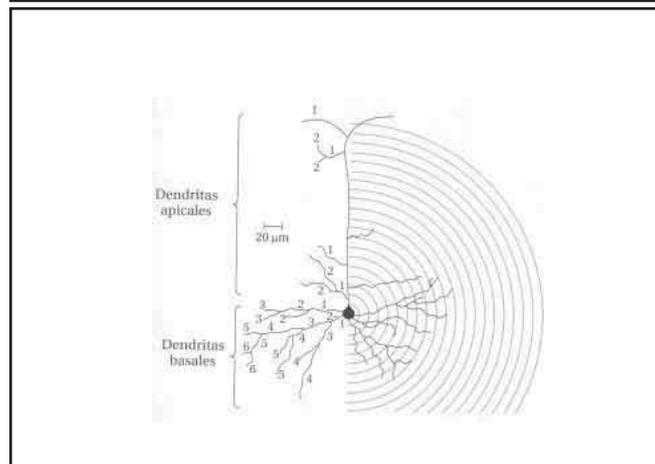
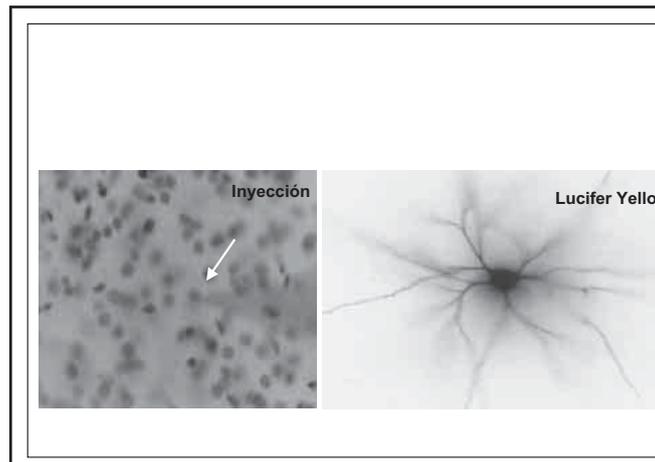
Algunas conclusiones

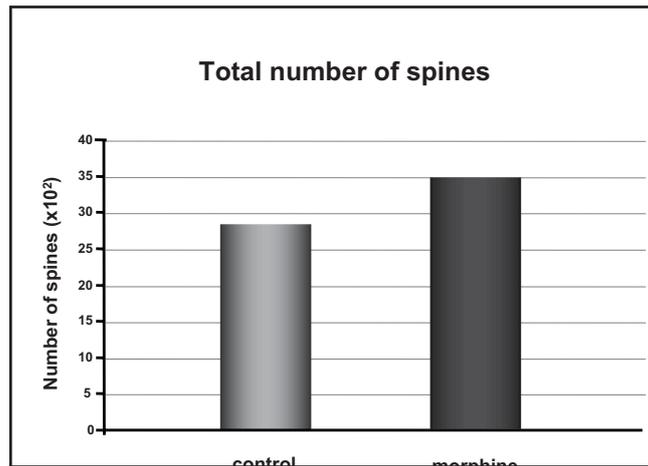
La mayor susceptibilidad de la cepa Lewis a los efectos reforzantes positivos de los opiáceos puede estar asociada a:

- diferencias en elementos reguladores de la transmisión opioidérgica
- una mayor conducta impulsiva

¿En aquellos sujetos más vulnerables el consumo de drogas produce además neuroadaptaciones específicas?







CAMBIOS NEUROMORFOLÓGICOS EN LAS CÉLULAS PIRAMIDALES DE LA CORTEZA CEREBRAL PRODUCIDOS POR EL CONSUMO DE OPIÁCEOS EN LA CEPA LEWIS Y NO EN LA FISCHER 344

1. Aumento de la longitud de las dendritas en la corteza prelímbica e incremento del número de espinas en las células piramidales de la corteza cerebral.
2. Disminución del número de ramas del árbol dendrítico en la corteza frontal.
3. Aumento del número de espinas en la corteza motora

NINGUNO DE ESTOS EFECTOS SE PRODUJERON EN LA CEPA FISCHER 344

FACTORES GENÉTICOS

asociados con  Neuroadaptaciones específicas

CIERTOS RASGOS COMPORTAMENTALES


Drogo dependencia

AGRADECIMIENTOS

- Jose Antonio Crespo Fernández
- Rosa Ferrado Chamorro
- Carmen García Lecumberri
- Alejandro Higuera Matas
- Sonsoles Martín Jiménez
- Miguel Miguéns Vázquez
- Pilar Sánchez Cardoso
- Isabel Torres Carbonell

Financiadas por: Plan Nacional sobre Drogas 2004-2007 y MEC (SAF2004-08148)

PARTE III B. MESA DE DEBATE Y REFLEXIÓN: GENÉTICA Y ALCOHOLISMO

Modera:

Gabriel Rubio Valladolid.
Coordinador del Programa de Alcoholismo.
Servicios de Salud Mental del Distrito de Retiro. Madrid.

Factores genéticos dopaminérgicos y cannabinoides en la comorbilidad adictiva de los pacientes psiquiátricos.

Guillermo Ponce Alfaro.
Servicio de Psiquiatría.
Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid.

Factores genéticos en la patogenia de la hepatopatía alcohólica.

Jose Maria Ladero Quesada.
Departamento de Medicina de la Universidad Complutense. Madrid.
Jefe de Sección del Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

Polimorfismos del ADN en el alcoholismo.

Isabel Julia Pastor Encinas.
Unidad de Alcoholismo. Servicio de Medicina Interna II.
Hospital Universitario de Salamanca.

Factores genéticos dopaminérgicos y cannabinoides en la comorbilidad adictiva de los pacientes psiquiátricos

**Guillermo Ponce Alfaro.
Servicio de Psiquiatría.
Hospital Universitario 12 de Octubre**

Buenas tardes. Muchas gracias a la Sociedad por haberme invitado, gracias a Gabriel Rubio por su presentación y a todos los presentes

Voy a hablar de los aspectos genéticos relacionados con la co-morbilidad en adicciones. La amplísima co-morbilidad, sobre todo para algunos trastornos, es un tema de todos conocido. Los siguientes casos de comorbilidad quizás sean los más representativos tanto por su cuantía, por la cantidad numérica de las proporciones de co-morbilidad, como por la importancia clínica de cada una de estas situaciones. Es muy conocida la co-morbilidad de esquizofrenia y adicciones. También desde hace unos años se ha hecho mucho hincapié en el alto porcentaje de antecedentes de trastorno hiperactivo en las adicciones, que sería una importante condición de vulnerabilidad al desarrollo de las mismas y que además determinan características muy especiales en las adicciones. Sobre todo en el alcoholismo podemos ver claramente un patrón clínico caracterizado por grandes consumos, grandes embriagueces, importantes trastornos de conducta relacionados con la presencia de este trastorno. Se trata de un caso de especial interés para la investigación de los factores biológicos subyacentes a ambos tipos de trastorno. Y por último, el trastorno antisocial de personalidad, y más específicamente la psicopatía como carácter nuclear de los trastornos antisociales.

Hablar de genética en el caso del alcoholismo, es hablar obligatoriamente de todos los datos existentes acerca de la implicación del polimorfismo TaqI-A, relacionado con el receptor D2, aunque ya se comentará con qué peculiaridades. Se ha encontrado una elevada prevalencia del alelo denominado TaqI-A1, o simplemente alelo A1 para este polimorfismo en pacientes alcohólicos, tal como lo describió primeramente Blum en 1990, y posteriormente por autores como Noble y Comings.

Posteriormente se suscitó una importante polémica, dado que otros grupos no encontraban esta asociación. Se demostró que era especialmente difícil diferenciar bien las muestras, de forma que se encontraba más claramente asociado cuando las muestras de alcohólicos estaban representadas sobre todo por pacientes más graves, y los controles estaban bien estudiados para descartar otras condiciones adictivas que pudieran de alguna forma contaminar las asociaciones.

Es importante remarcar que lo que Blum y demás autores consideraron alcoholismo grave, se refiere a un alcoholismo caracterizado por mayor frecuencia o intensidad de la patología médica. A los profesionales que trabajamos en países mediterráneos nos puede parecer contradictorio, dado que a veces nos costaría decir, que determinados alcohólicos que quizás sí que tengan hepatopatías severas, sean los alcohólicos más graves, ya que con mucha frecuencia éstos son los alcohólicos que tienen un consumo más regular, con menos trastornos de conducta, con una mayor conservación de su medio familiar, laboral etc., y que precisamente esto es lo que ha permitido que persista el consumo durante mucho tiempo, sin ponerse en tratamiento, y por lo tanto debutar la mayoría de las veces en los dispositivos con patología médica. Es posible que en un medio anglosajón, donde el patrón de consumo es diferente, la presencia de patología médica si que pueda considerarse un criterio de gravedad general con ciertas peculiaridades distintas a lo que ocurre en nuestro medio.

El alelo A1 no solamente se ha asociado a alcoholismo, sino también a otras adicciones, por ejemplo cocaína, opiáceos y también tabaco, lo que nos daría idea que el alelo A1 en realidad es un marcador de una mayor vulnerabilidad a desarrollar adicciones a todas aquellas sustancias que tienen capacidad de inducirla, y que no es algo exclusivo del alcohol. Además no es exclusivo tampoco de las sustancias adictivas, no parece que tenga ver con alguna vulnerabilidad al efecto químico de las sustancias, sino que también lo vemos representado en otros trastornos del control de impulsos como el juego patológico, la obesidad o rasgos de personalidad caracterizados por la impulsividad, por la búsqueda de sensaciones.

El polimorfismo TaqI-A se localiza en la región no traducida en el extremo 3' del gen para el receptor dopaminérgico D2. No se reflejará, por tanto, en la estructura de la proteína, y tampoco se localiza en el promotor. En principio no es un polimorfismo funcional, pero se consideraba que de alguna manera estaría dando información sobre determinados haplotipos presentes en el gen, de alguna forma sería una especie de marcador de lo que está ocurriendo dentro del gen.

En nuestro equipo, al estudiar el papel que tiene este marcador genético en el alcoholismo, hemos encontrado que con lo que se asocia es con trastornos de conducta de la línea antisocial. En un primer trabajo encontramos una asociación con el diagnóstico de trastorno antisocial de personalidad, y posteriormente hemos podido comprobar que con lo que se asocia específicamente la presencia del alelo A1, es con la presencia de rasgos psicopáticos nucleares, es decir los rasgos caracterizados por ausencia de culpa y falta de empatía, el núcleo psicopático de los trastornos antisociales. En un estudio en el que el alelo A1 se estudia en conjunción con otros polimorfismos relacionados con el receptor cannabinoide, encontramos que el alelo A1, además de determinados alelos para el receptor CB1, y para la enzima FAH que degrada la anandamida, se asocia con psicopatía. Estos tres polimorfismos mostraron un efecto aditivo.

Dada la hipótesis de que el alelo A1 sería un marcador de lo que está ocurriendo dentro del receptor D2, se ha estudiado su relación con otras variaciones genéticas internas de este gen. El polimorfismo que más se ha estudiado sin duda es el denominado C957-T, sí que localizado en una región codificante, en el exón 7, aunque es un polimorfismo silente: Hay un cambio en el triplete, pero codifica para el mismo aminoácido, por lo que no se va a traducir en un cambio estructural de la proteína. Sí se ha encontrado que afecta a la estabilidad del RNA, y, sobre todo, a la síntesis del receptor. No se va a afectar por lo tanto, la función del receptor, pero sí, el número de receptores disponibles.

Los portadores del alelo C, tienen, por tanto, mayor número de receptores, y sobre todo, van a producir un mayor número de receptores en una situación de exceso de dopamina, porque hay una regulación al alza del receptor D2 en presencia de aumento de dopamina. Este fenómeno va a ser clave en el caso de la esquizofrenia, donde sabemos que existe tanto un aumento de dopamina como un aumento de receptores D2, y por lo tanto, los individuos que portan este alelo presentarían una situación compatible con este supuesto. Cuando se habla de este polimorfismo, es frecuente hablar del alelo "T" como la variante, porque primeramente se definió el alelo C. Sin embargo, el alelo C, el que está relacionado con una mayor cantidad de receptores, es la forma más de aparición más reciente, la que ha aparecido más tardíamente en la evolución. Por tanto, el alelo T es realmente el alelo salvaje, y es el que tienen en exclusiva los primates más estrechamente relacionados con el hombre.

Por otro lado, el alelo A1, que hasta ahora estábamos considerando como un marcador de lo que ocurría en el receptor D2, sabemos en la actualidad que forma parte de otro gen, de un gen adyacente que se lee en sentido contrario, el gen denominado ANKK1, que codificaría una proteína con actividad quinasa que todavía no ha sido plenamente caracterizada. En esta proteína, la presencia del alelo A1 sí que provocaría un cambio funcional, porque daría lugar a un cambio de un aminoácido por otro. Es decir, no es un mero marcador el alelo A1, sino que puede tener un impacto importante que todavía no es bien conocido. De hecho, en nuestro equipo hemos encontrado que el alelo A1 y el alelo C-957, aunque se encuentran asociados de forma similar en alguna condición como el alcoholismo y la psicopatía, lo cual puede tener que ver con su proximidad, se van a asociar por otra parte con rasgos fenotípicos totalmente distintos lo cual nos indica que no estamos viendo simplemente una contaminación por cercanía. Hemos comprobado que el alelo A1 se asocia con alteraciones en las pruebas neuro-psicológicas, sobre todo las relacionadas con la impulsividad; se asocia con variaciones en los niveles de 5-hidroxi-indolacético, el metabolito de la serotonina; y se reasocia también con un aumento de la latencia en la onda P-300. Estas asociaciones no las hemos encontrado con el polimorfismo C-957, cuando controlamos el efecto combinado de ambos. En cambio, sí que hemos encontrado que el polimorfismo C-957 se asocia con variaciones en los niveles de ácido homovanílico, lo cual estaría más en relación con su función en el sistema dopaminérgico. Por otro lado, también hemos encontrado una asociación con esquizofrenia, de forma que en población esquizofrénica española encontramos una sobrerrepresentación del genotipo "CC" para el polimorfismo C957T, el genotipo que estaría asociado a un mayor número de receptores dopaminérgicos. Este estudio es una replicación de un estudio realizado en Australia, con población en principio también caucasiana aunque es de suponer que más heterogénea.

Brevemente, expondré algunos datos obtenidos por nuestro equipo acerca de determinados marcadores genéticos en el caso del trastorno hiperkinético, condición que previamente señalaba como importante factor de vulnerabilidad. En un primer momento, ya encontramos una asociación entre un polimorfismo para el gen que codifica el receptor cannabinoide CB1. Encontramos que en los pacientes alcohólicos con antecedente de trastorno hiperkinético durante la infancia, existe una mayor proporción de esta variante genética, la denominada de alelos largos. Este polimorfismo es un microsátélite, que tiene varias posibilidades y están divididos en fragmentos largos o cortos. En los alcohólicos con antecedente de trastorno hiperkinético, observamos una sobrerrepresentación de estos alelos, mientras que en los alcohólicos que no eran hiperkinéticos de pequeños, la

proporción es similar a la que hay en controles. Estos datos parecen indicar, por tanto, que sería un marcador más relacionado con el trastorno hiperkinético que con el alcoholismo. Posteriormente hemos podido comprobar una peculiar asociación con el funcionamiento adrenérgico en estos pacientes: en los pacientes alcohólicos no hiperkinéticos, el genotipo para el gen del receptor CB1 no tiene ninguna asociación con los niveles del metabolito de noradrenalina en la orina, el ácido vanilmandélico. En cambio, entre los pacientes hiperkinéticos, aquellos pacientes que tienen la variante genética no relacionada con el trastorno hiperkinético, la forma corta, tienen niveles muy bajos de ácido mandélico. Esto es lo que se ha encontrado en general, en muestras de niños hiperkinéticos. Los pacientes que portan la forma larga, aun cuando son con más frecuencia hiperkinéticos, no tienen la disminución de ácido vanilmandélico característica de los pacientes hiperkinéticos. Es decir habría un grupo de pacientes hiperkinéticos en los que la causa primaria sería un trastorno del funcionamiento adrenérgico, como se ha propuesto abundantemente, y por otro lado habría un grupo de pacientes con clínica de trastorno hiperkinético relacionada con el funcionamiento cannabinoide o posiblemente el dopaminérgico modulado por el primero, pero que no tienen una alteración adrenérgica.

En cuanto a las principales conclusiones, indicar en primer lugar que parece claro que las adicciones presentan una elevada co-morbilidad con otros trastornos que están relacionados con el funcionamiento dopaminérgico, y por lo tanto, las alteraciones genéticas de este sistema, y también de los sistemas de transmisión que modulan el sistema dopaminérgico, pueden favorecer que se exprese clínica, tanto en el sentido de la adicción, como en el sentido de la clínica psicótica, o de personalidad, o en el trastorno hiperkinético en la clínica de la impulsividad. Los polimorfismos relacionados con el gen del receptor dopaminérgico D2 son los que hasta ahora han demostrado jugar un mayor papel en estas patologías. Nuestro equipo, además, ha aportado una serie de datos acerca de la implicación del sistema cannabinoide a través de los polimorfismos para el CB1 y la FAAH.

Por último, no queda más que reseñar la importancia del papel realizado en estos trabajos por el laboratorio de Genética, dirigido por la Dra. Janet Hoenicka, y por parte de los Profesores Evelio Huertas de la Facultad de Psicología, y José Antonio Ramos de la Facultad de Medicina, el Dr. Gabriel Rubio y el resto del equipo clínico del Servicio de Psiquiatría del Hospital 12 de Octubre, dirigido por el Dr. Jiménez-Arriero bajo la coordinación general del Dr. Tomás Palomo. Muchas gracias a todos.

INVESTIGACION GENÉTICA EN COMORBILIDAD ADICTIVA

UNIDAD DE CONDUCTAS ADICTIVAS Y PATOLOGÍA DUAL

SERVICIO DE PSIQUIATRÍA

HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE



patología dual

- **Esquizofrenia** y patología dual: **ECA** (Regier et al., 1990)
 - 47% de los esquizofrénicos tienen una drogodependencia comórbida (OR=4.6)
- Prevalencia de adicciones en pacientes con **TDAH** (Biederman et al, 1993; Manuzza et al, 1993)
 - entre el 17 y el 45% de los niños con TDAH tienen abuso-dependencia de alcohol en la vida adulta
 - entre el 9 y el 30% de los niños con TDAH tienen abuso-dependencia de otras sustancias en la vida adulta
- personalidad **antisocial** y adicciones
 - Trastorno por alcohol en pacientes con T. Antisocial: 73.6% (OR=21)
 - Trastorno por cualquier sustancia en pacientes con T. Antisocial: 83.6% (OR=29.6)
 - Trastornos por sustancias en población reclusa con T. Antisocial: 90%

A1 y alcoholismo

Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, et al.

ALLELIC ASSOCIATION OF HUMAN DOPAMINE D2 RECEPTOR GENE IN ALCOHOLISM.

JAMA 1990; 263: 2055-2060.

Presencia del alelo A1 en 69% de los alcohólicos frente a 20% de los controles

A1 y alcoholismo

Noble EP.

ASSOCIATION OF THE D2 DOPAMINE RECEPTOR A1 ALLELE WITH ALCOHOLISM: MEDICAL SEVERITY OF ALCOHOLISM AND TYPE OF CONTROLS.

Biol Psychiatry 1997 41:386-393.

Noble EP.

THE D2 DOPAMINE RECEPTOR GENE: A REVIEW OF ASSOCIATION STUDIES IN ALCOHOLISM AND PHENOTYPES.

Alcohol 1998; 16; 33-45.

El alelo A1 es más prevalente en los alcohólicos más graves, y menos en los controles bien estudiados

A1 y adicciones

A1 y adicciones

Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, Wood RD, Fitch RJ, Ozkaragoz T, Sheridan PJ, Anglin MD, Paredes A, Treiman LJ, Sparkes RS.
ALLELIC ASSOCIATION OF THE D2 DOPAMINE RECEPTOR GENE WITH COCAINE DEPENDENCE.
Drug Alcohol Depend 1993; 33:271-285.

Noble EP, Lawford BR, Ritchie T, Young RM, Zhang X.
THE D2 DOPAMINE RECEPTOR *DRD2* GENE AND METHADONE TREATMENT OUTCOME OF OPIOID-DEPENDENT PATIENTS.
Abst Soc Neurosci 1998; 24; 770

Noble EP. 1998.
THE DRD2 GENE, SMOKING, AND LUNG CANCER.
J Natl Cancer Inst 90:343-345.

El alelo A1 está sobrerrepresentado en otras adicciones

A1 y otros trastornos de la impulsividad

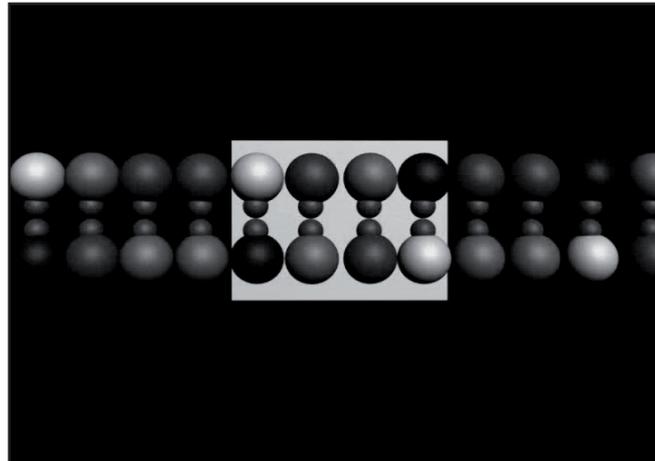
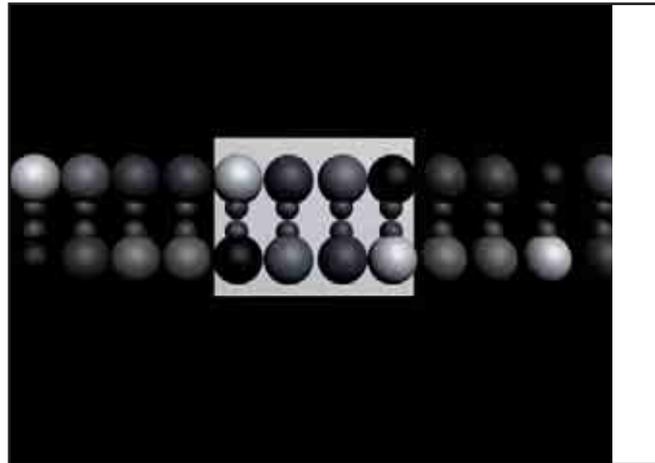
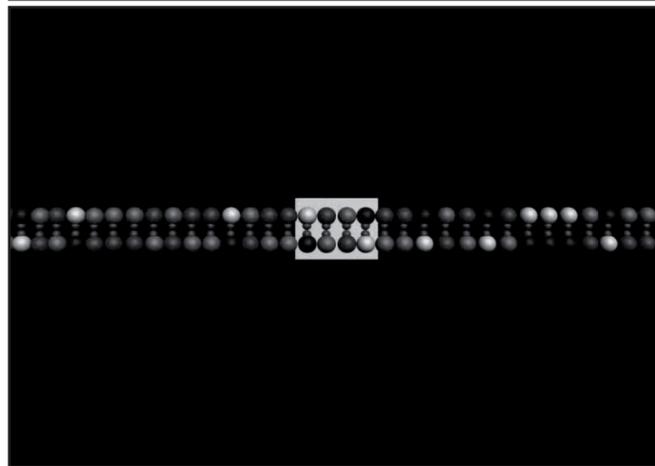
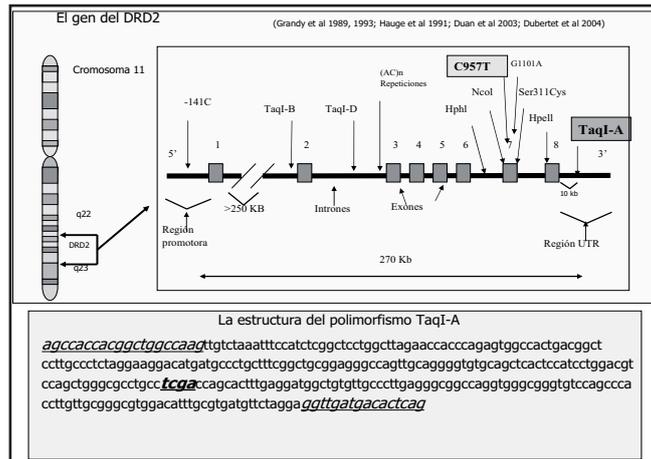
A1 y otros trastornos de la impulsividad

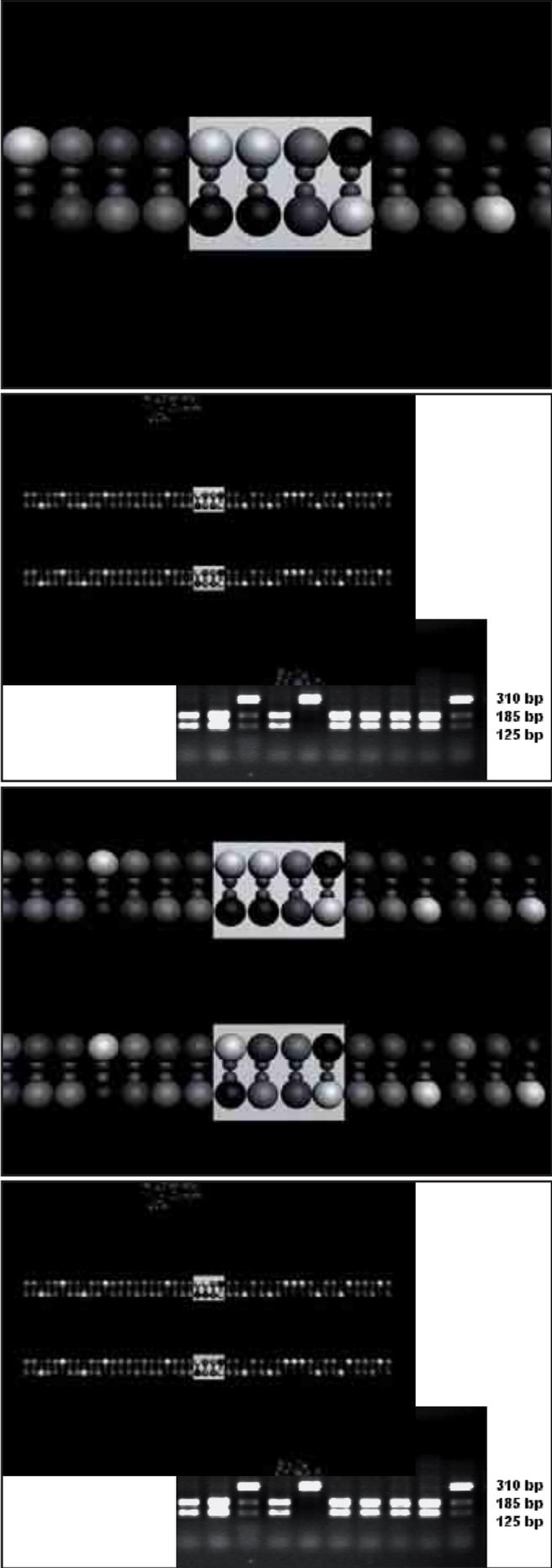
Comings DE, Rosenthal RJ, Lesieur HR, Ruggle LJ, Muhleman D, Chiu C, Dietz G, Gade R.
A STUDY OF THE DOPAMINE D2 RECEPTOR GENE IN PATHOLOGICAL GAMBLING.
Pharmacogenetics 1996; 6:223-234.

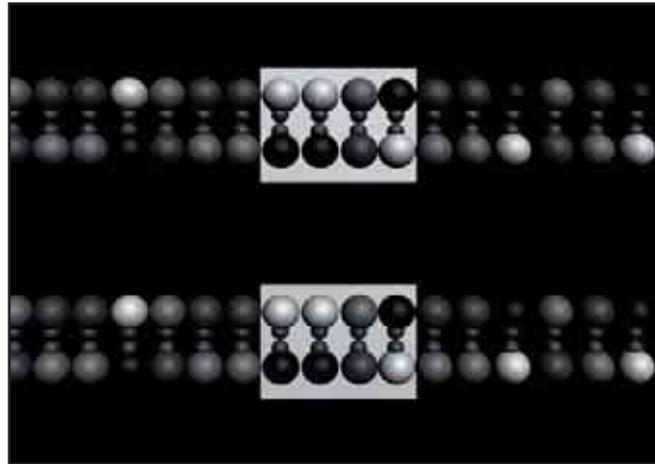
Comings DE, Flanagan SD, Dietz G, Muhleman D, Knell E, Gysin R.
THE DOPAMINE D2 RECEPTOR (*DRD2*) AS A MAJOR GENE IN OBESITY AND HEIGHT.
Biochem Med Metab Biol. 1993 Oct;50(2):176-85.

Noble EP, Ozkaragoz TZ, Ritchie TL, Zhang X, Belin TR, Sparkes RS.
D2 AND D4 DOPAMINE RECEPTOR POLYMORPHISM AND PERSONALITY.
AmJ Med Genet 1998; 81:257-267.

El alelo A1 está sobrerrepresentado en otros trastornos del control de impulsos







A1 y trastorno antisocial

Ponce G, Jiménez-Arriero MA, Rubio G, Hoenicka J, Ampuero I, Ramos JA, Palomo T

THE A1 ALLELE OF THE DRD2 GENE (TaqI A POLYMORPHISMS) IS ASSOCIATED WITH ANTISOCIAL PERSONALITY IN A SAMPLE OF ALCOHOL-DEPENDENT PATIENTS

Eur Psychiatry, 2003, 18:356-62

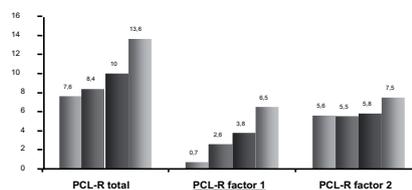
El alelo A1 es más prevalente entre los alcohólicos con Trastorno Antisocial de Personalidad, y este factor explica la mayor gravedad de las complicaciones del alcoholismo asociada al A1

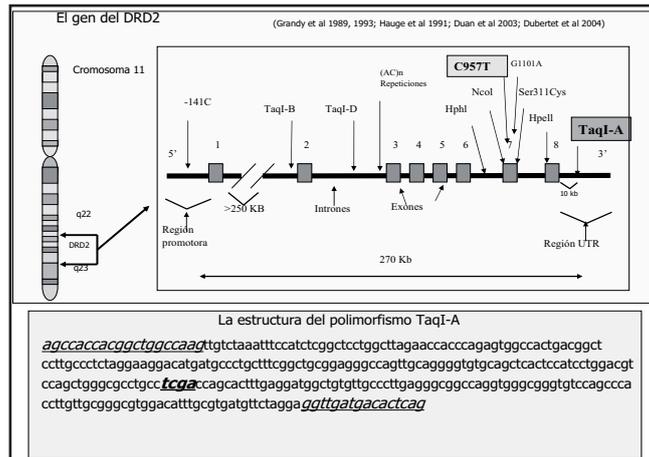
A1 y psicopatía

J. Hoenicka, G. Ponce, I. Ampuero, R. Rodríguez-Jiménez, G. Rubio, M. Aragües, J. A. Ramos, and M. A. Jiménez-Arriero, T. Palomo,.

COMORBID PSYCHOPATIC TRAITS IN SPANISH MALE ALCOHOLIC PATIENTS ARE ASSOCIATED TO THE ADDITIVE EFFECT OF ALLELIC FORMS OF THE DRD2, CNR1, AND FAAH GENES

Neurotoxicity Res (en prensa, 2006)





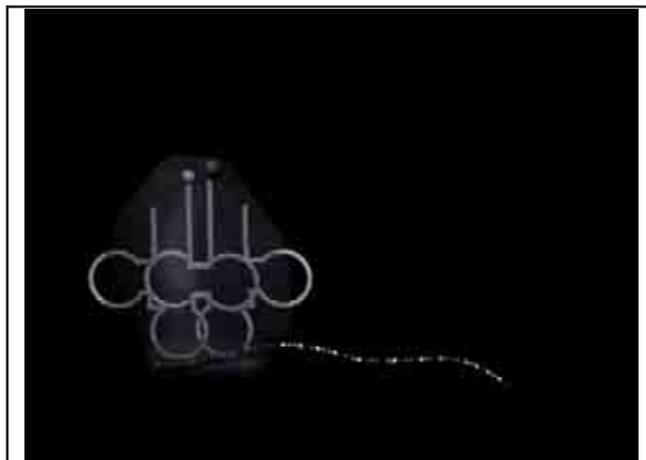
Polimorfismo C957T para DRD2

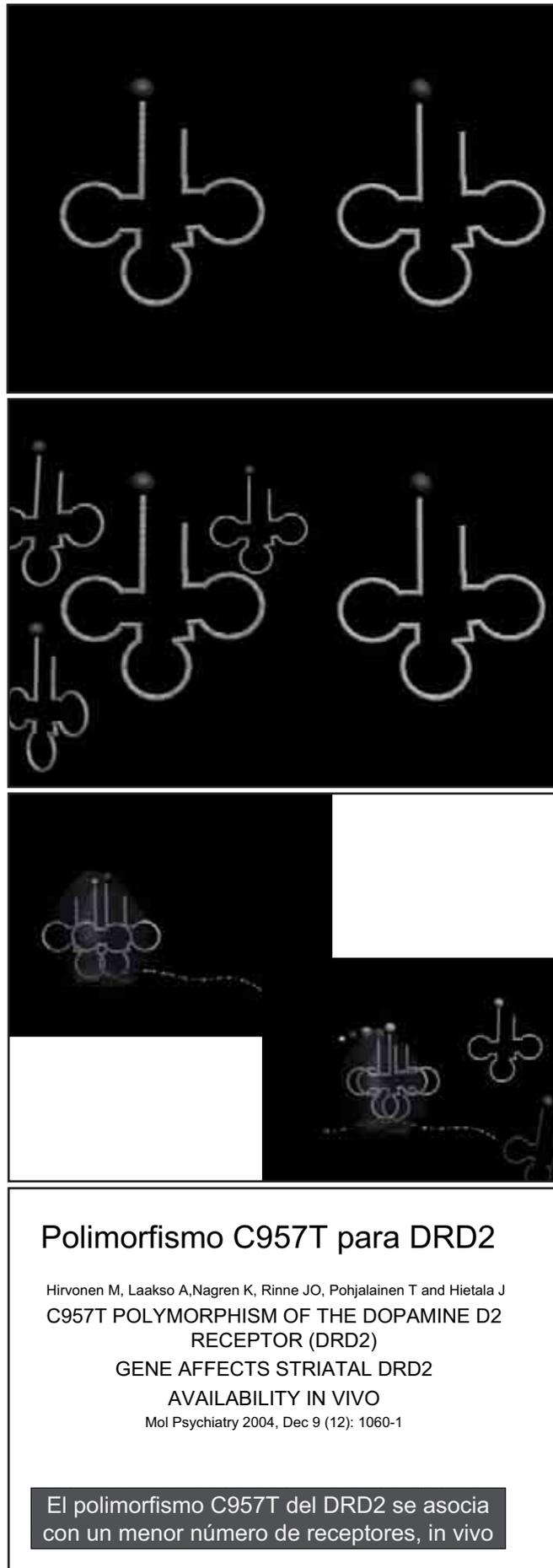
Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV.

SYNONYMOUS MUTATIONS IN THE HUMAN DOPAMINE RECEPTOR D2 (*DRD2*) AFFECT MRNA STABILITY AND SYNTHESIS OF THE RECEPTOR.

Hum Mol Genet. 2003 Feb 1;12(3):205-16.

El polimorfismo C957T del DRD2 se asocia con una menor producción de receptores, in vitro





Factores genéticos en la patogenia de la hepatopatía alcohólica

Jose Maria Ladero Quesada
Departamento de Medicina de la Universidad Complutense
Jefe de Sección del Servicio de Aparato Digestivo
Hospital Clínico San Carlos, de Madrid.

Bien, pues muchas gracias por la invitación inesperada porque yo no soy genetista, ni soy psiquiatra y aunque a lo largo de mi vida he trabajado en algunos aspectos de la Genética de la cirrosis alcohólica, lo que voy a hacer esta tarde es revisar de manera panorámica cómo está el tema de una enfermedad, poligénica como veremos, en la que los factores hereditarios juegan un papel muy importante, tan importante que todavía no lo conocemos muy bien. Es como un mosaico antiguo en el que faltan muchas piezas y no podemos comprender su significado completo.

Por lo tanto, mi intervención va a ser más informativa que referida a las pequeñas y modestas contribuciones que yo haya podido hacer en este campo, junto a las personas que conmigo han colaborado, porque es un aspecto en el que se ha publicado muchísimo.

Si quiero llamarles la atención acerca de que el hecho de tener una cirrosis alcohólica no depende sólo de la voluntad de la persona que bebe, sino de una serie de factores que no dependen de él, sino de su configuración genética y de circunstancias ambientales, de tal manera que sólo uno de cada seis o incluso menos bebedores excesivos, desarrolla cirrosis alcohólica. Incluso entre aquellas personas que beben cantidades ingentes de alcohol, del orden de más de 200 gramos al día, solamente la mitad consiguen desarrollar una cirrosis. Y aquí hay una relación parcial dosis/riesgo, es decir el riesgo aumenta conforme lo hace la dosis. Ello no quita, sin embargo, que la mayor parte de los bebedores, incluso de los grandes bebedores, no tengan cirrosis y se mueran de otra cosa, y normalmente padezcan otras complicaciones de su adicción. Qué hay factores genéticos lo demuestra el hallazgo de que haya una concordancia de cirrosis alcohólica mucho mayor en gemelos monocigotos que heterocigotos. De cirrosis, no ya solo de alcoholismo, que también sabemos que la hay. Se puede también considerar que la cirrosis alcohólica se inscribe en el contexto de un defecto nutricional, de carencias vitamínicas, del efecto combinado de otras muchas circunstancias..., es una teoría interesante que seguramente tiene también cierto fundamento.

Por lo tanto la hepatopatía alcohólica avanzada es un ejemplo clarísimo de enfermedad poligénica compleja, muy compleja, extraordinariamente compleja por desgracia, en la que además intervienen factores ambientales. El etanol, es un producto ajeno al organismo

humano, no es un metabolito normal, no podemos considerarlo como una sustancia propia de nuestro metabolismo. Tiene algunos efectos biológicos, fundamentalmente a nivel cerebral, que es lo que se busca cuando se bebe alcohol: modifica un poco las percepciones y el estado de ánimo, pero si el etanol no sufriera metabolismo, sino que se eliminara del organismo tal cual entra en él, sin sufrir un proceso oxidativo, nos emborracharíamos con más facilidad, sería más barato y sufriríamos menos daños orgánicos como consecuencia del alcohol. Pero desgraciadamente no es así, porque el alcohol sufre un metabolismo oxidativo y es a través de los pasos de ese metabolismo y de sus consecuencias por lo que en la mayor parte de los casos el alcohol es dañino para el hígado.

¿A qué se deben estas diferencias con una base genética?. Sencillamente a que el genoma humano es ampliamente polimórfico. Hay una enorme cantidad de polimorfismos, muchos de los cuales afectan a las regiones codificantes de los genes, o a regiones no codificantes pero que marcan diferencias funcionales, como son las regiones del promotor, con las repeticiones por ejemplo de microsatélites, y sabemos que una configuración genética compleja puede dar lugar a un riesgo mayor, o al menos aspiramos a saberlo.

¿De qué manera el alcohol, a través de su paso por el organismo, puede modular el daño hepático que produce? Esto queda resumido en estos seis grupos de factores; en primer lugar el más conocido y el más estudiado; el metabolismo del etanol y sus consecuencias directas; en segundo lugar, la defensa antioxidante del organismo que trata de eliminar aquellos productos que se desprenden en el metabolismo del alcohol y que son dañinos; los mecanismos de inflamación y necrosis, que también están regulados por una compleja red de genes; la modulación de la respuesta inmune, la respuesta fibrogénica hepática, que es la marca de fábrica de la cirrosis, y otros factores que solamente mencionaré.

La búsqueda de genes candidatos en la hepatopatía alcohólica se basa en el sentido común, vamos a estudiar aquellos genes que teóricamente al menos puedan guardar alguna relación con esos elementos que acabamos de ver en la anterior diapositiva. Y por otra parte hay que ser exigente en el diseño. Desgraciadamente a los largo de los años, el diseño de estos estudios no ha sido demasiado perfecto, y yo vengo a reconocer mi parte de culpa en ello, quizás porque no podemos incluir todos los enfermos que quisiéramos, quizás porque no disponemos de los controles adecuados, que en este caso deberían ser alcohólicos sin hepatopatías, y desde luego un rigor técnico que se le supone a cualquier grupo de garantía que trabaje en este campo.

Aquí tienen ustedes un breve esquema del metabolismo del etanol. El etanol sufre una primera oxidación a acetaldehído, y el acetaldehído, que es una molécula altamente tóxica, debe transformarse en acetato lo antes posible para no hacer daño. Estos pasos metabólicos están catalizados por sistemas enzimáticos de los cuales se nos va a hablar ahora con mucha más profundidad, con el fin de llegar a este producto semi-inerte, poco agresivo que es el acetato. Y en estas vías metabólicas hay una serie de polimorfismos enzimáticos que son los que más atención han merecido desde hace ya décadas en cuanto a su posible relación con el alcoholismo, tema del que yo no hablo, y con la hepatopatía alcohólica. Las alcoholdehidrogenasas son una familia enzimática, algunas de cuyas isoformas intervienen en el metabolismo del alcohol. Dos de ellas, la 2 y la 3, son polimórficas y estos polimorfismos al menos "in vitro", marcan diferencias en la actividad metabólica de la enzima de tal manera que, teóricamente, los poseedores de la forma de acción rápida oxidan más deprisa el etanol y lo transforman más deprisa en aldehido acético, y por lo tanto serían teóricamente también harían a sus portadores susceptibles de un mayor daño hepático por

alcohol. ¿Qué realidad tiene esto en la clínica?. Posiblemente no tanta como se pensaba, porque el factor limitante "in vivo", del funcionamiento de las alcoholdehidrogenasas, más que una actividad intrínseca, es la disponibilidad del co-enzima que es el NAD. De todos modos, hay centenares de publicaciones al respecto, insisto que no todas con el suficiente rigor o calidad. Por lo tanto hay bastante confusión. En la población española y en la caucásica en general, no se detectan o se detectan en muy baja proporción las formas mutadas de acción más rápida y en lo que se refiere a la hepatopatía alcohólica, los datos más recientes de los últimos años no parecen indicar que exista una relación clara de riesgo entre la cirrosis alcohólica y estos polimorfismos enzimáticos. El segundo paso es la acetaldehidodeshidrogenasa, la enzima que procesa ese aldehído tan tóxico y lo transforma en acetato, y aquí también nos encontramos con un polimorfismo, con una variante que es la variante inactiva, que es dominante porque se trata de una molécula, tetramérica, y en el momento en que hay una sola cadena anormal, toda la enzima deja de funcionar, de manera que los heterocigotos tienen muy poca actividad enzimática. Los caucásicos no tenemos significativamente representada esta variante, al contrario de lo que ocurre con los orientales, muchos de los cuales tienen esta forma deficiente, y por eso, cuando beben sufren unos efectos muy desagradables porque se acumula acetaldehído: notan sofoco, por la vasodilatación, cefalea, malestar general. Lo pasan muy mal y posiblemente por eso en poblaciones orientales el alcoholismo es un problema menos importante quizás que en las poblaciones caucásicas, o al menos, esa puede ser una de las causas.

Hay otra enzima que interviene en el metabolismo del alcohol cuando se bebe mucho, por lo tanto no tiene que ver con el abuso de alcohol, que ya está establecido cuando se pone en funcionamiento, sino con el procesamiento ya del alcohol una vez ingerido. Es la isoforma CYP2E1 del citocromo P-450. Es una enzima muy interesante, pero no podemos detenernos mucho en ella, no tenemos tiempo, y además aunque se sabe que es polimórfica y que el alelo raro podría acelerar la oxidación del etanol y por tanto su riesgo metabólico, su relación con el daño hepático por alcohol, es muy controvertida. La mayor parte de los estudios no la demuestran, los que lo hacen, lo hacen de una manera poco segura y desde luego en la raza blanca este alelo está muy poco representado, es menos del 5% de la población.

Y otra enzima, que todos conocemos por la gota, que también tiene que ver con el mecanismo oxidativo, en este caso del acetaldehído a acetato, que es la xantino-oxidasa, es un campo virgen que merecería la pena investigar con un poquito más de profundidad, pero esto es una tarea para los próximos años.

Por otra parte y ya al margen de los aspectos estrictamente metabólicos, sabemos que el hierro es una molécula tóxica para los tejidos, y que los sujetos que tienen hemocromatosis genética, tienen una mayor propensión a tener daño hepático, por el propio hierro, y si beben alcohol mucho más. Se han estudiado las mutaciones del gen del de la hemocromatosis (gen HFE) en la hepatopatía alcohólica, y los resultados son muy controvertidos. La mutación menor, que tiene muy poca importancia fisiológica, si que puede estar hiper-representada en los cirróticos alcohólicos, pero esto requiere todavía confirmación.

Las defensas que pone en marcha el organismo, lo hacen a través de enzimas neutralizantes de radicales libres o de sustancias químicamente muy reactivas, se han estudiado algunas, la superoxidodismutasa sobre todo, la glutatióntransferasas, en cuyo estudio hemor participado, y algunos otros genes. Hoy por hoy, sigue siendo también un

campo no demasiado trillado, aunque ya hemos visto que por ejemplo la superoxidodismutasa y sus mutaciones sí pueden guardar relación, con el riesgo de hepatopatía alcohólica.

Me van a permitir que ponga esta diapositiva solo para que vean lo complicado que es esto. La paso rapidísimamente, pero únicamente que se centren en esta célula central que es la célula de Kupffer, que es una célula del sistema mononuclear fagocítico que está en el hígado y que está en el meollo de todos los procesos que conducen a la hepatolesividad del etanol. No puedo detenerme más, pero recuerden esta célula tan importante.

Por otra parte la respuesta inmune y los mecanismos de inflamación, claramente están relacionados porque la hepatopatía alcohólica es básicamente una enfermedad inflamatoria. Se han estudiado distintas citocinas pro y antiinflamatorias, también se han hecho estudios sobre distintos alelos del sistema HLA. Hoy por hoy no tenemos demasiada certeza pero parece que este R-8, DR-3, puede mantener una relación de riesgo.

El factor de necrosis tumoral alfa, que es una citocina fundamental en la patología hepática de cualquier tipo, siempre que haya un componente inflamatorio crónico, está regulado por un gen que es polimórfico, y de los estudios realizados, algunos de los cuales somos responsables los aquí presentes, han encontrado algunos datos que son contradictorios.

En relación con el SNP -238, el estudio pionero y el estudio muy reciente de la Dra. Pastor encuentran un exceso del alelo TNF-2. Nosotros en un estudio que hicimos hace unos años no lo encontramos.

La interleucina 1 también es una citocina muy importante en los mecanismos inflamatorios. Es asiento también de polimorfismos, tanto ella como su receptor, y hay ya estudios, aquí hay uno por ejemplo del grupo del profesor Laso, que proporciona alguna indicación, sobre todo del gen de la interleucina 1, en el sentido de que hay un mayor riesgo de cirrosis alcohólica, en cambio el del polimorfismo del receptor no parece que diera un resultado tan positivo. Y la interleucina 10, que es la otra cara del espejo del factor de necrosis tumoral alfa, es una citocina anti-inflamatoria, también es polimórfica, también ha sido estudiada. Conozco dos estudios, uno de nuestro grupo y el otro de un grupo británico. Los resultados son contradictorios, por lo tanto aquí tenemos que seguir trabajando.

Hay otros genes, como por ejemplo alguno el gen CD-14, que modula el receptor de la endotoxina, que es el principal agente estimulante de las células de Kupffer, acuérdense de lo que les he dicho antes, que también es polimórfico y este polimorfismo parece asociarse a un mayor riesgo de daño hepático por alcohol. Y lo mismo podemos decir del gen CTLA-4, que contribuye a la tolerancia inmune de los antígenos que generan acetaldehído, una molécula muy reactiva que ataca a las proteínas y las altera en su estructura y las convierte en neo-antígenos. También sus polimorfismos se han visto relacionados con la hepatopatía alcohólica.

Pero hasta ahora estábamos hablando de inflamación, pero lo que marca la cirrosis alcohólica es la fibrosis y la fibrosis es un proceso complejo, en el cual interviene muy directamente el factor el TGF- beta. Está estudiado, pero con resultados muy poco interesantes de momento: También el hígado graso está de moda, la enfermedad grasa del hígado, tanto alcohólica, como no alcohólica, es un campo de activa investigación y ya sabemos que algunas proteínas que intervienen en el metabolismo, en la absorción etc. de los ácidos grasos o de la producción de triglicéridos, son están sujetas a polimorfismos

genéticos que deben ser estudiados, como el de aquellas otras moléculas que tienen una capacidad intrínsecamente protectora del hígado frente al estrés oxidativo y concretamente las citoqueratinas. Este es un campo recientísimo, y en fin, ya para terminar hay otros polimorfismo que afectan a los mecanismos de reparación del ADN, que también están involucrados en la hepatopatía alcohólica, de tal manera que poco a poco vamos reconstruyendo el mosaico y es de esperar que el mejor conocimiento de la base genética de la hepatopatía alcohólica nos ayude a diseñar adecuadamente nuestra actitud individual frente al consumo de alcohol.

Hepatopatía alcohólica

Factores genéticos en su
patogenia

*Dr. José María Ladero
Servicio de A. Digestivo
Hospital Clínico San Carlos
Madrid*

Algunos conceptos iniciales

- Sólo 1 de cada 6 bebedores excesivos desarrolla cirrosis alcohólica.
- Menos del 50 % de los bebedores masivos lo consiguen.
- Hay relación parcial dosis-riesgo
- Factores genéticos (concordancia 3 veces mayor en gemelos monocigóticos)
- Factores ambientales: nutrición, otras noxas...

La hepatopatía alcohólica avanzada es un claro ejemplo de enfermedad poligénica compleja con intervención relevante de factores ambientales.

Toxicidad intrínseca del etanol

- El etanol es relativamente poco tóxico para el hígado. Modifica de forma transitoria las propiedades físicas de las membranas celulares que dan soporte a receptores, canales iónicos, etc.
- Si el etanol no se metabolizara en el organismo, sería mucho más barato y menos dañino para el hígado emborracharse.

¿Por qué estas diferencias?

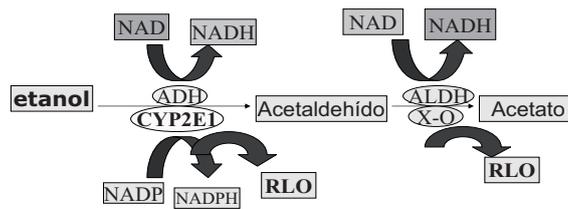
- Hay más de $1,4 \times 10^6$ polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el genoma humano.
- Al menos 60.000 se localizan en las regiones codificantes de los genes.
- Muchos otros están en zonas no codificantes pero con capacidad reguladora (promotoras)
- Los polimorfismos de microsatélites pueden reflejar diferencias funcionales
- Hay deleciones totales o parciales y repeticiones de genes que influyen sobre la actividad funcional.

Aspectos relevantes

- Metabolismo del etanol y sus consecuencias directas.
- Defensa antioxidante y neutralización de radicales libres
- Mecanismos de inflamación y necrosis
- Modulación de la respuesta inmune
- Fibrogénesis hepática
- Otros factores

Selección y análisis de los genes candidatos

- Deben estar relacionados con el metabolismo del etanol, sus consecuencias o las modificaciones que produce.
- El diseño debe garantizar
 - Homogeneidad en la muestra de casos
 - Número suficiente de enfermos
 - Controles adecuados
 - Valorar, y eliminar si es posible, otros factores hepatolesivos
- El rigor técnico es imprescindible



METABOLISMO DEL ETANOL
(esquema básico)

Variabilidad metabólica del etanol

- Polimorfismos ADH
- Polimorfismos ALDH2
- Polimorfismos CYP2E1
- Papel de la xantino-oxidasa

Alcoholdehidrogenasas

- Divididas en 5 clases
- La clase I tiene tres isoformas: 1,2,3.
- Cada gen codifica una cadena proteica
- La ADH es un dímero
- Los genes *ADH2* y *ADH3* son polimórficos
- Las variantes más activas son *ADH2*2* y *ADH3*1*.

¿Alcoholdehidrogenasas?

- Poco probable: el factor limitante in vivo es la disponibilidad de NAD, que se consume antes de que las ADH más activas se saturen.
- Algunos estudios en orientales señalan mayor riesgo en los portadores de *ADH2*2*. Otros no.
- En caucásicos sólo se detecta *ADH3*1* y en bajo porcentaje. Importancia marginal o nula.
- Posible relación con la propensión a alcoholismo, muy dudosa con la hepatopatía alcohólica.

Acetaldehíodeshidrogenasa 2

- Polimórfica.
- La molécula enzimática es un tetrámero
- La variante inactiva (*ALDH2*2*) es dominante.
- 50 % de orientales tienen actividad *ALDH2* deficiente o nula.
- Sufren mucho cuando beben
- Importante factor disuasorio
- Si a pesar de todo beben, tienen mayor riesgo
- En caucásicos apenas hay portadores de *ALDH2*2*.

CYP2E1

- Inducible, no constitutiva
- Sólo actúa con consumos mantenidos y elevados de alcohol.
- “Poroso” (“pierde” radicales libres).
- Muestra varios SNPs
- Sin relación con el riesgo de alcoholismo.
- El alelo *Rsa1* “raro” (c2) podría ser más activo.
- Frecuente en orientales: relación controvertida
- Raro en caucásicos: no hay relación
- Otros polimorfismos: malos candidatos

Xantino-oxidasa

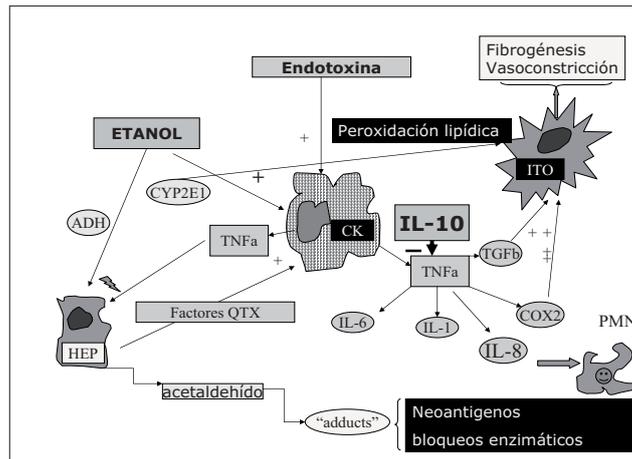
- Es un factor secundario en la oxidación del acetaldehído.
- Su actividad está relacionada con la intensidad del daño hepático en bebedores excesivos
- Muestra polimorfismo genético
- El genotipo de riesgo sería el “deficiente”
- Es un campo a estudiar

Hierro, gen *HFE* y alcohol

- El hierro tisular acelera el daño oxidativo
- Las mutaciones del gen *HFE* son la base genética de la hemocromatosis de tipo I
- La mutación principal (C282Y) no guarda relación con el riesgo de hepatopatía alcohólica.
- La relación con la mutación secundaria (H63D) es controvertida y difícil de explicar.

Genes de la defensa antioxidante

- Superóxido dismutasa:
 - La forma deficiente incrementa el riesgo de cirrosis alcohólica (*Nahon et al. 2005*)
 - Y de hepatocarcinoma en cirrosis alcohólica (*Sutton et al., 2006*).
- Glutathion S-transferasas
 - Superfamilia enzimática.
 - Resultados controvertidos. El genotipo *GSTT1-GSTM1* doble nulo puede implicar mayor riesgo (*Ladero et al. 2005*)
- Otros genes candidatos
 - Epóxido hidrolasa: **SNP en exon 4, alelo raro**
 - N-acetil transferasa: **no relación**



Alcohol, inflamación y respuesta inmune

- Sistema HLA
- Citocinas
 - TNF-alfa
 - IL-10
 - IL-1
 - Otras

Sistema HLA

- Múltiples estudios detectan múltiples desequilibrios.
- En muchos casos, artefacto estadístico.
- En algunos, posible índice de vecindad con otro gen involucrado.
- Volver sobre él con las nuevas técnicas. ¿Haplotipo B8/DR3?).

TNF α

- La citocina proinflamatoria “clave”.
- Aumenta en la hepatopatía alcohólica “activa”
- El gen *TNF* α : región HLA de clase III.
- SNPs en la región promotora:
 - 238 G→A
 - 308 G→A (el alelo A o TNF2 \uparrow TNF α)

Polimorfismos TNF α y hepatopatía alcohólica

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - <u>308 G→A</u> - Grove et al (1997)
Ninguna relación con hepatitis alcohólica. - Ladero et al (2002)
Ninguna relación con hepatopatía alcohólica avanzada - Pastor et al (2005)
- Ninguna relación con cirrosis alcohólica | <ul style="list-style-type: none"> - <u>238 G→A</u> - Grove et al (1997)
Exceso de alelo raro TNF2 en hepatitis alcohólica - Ladero et al (2002)
Ninguna relación con hepatopatía alcohólica avanzada - Pastor et al (2005)
Exceso de alelo TNF2 en cirrosis alcohólica frente a alcohólicos sin cirrosis |
|---|---|

Polimorfismos de IL-1 y su receptor

- El alelo -511 (2) IL-1 β se asocia con el riesgo de cirrosis alcohólica en japoneses
(Takamatsu et al. 2000)
- Un polimorfismo del receptor de IL-1 no se asocia con riesgo de cirrosis, aunque sí de alcoholismo.
(Laso et al. 2000)
- El alelo 1 del mismo polimorfismo se asocia con riesgo de cirrosis y el alelo 2 con mayor gravedad, en chinos.
(Chen et al., 2005)

IL-10

- Citocina inmunomoduladora
- Antagoniza los efectos de TNF α
- Niveles disminuidos en hepatopatía alcohólica.
- El gen *IL-10* se localiza en 1q32.
- Polimórfico en la región 5'flanking del promotor.

Polimorfismos de IL-10

- Marcada asociación de riesgo con el alelo -627 A
(Grove et al. 2000)
- Relación con el haplotipo IL-10.G11-GCC
(Ladero et al. 2000)

Estos resultados son contradictorios y hacen falta más estudios

Gen *CD14* (receptor de endotoxina)

- Alelo *-159 T* : mayor riesgo de daño hepático alcohólico avanzado.
(*Jarvelainen et al. 2001*)
- Genotipo *-159 TT*:
 - Mayor producción de proteínas de fase aguda
 - Mayor riesgo de hepatopatía alcohólica avanzada
(*Campos et al. 2005*)

Gen *CTLA-4* (cytotoxic T lymphocyte antigen-4)

- Contribuye a la tolerancia inmune de los neoantígenos generados por el acetaldehído.
- Alelo *G* en posición 49 exón 1 es hipofuncionante.
(*Kouki et al. 2000*)
- Asociado con mayor gravedad de la hepatopatía alcohólica
(*Day et al. 1999; Vidali et al. 2003; Valenti et al. 2004*)

Fibrogénesis hepática

- Proceso muy complejo de síntesis, depósito y degradación.
- Fundamental en la aparición de cirrosis.
- Involucradas múltiples citocinas, prostaglandinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas ...
- **TGF β_1** : Factor fibrogénico de primer orden
- No relación entre los polimorfismos del gen *TGF β_1* y el riesgo de hepatopatía alcohólica avanzada.
(*Oliver et al. 2005*)

Metabolismo lipídico:

- Proteína intestinal ligadora de ácidos grasos (FABP2).
- Polimorfismo A54T.
- Alelo 54T :
 - menor trigliceridemia
 - Latencia mayor hasta desarrollo de cirrosis alcohólica.

(Salguero et al. 2005)

Citoqueratinas de tipo II

- Protegen al hígado del estrés oxidativo.
- Sus genes (K8 y K18) muestran mutaciones.
- Las mutaciones son más frecuentes en hígados con cirrosis alcohólicas explantados.

(Ku et al., 2005)

Otros polimorfismos

- Gen XRCC1 (reparación del ADN).
 - Un cambio de aminoácido Arg399Gln se asocia con el riesgo de cirrosis alcohólica.

(Rossit et al. 2002)

- Gen MTHFR (metilación del ADN)
 - Un cambio C→T en posición 677 aumenta el riesgo de carcinoma hepatocelular en cirrosis alcohólica.

(Saffroy et al. 2004)

Polimorfismos del ADN en el alcoholismo

Isabel Julia Pastor Encinas

**Unidad de Alcoholismo. Servicio de Medicina Interna II.
Hospital Universitario de Salamanca.**

Para terminar, vamos a hablar de los polimorfismos del ADN en alcoholismo. Primero quiero agradecer al comité organizador de esta reunión el haberme invitado y poder estar aquí esta tarde. Voy a referirme un poco a los trabajos que se desarrollan en nuestra unidad, con algún comentario de la literatura.

He puesto una definición muy amplia de alcoholismo porque el término de alcoholismo incluye un conjunto heterogéneo de trastornos, cuyo denominador común es su relación con la ingesta de etanol. De los estudios realizados en los últimos años, en familias de alcohólicos, en gemelos, y en adoptados, se deduce con cierta evidencia que en el alcoholismo hay un componente genético, tanto en la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad, como en su expresión clínica.

El abordaje habitual en la búsqueda de factores genéticos asociados con el alcoholismo es el estudio de posibles polimorfismos en genes cuyo producto proteico interviene en la fisiopatología de la enfermedad (la estrategia del gen candidato). En el momento actual los genes que parecen ser más relevantes en el ámbito del alcoholismo son los que codifican enzimas implicadas en el metabolismo del etanol y aquéllos cuyo producto tiene que ver con las vías cerebrales de la adicción al alcohol. De los estudios realizados hasta el momento se deduce que no hay un gen principal causante del alcoholismo, sino que se considera que en esta enfermedad deben interactuar diversos genes, cada uno de ellos con un efecto pequeño, pero aditivo, sobre el fenotipo; junto a esto hay que considerar la influencia ambiental.

Los estudios que nosotros hemos realizado, los hemos hecho en una muestra de alcohólicos -todos varones-, reclutados de nuestra Unidad de Alcoholismo que están divididos en dos grupos; dependencia y abuso de alcohol, siguiendo los criterios del DSM-4. El consumo de alcohol de todos ellos era superior a 120 gramos al día, el tiempo de consumo superior a 10 años, y no tenían adicción a otras drogas excepto al tabaco. Como controles utilizamos 100 individuos, también varones, con un consumo de alcohol menor de 10 gramos al día y sin antecedentes familiares o personales de alcoholismo; puedo garantizarles que fue bastante más difícil conseguir los controles que los pacientes.

Los únicos factores genéticos plenamente establecidos en relación con una susceptibilidad diferente para el desarrollo de alcoholismo son los polimorfismos de los genes

codificadores de los principales sistemas enzimáticos que intervienen en el metabolismo hepático del etanol. Recordemos, ya ha hablado el Dr. Ladero del metabolismo del etanol, las tres enzimas principales que intervienen; la alcohol deshidrogenasa (ADH), la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y la citocromo P450IIE1 (CYP2E1). Hay múltiples formas de ADH pero las isoenzimas de clase 1 son las que intervienen en mayor grado en el metabolismo del etanol; hay tres isoenzimas de clase I: ADH1, ADH2 y ADH3; tanto los genes que codifican la ADH2 (ADH1B) (con tres alelos diferentes) y la ADH3 (ADH1C) como el gen ALDH2 presentan polimorfismos con trascendencia funcional. Así los alelos ADH1B*2 (10-40 veces más activa que ADH1B*1), ADH1B*3 y ADH1C*1 codifican isoformas de ADH dotadas de una mayor actividad enzimática, lo que determina el consiguiente incremento de la velocidad de síntesis del acetaldehído y, como consecuencia de ello, la ingesta de alcohol se acompaña de un incremento de los efectos secundarios vinculados a dicho metabolito (efecto antabús). El alelo ALDH2*2 codifica una isoforma mitocondrial de ALDH cuya actividad enzimática es casi nula, por lo que el acetaldehído no puede degradarse a acetato y se va acumulando en la sangre. Los alelos ADH1B*2 y ALDH2*2, frecuentes en poblaciones orientales y raros en poblaciones blancas (5% ADH1B*2; 0% ALDH2*2) y africanas (0% ADH1B*2; 0% ALDH2*2), se consideran factores protectores frente el desarrollo de alcoholismo. Nosotros no hemos estudiado los polimorfismos de la ADH ni de la ADH porque son muy raros en poblaciones caucásicas. Si que hemos estudiado algunos polimorfismos de la CYP2E1; estudiamos dos polimorfismos en la región promotora (-1259 G/C y -1019 C/T que están en desequilibrio de ligamiento) y no encontramos diferencias entre alcohólicos y controles, ni entre abuso y dependencia. También estudiamos un polimorfismo situado en el intrón 6 (IVS6 +7668 T/A), y tampoco encontramos ninguna asociación con el alcoholismo.

Como ya se ha hablado aquí mucho de neurotransmisores, cerebro y dependencia, sólo voy a recordar los neurotransmisores que intervienen en la dependencia alcohólica y de otras drogas y que son fundamentalmente la dopamina, el sistema opioide, la serotonina, el GABA, el glutamato y otros entre los que está, como también se ha hablado aquí, el sistema cannabinoide. La dopamina desempeña un papel importante en el refuerzo positivo producido por el consumo de alcohol. La presencia de polimorfismos en genes relacionados con la síntesis y degradación de este neurotransmisor, con su recaptador o con algunos de sus cinco subtipos de receptores podría influir en la vulnerabilidad individual al alcohol. Los genes más estudiados del sistema dopaminérgico son los que codifican los receptores de la dopamina, especialmente en receptor D2, codificado por el gen DRD2. El primer polimorfismo estudiado fue el localizado en la región 3' no traducida (Taq1) en el año 90 y se encontró una asociación con alcoholismo; este polimorfismo no produce cambios funcionales en la proteína codificada, pero si determina un menor número de receptores cerebrales de dopamina disponibles. Sin embargo, los estudios posteriores cuidadosamente controlados y con amplias muestras de población, no han aportado resultados concluyentes en cuanto a la citada asociación. En nuestro estudio aunque la frecuencia del genotipo A1/A1 es más alta en dependencia que en abuso no llega a alcanzar significación estadística ($p= 0,055$). Tampoco se ha observado que el alcoholismo se asocie con polimorfismos de genes localizados en otros receptores de dopamina ni con el gen que codifica su proteína transportadora.

La serotonina se asocia con los efectos de refuerzo del alcohol a través de sus efectos sobre la regulación el humor y la reducción de la ansiedad. Los antagonistas del receptor

5HT3 de la serotonina bloquean el efecto liberador de dopamina producido por el alcohol en el núcleo accumbens, y los inhibidores de la recaptación de serotonina previenen los síntomas de abstinencia alcohólica. El gen del transportador de serotonina presenta un polimorfismo en la región promotora (una inserción/delección de 44 pares de bases) y sus dos alelos L y S tienen una diferente eficacia transcritora (menor el alelo S). El papel de este polimorfismo en el desarrollo de alcoholismo es controvertido, ya que hay estudios en los que el alcoholismo se asocia con alguno de los dos alelos y otros en los que no se encuentra ningún tipo de asociación. Nosotros no encontramos diferencias estadísticamente significativas ni al comparar alcohólicos con controles, ni al comparar abuso con dependencia.

De los receptores de serotonina, nosotros hemos estudiado el receptor tipo 2 (HTR2A) y tampoco hemos encontrado ningún tipo de asociación con el alcoholismo.

Los opioides endógenos parecen estar implicados tanto en la sensibilidad inicial al alcohol como en sus efectos reforzadores. La activación del receptor opioide mu por el alcohol produce un efecto eufórico relacionado con las propiedades reforzadoras de los opiáceos, y aumenta asimismo la liberación de dopamina en el núcleo accumbens. De ahí que uno de sus antagonistas, la naltrexona, disminuya el consumo de alcohol y reduzca las recaídas. El gen que codifica el receptor opioide mu presenta varios polimorfismos, entre los que destaca el que se localiza en el exón 1 (A118G) (Asparagina por aspartato), cuyo alelo G confiere al receptor una afinidad por la betaendorfina tres veces mayor que el alelo 118A. En los estudios disponibles no se ha encontrado una asociación clara entre este polimorfismo y la dependencia alcohólica, aunque sí parece existir una asociación con la respuesta al tratamiento con naltrexona, de tal forma que el número de recaídas es menor en los individuos portadores del alelo G. En nuestro estudio el genotipo AA es más frecuente en alcohólicos que en controles aunque no llega a la significación estadística ($p=0,06$). Estudiamos también otro polimorfismo situado en el intrón 2 (IVS2 +691 G/C) y no encontramos ninguna diferencia entre alcohólicos y controles ni entre abuso y dependencia.

También hemos estudiado dos polimorfismos en el receptor opioide delta: en el primer exón G80T con cambio de aminoácido (Phe 27Cys). Este codón 27 está localizado en la región N-terminal después del primer dominio transmembrana y es posible que pueda afectar a la capacidad de unión; y en el tercer exón donde hay una mutación silenciosa. El genotipo CC del polimorfismo T921C se ha asociado con adicción a la heroína. Se ha estudiado también su asociación con alcoholismo con resultado negativo. No se ha encontrado asociación del polimorfismo Phe27Cys con enfermedades adictivas.

También hemos estudiado dos polimorfismos en el receptor opioide Kapa, uno en el exón 1 (+36 G/T) y otro en el exón 3 (+846 C/T) y tampoco hemos encontrado ninguna diferencia entre alcohólicos y controles, ni entre abuso y dependencia. Hasta donde yo se, no hay ningún estudio de estos polimorfismos hecho en alcohólicos.

El ácido gammaaminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio presente en el cerebro. Los efectos ansiolíticos y sedantes del etanol se han relacionado con su unión a los receptores GABAA compuestos por varias subunidades ($\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$) agrupadas en familias cuyos genes están localizados en cromosomas diferentes (4, 5, 15). Se ha constatado una asociación entre la dependencia del alcohol y polimorfismos de los genes GABRB1 (cromosoma 4), GABRB3 y GABRA5 (cromosoma 15) pero no con los genes GABRA1 y GABRA6 (ambos en el cromosoma 5). Nosotros hemos estudiado un polimorfismo en

GABRA1 y otro en GABRA 6 sin haber encontrado asociación con el alcoholismo.

Los efectos sobre el cerebro de la ingesta crónica de etanol también pueden estar mediados por otros sistemas neurotransmisores como el sistema cannabinoide y de hecho el cannabis puede ser un sustituto del alcohol para combatir el temblor y las náuseas del síndrome de abstinencia. Hemos estudiado una mutación silenciosa (+1359 G/A) y no hemos encontrado asociación el alcoholismo.

Los receptores sigma 1 (SIGMAR1) modulan la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica en el núcleo accumbens y en el área tegmental ventral por afectar a la respuesta mediada por receptores NMDA. Por ello se ha pensado que sus polimorfismos podrían estar relacionados con el alcoholismo. Nosotros hemos estudiado dos polimorfismos de este receptor situados ambos en la región promotora y tampoco hemos encontrado diferencia entre alcohólicos y controles ni entre abuso y dependencia.

La tirosinasa- fyn (PTKfyn) regula la sensibilidad al etanol modulando la actividad de las subunidades 2A y 2B del receptor NMDA, por lo cual también es posible que este relacionado con el alcoholismo. Hemos estudiado un polimorfismo situado en la región promotora (-93 A/G). No hay diferencias entre alcohólicos y controles, pero si que hay diferencias entre dependencia y abuso, de tal manera que el porcentaje de portadores del alelo G, es más alto en dependencia de alcohol que en abuso de alcohol ($p = 0,015$; OR = 2,077; IC al 95 %: 1,165 – 3,704); esto parece indicar que el ser portador del alelo G, aumenta la susceptibilidad para desarrollar dependencia del alcohol.

Dado que en nuestra unidad de alcoholismo estamos trabajando también sobre alcoholismo y respuesta inmune, en colaboración con el servicio de citometría, nos ha parecido interesante estudiar polimorfismos de genes que intervienen en la respuesta inmune y que podrían estar implicados no en el alcoholismo sino en el desarrollo de la lesión hepática alcohólica. Hemos estudiados genes que codifican interleucinas : familia IL1, IL2, IL4, IL6, IL8, 1L10, 1L12 y también TNF-alfa, factor nuclear kappa-B e inhibidor del factor nuclear kappa-B; no es mi intención mostrarles los resultados de cada uno de los estudios pero sí quiero enseñarles un resultado sorprendente y es la asociación entre polimorfismos de citocinas de la familia de la interleucina 1 con el alcoholismo.

En un principio, estudiamos una repetición en tándem de 86 pares de bases localizada en el intrón 2 del gen del antagonista de la interleucina 1 (IL1RN) y vimos que los homocigotos para el alelo 1, eran más frecuentes en alcohólicos que en controles ($p = 0,000$; OR = 4,81; IC al 95 %: 2,14 – 10,79) y que no había diferencia al comparar dependencia de alcohol con abuso de alcohol, ni tampoco alcohólicos con cirrosis hepática, y alcohólicos sin enfermedad hepática. Estudiamos también un polimorfismo situado en la región promotora (-511 T/C) del gen de la interleucina 1 beta, y vimos que los homocigotos para el alelo 1 de este polimorfismo, también eran más frecuentes en alcohólicos que en controles ($p = 0,017$), OR = 2,08; IC al 95 %: 1,17-3,69) mientras que no había diferencia al comparar dependencia de alcohol con abuso, ni tampoco alcohólicos con cirrosis y alcohólicos sin hepatopatía. Estudiamos también otro polimorfismo de esta misma interleucina 1 Beta situado en el exón 6 (+3953 T/C); los homocigotos para el alelo 1 de este polimorfismo, eran más frecuentes en dependencia de alcohol, que en abuso de alcohol, y no había diferencias entre alcohólicos y controles, ni tampoco entre cirrosis hepática y alcohólicos sin enfermedad hepática alcohólica.

La familia de los genes de la IL-1 está localizada en el brazo largo del cromosoma 2; estos genes codifican al menos 9 proteínas entre ellas IL-1 alfa, IL-1 beta, antagonista del

receptor de la IL-1 (IL1RN) y receptor de tipo I de la interleucina 1. Al receptor de tipo I de la interleucina 1 se unen tanto la IL-1 alfa, como la IL-1 B y el antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1Ra). La IL-1 alfa y la IL-1 Beta tiene una acción proinflamatoria mientras que el IL-1 Ra compite con la IL-1 alfa y la IL-1 beta por su unión al receptor y es un inhibidor potente de la actividad IL-1. El nivel de expresión de algunas de estas citocinas se ha asociado con la presencia de polimorfismos de los genes que las codifican situados, preferentemente en regiones promotoras y en secuencias codificadoras.

Estudiamos un polimorfismo de la interleucina 1 alfa, localizado en la región promotora y un polimorfismo del receptor tipo 1 de la interleucina 1, también localizado en la región promotora, y no encontramos diferencias entre alcohólicos y controles y tampoco entre abuso y dependencia.

Nuestros resultados muestran, por primera vez, que hay una asociación entre el alelo 1 del gen IL1RN y el alelo 1 del polimorfismo en posición -511 del gen IL-1 beta con el alcoholismo pero no con la cirrosis hepática. Y del genotipo 1/1 del polimorfismo +3953 IL-1B con la dependencia. Hasta este momento llama la atención que polimorfismos de citocinas involucradas en la patogenia de la EHA no se asocien con cirrosis y sí con el alcoholismo "per se". Una hipótesis para explicar estos resultados es que existan otros genes relacionados con el alcoholismo y no conocidos hasta el momento en las proximidades de los genes que hemos estudiado y con los que estaría en desequilibrio de ligamiento. Pero al estudiar otros dos genes más de la familia de la IL-1: la IL1-alfa y el IL1R1 y no encontrar asociación con el alcoholismo se puede descartar de manera razonable la existencia de desequilibrio de ligamiento con otros genes situados en el mismo cromosoma relacionados con el alcohol. Por el contrario es muy posible que las proteínas codificadas por IL1RN e IL1B estén implicadas en el alcoholismo.

Dado que es bien conocida la relación que hay entre citocinas como la IL1 y SNC, y conociendo el papel que juegan los neurotransmisores en el desarrollo del hábito alcohólico, nuestros resultados sugieren que puede existir una relación entre IL1, neurotransmisores y alcohol.

La activación de citocinas en el SNC puede dar lugar a cambios profundos en las funciones neurales; las citocinas pueden influir en la liberación de neurotransmisores en el núcleo accumbens, una región asociada con los efectos gratificantes de las drogas y la aparición de dependencia.

Se ha descrito que la IL-1 aumenta la liberación de dopamina en el hipotálamo y en el núcleo accumbens; y que la administración sistémica de IL-1 también estimula la liberación de serotonina desde el núcleo paraventricular.

Polimorfismos de la IL1B (-511 T/C) se han descrito asociados a esquizofrenia y los del IL1RN a otros trastornos mentales.

Así pues además de modular la respuesta inflamatoria, la IL-1 por vías diferentes puede estar relacionada con enfermedades mentales. Nuestros resultados sugieren, por primera vez, que los genes IL1RN e IL1B pueden desempeñar un papel importante en la susceptibilidad individual para desarrollar alcoholismo por mecanismos aún no bien conocidos.

Bien, agradeceremos el esfuerzo que habéis hecho de concreción, teniendo en cuenta los excelentes datos de los que disponíais y abrimos un turno de palabras por si alguien quiere hacer algún comentario, alguna pregunta mientras..., si.

POLIMORFISMOS DEL ADN EN EL ALCOHOLISMO

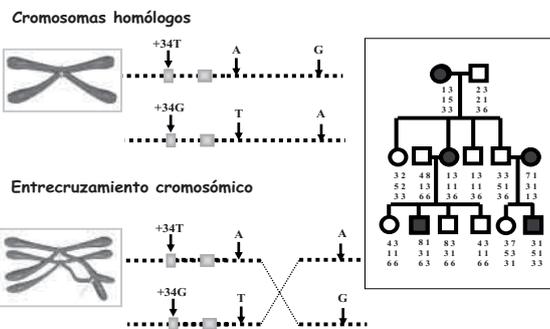
Isabel J. Pastor Encinas

Unidad de alcoholismo. Servicio de Medicina Interna II
Hospital Universitario de Salamanca

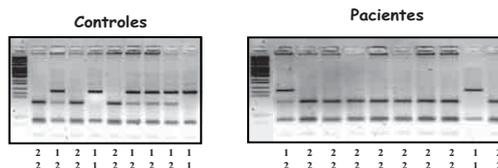
Unidad de Medicina Molecular. Facultad de Medicina
Universidad de Salamanca

Bajo el término alcoholismo se incluye un conjunto heterogéneo de trastornos cuyo denominador común es su relación con la ingesta de etanol

ESTUDIOS DE LIGAMIENTO



ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN



POLIMORFISMOS DEL ADN EN EL ALCOHOLISMO

- ▶ Polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo del etanol

- ▶ Polimorfismos de genes relacionados con la dependencia del alcohol

ALCOHÓLICOS	263	♂
Dependencia	159	
Abuso	104	

Consumo de alcohol >120 g/día
 Tiempo de consumo > 10 años

CONTROLES	100	♂
------------------	------------	---

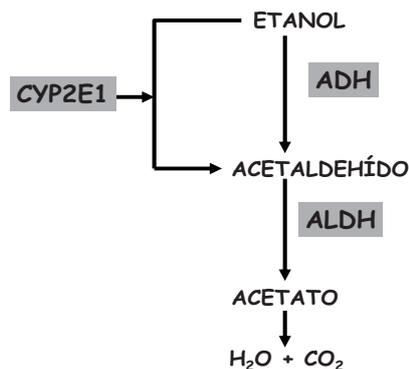
Consumo de alcohol < 10 g/día
 Sin antecedentes familiares o personales de alcoholismo

POLIMORFISMOS DEL ADN

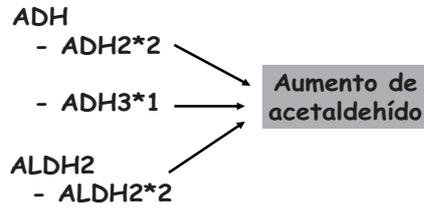
- ▶ Polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo del etanol

- ▶ Polimorfismos de genes relacionados con la dependencia del alcohol

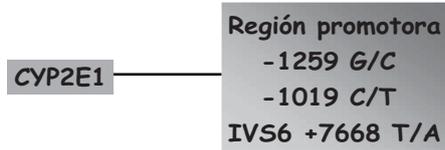
METABOLISMO DEL ETANOL



**POLIMORFISMOS DE GENES
RELACIONADOS
CON EL METABOLISMO DEL ETANOL**



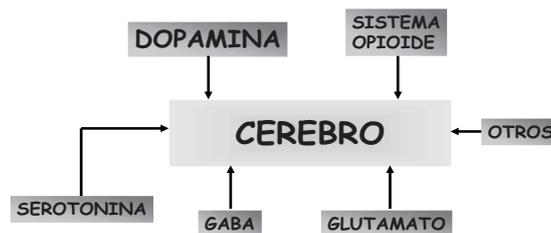
**POLIMORFISMOS DE GENES
RELACIONADOS
CON EL METABOLISMO DEL ETANOL**



POLIMORFISMOS DEL ADN

- ▶ Polimorfismos de genes relacionados con el metabolismo del etanol
- ▶ Polimorfismos de genes relacionados con la dependencia del alcohol

**DEPENDENCIA ALCOHÓLICA
Neurotransmisores**



**POLIMORFISMOS DEL ADN
RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA**

- Receptor y transportador de dopamina
- Receptor y transportador de serotonina
- Sistema opioide
- Receptor $GABA_A$
- Otros genes

**POLIMORFISMOS DEL ADN
RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA**

- Receptor y transportador de dopamina
- Receptor y transportador de serotonina
- Sistema opioide
- Receptor $GABA_A$
- Otros genes

RECEPTORES DE DOPAMINA

DRD1

DRD2 ————— 3' UTR

DRD3

DRD4

TRANSPORTADOR DE DOPAMINA

**POLIMORFISMOS DEL ADN
RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA**

- Receptor y transportador de dopamina
- Receptor y transportador de serotonina
- Sistema opioide
- Receptor $GABA_A$
- Otros genes

TRANSPORTADOR DE SEROTONINA

SLC6A4 ——— Ins/del 44 pb
5' UTR

RECEPTORES DE SEROTONINA

HTR1A

HTR2A ——— + 102 T/C

HTR2C

POLIMORFISMOS DEL ADN RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA

- Receptor y transportador de dopamina
- Receptor y transportador de serotonina
- Sistema opioide
- Receptor $GABA_A$
- Otros genes

SISTEMA OPIOIDE

Receptor opioide μ ——— +118 A/G (Asn80Asp)
IVS2+691 G/C

Receptor opioide δ ——— +80 G/T (Phe27Cys)
+921 T/C

Receptor opioide κ ——— +36 G/T
+846 C/T

POLIMORFISMOS DEL ADN RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA

- Receptor y transportador de dopamina
- Receptor y transportador de serotonina
- Sistema opioide
- Receptor $GABA_A$
- Otros genes

RECEPTORES GABA_A

GABRB1

GABRB3

GABRA5

GABRB2

GABRA1 ———— IVS12 +45A/G

GABRA6 ———— Pro385Ser

POLIMORFISMOS DEL ADN RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA

- Receptor y transportador de dopamina
- Receptor y transportador de serotonina
- Sistema opioide
- Receptor GABA
- Otros genes

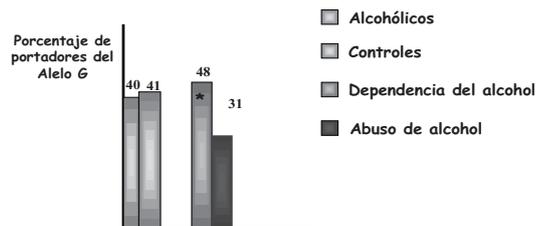
POLIMORFISMOS DE OTROS GENES RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA

CNR1 ———— +1359 G/A

SIGMAR1 ———— -485 T/A
-241-240 GC/TT

PTK-Fyn ———— -93 A/G

PTK-Fyn -93 A/G



* p= 0,015; OR: 2,077, IC al 95 %: 1,165-3,704

POLIMORFISMOS DE OTROS GENES RELACIONADOS CON LA DEPENDENCIA

NEUROPÉPTIDO Y

TRANSPORTADOR DE GLUTAMATO

NOS NEURONAL

PTOTEINCINASAS A Y C

POLIMORFISMOS DE GENES QUE INTERVIENEN EN LA RESPUESTA INMUNE

IL-1

IL-2

IL-4

IL-6

IL-8

IL-10

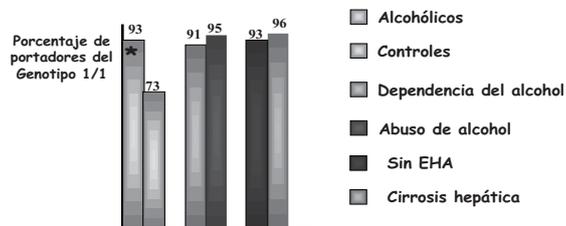
IL-12

TNF- α

Factor nuclear kappa-B

Inhibidor del factor nuclear kappa-B

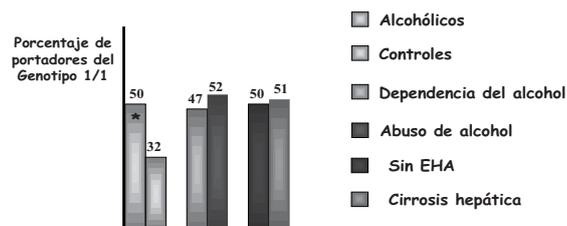
VNTR IL1RN



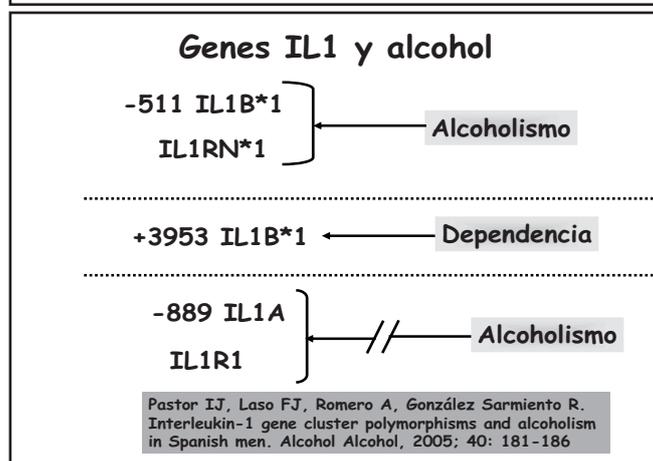
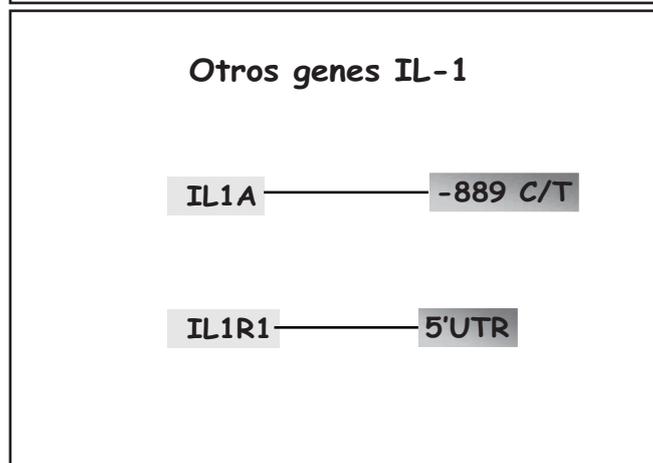
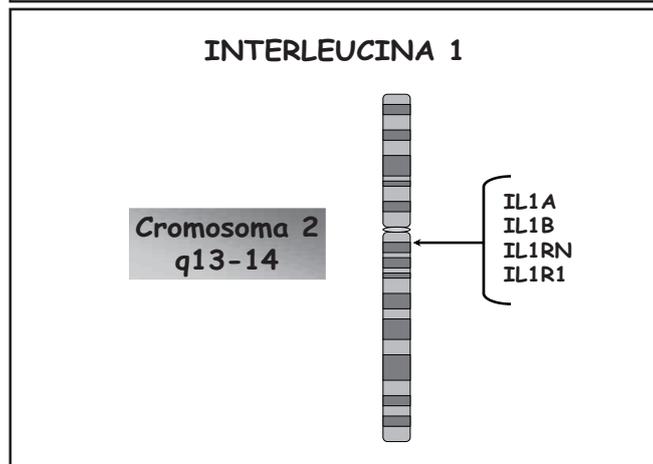
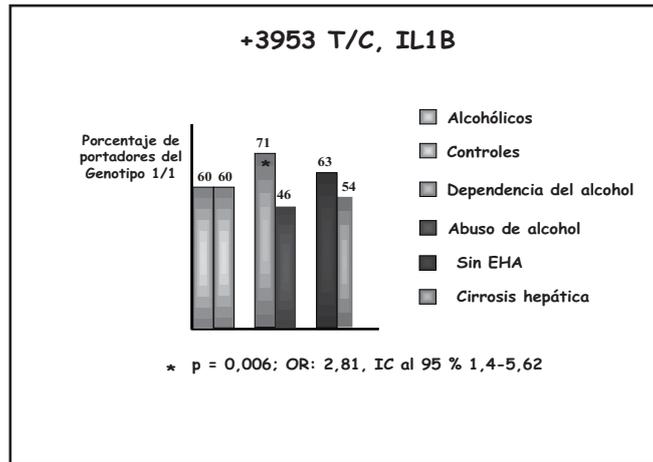
* P = 0,000; OR: 4,81, IC al 95 %: 2,14-10,79

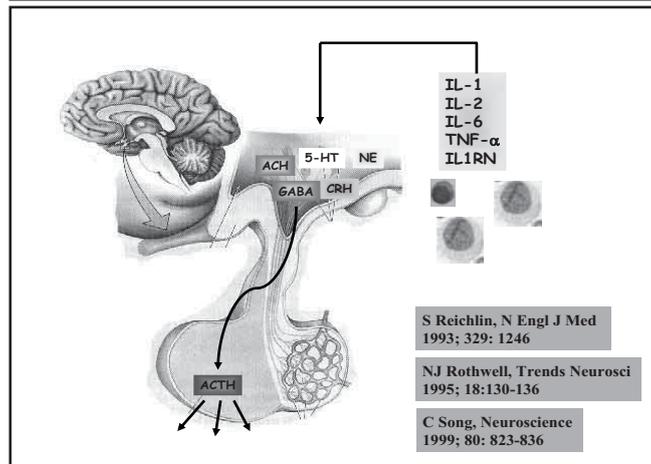
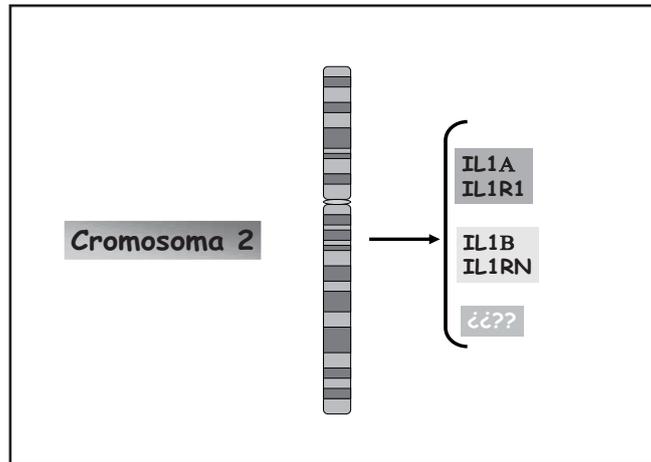
Pastor IJ, Laso FJ, Ávila JJ, Rodríguez RE, González-Sarmiento R. Polymorphism in the Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene is associated with alcoholism in Spanish men. Alcohol Clin Exp Res, 2000; 24: 1479-1482

-511 T/C, IL1B



* p= 0,017; OR: 2,08, IC al 95 %: 1,17-3,69





"Crew"

Unidad de Alcoholismo. Servicio de Medicina Interna
Hospital Universitario de Salamanca

F. Javier Laso
Isabel J. Pastor
Miguel Marcos

Servicio General de Citometría
Universidad de Salamanca

Alberto Orfao
Julia Almeida
José M. Vaquero

Unidad de Medicina Molecular. Departamento de Medicina
Universidad de Salamanca

Rogelio González-Sarmiento

pencinas@usal.es