



UNIVERSITAT DE
BARCELONA


Genètica i dependència de cocaïna: Estudis d'associació, transcriptòmica i models animals

Judit Cabana Dominguez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**Genètica i dependència de cocaïna:
estudis d'associació, transcriptòmica
i models animals**

Judit Cabana Domínguez

2018

**Genètica i dependència de cocaïna:
estudis d'associació, transcriptòmica i models animals.**

Memòria presentada per
Judit Cabana Domínguez

Per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona
Programa de Genètica
Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística
Curs 2017/2018

Tesi dirigida pel **Dr. Bru Cormand Rifà** i el **Dra. Noèlia Fernàndez Castillo** al Departament de
Genètica, Microbiologia i Estadística de la Universitat de Barcelona

Dr. Bru Cormand Rifà

Dra. Noèlia Fernàndez Castillo

Judit Cabana Domínguez
2018

Agraïments

Quan estàs acabant el batxillerat, no deixes de sentir una pregunta que es repetirà al llarg de la teva vida més vegades de les que podries imaginar: "I ara què? Què vols estudiar?". Unes poques paraules que amaguen al darrera una gran incertesa. Escollir. A la vida ens toca escollir moltes vegades i no sempre triarem la millor opció, però al final l'important és gaudir de les decisions que has pres perquè són les que t'han portat fins aquí. Quan vaig acabar el batxillerat no sabia què volia estudiar, igual que quan vaig acabar la carrera no sabia com volia continuar, però mirant-ho amb perspectiva no podria haver escollit un camí millor, perquè cap altre m'hauria portat aquí.

En primer lloc, m'agradaria donar les gràcies als meus directors de tesi, el **Bru** i la **Noe**, per haver-me acollit al seu grup, per haver-me guiat, recolzat i animat a seguir. Per ensenyar-me a qüestionar-ho tot i ajudar-me a buscar respostes. Però sobretot, moltes gràcies per confiar en mí més del que confiava jo mateixa.

M'agradaria donar les gràcies a tota la gent del lab, en aquests anys he après moltes coses de vosaltres, i no solament de ciència. He après a treballar en equip, a afrontar els problemes i buscar solucions, a demanar ajuda i també a oferir-la. En aquesta tesi hem compartit moltes hores de feina, d'estrès i anàlisis infinites, però també moltes hores de riures, vídeos, cançons, balls, tàpers, calçotades, viatges, sopars, escapades a la platja (potser algun dia aconseguim anar a la muntanya) i converses infinites als n-èssims grups de whatsapp.

Moltes gràcies a la **Laura**, companya de drogues i aventures, juntes aconseguirem tot el que ens proposem, encara que caiguem pel camí. A la **Anu**, my favorite bioinformatician, thank you for your help at any time any day. A piece of this thesis is also yours girls!!! A la **Bàrbara**, per estar sempre aquí quan t'he necessitat, t'has convertit en una gran amiga i confident que espero poder conservar per sempre. **Moní**, como siempre te digo "Sin tí el laboratorio se caería a pedazos", gracias por tener siempre un momento para ayudarme, escucharme y darme fuerzas. Aunque a veces no recuerdes mí nombre, sé que en el fondo tú también me quieres. **Cèlia**, els inicis a un lloc nou són difícils, però sempre són més fàcils si tens la sort de començar a aprendre d'algú com tu. I com no, gràcies a les tres pels llargs esmorzars a primera hora del matí!!! **Núria**, tan intensa y dramática, eres una de las mejores personas que he conocido, quien mejor que tú para compartir cumple! A la **Noelí**, la meva valenciana preferida, per compartir amb mí coneixements informàtics i saníssimes receptes delicioses. A la **Neus**, companya de la Catalunya Central, per les converses llargues i profundes, els riures i la xocolata compartida. A **Marta** y su memoria extraordinaria,

*muchas gracias por todas las veces que me has ayudado y perdona por las que no te he escuchado. A la **Jenny**, com oblidar-me de tu companya de poyata, gràcies per les hores compartides a cultius. A la **Roser C**, tot i que fa molt poquet que ens coneixem, moltes gràcies pels bons consells i els ànims a la recta final de la tesi. Al jovent del lab i futur de la ciència, **Laura**, **Ester**, **Guillem**, **Edgar** i **Hèctor**, espero que visqueu intensament l'aventura de la tesi, moltes gràcies per tots els moments compartits,. Als companys de la segona planta, la **Mariona** i el **Victor**, gràcies per ajudar-me a batallar amb la màquina de westerns. I moltes gràcies també a la **Susanna**, el **Daní**, la **Lluïsa** i la **Roser** per aguantar les meves xerrades dels Journal Club i donar tan bones idees per seguir amb els projectes.*

*Gràcies a les noies de Vall d'Hebron, la **Marta**, la **Crís**, l'**Iris** i la **Paula**, per trobar sempre un moment per respondre els meus dubtes infinits. I al grup de la UPF, el **Rafa**, la **Laura** i, sobretot, a l'**Elena**, per donar-me la oportunitat d'aprendre un munt de coses sobre els ratolínets, sempre amb un somriure.*

*Moltíssimes gràcies a la meva família, per recolzar sempre les meves decisions, tot i que algunes vegades no fossin les que us haurien agradat per mi, per interessar-vos per la meva feina i deixar que us avorrís amb les meves històries. Al **papa** i la **mama**, per haver lluitat sempre per nosaltres i per haver-nos ajudat a aconseguir tot el que ens hem proposat. Als **germans**, per mimar-me i malcriar-me, això de ser la petita havia de tenir algun avantatge! Als peques de la casa, **Marc**, **Bruna**, **Jan**, **Nina** i **Pau**, per ensenyar-me tantes coses tot i ser tan petits. A les **cunyades** i al **cunyat**, que sou casí com germans, i als **sogres** per acollir-me com una filla. A l'**abuelo** per no oblidar-se mai de mi. I a les **iaïes** i el **iaío Pere**, sé que estariu molt orgullosos de mi.*

*I com no, als meus gatets negres, el **Poe** i l'**Eyre**, per acompanyar-me en les llargues jornades d'escriptura i inclús voler participar en ella. I a l'**Alex**, per haver compartit amb mi casí una vida. Gràcies per recolzar-me sempre, per obligar-me a parar quan feia falta i animar-me a continuar quan les forces fallaven. Per seguir al meu costat després de tant de temps, sé que també ha estat dur per tu, però al final segur que haurà valgut la pena. T'estimo.*

“Perfer et obdura; dolor hic tibi proderit olim”

Ovidí

RESUM

La cocaïna és una droga psicoestimulant que actua directament sobre sistema de recompensa del cervell tot produint sensació de plaer. A més, els seus efectes sobre altres àrees cerebrals produeixen alteracions en l'estat d'ànim i d'alerta, la resistència i la locomoció, entre d'altres, que a la llarga poden tenir conseqüències greus sobre la salut. La cocaïna produeix canvis en l'expressió gènica que estan a la base de les neuroadaptacions i del remodelatge dels circuits neuronals que donen lloc a l'addicció. La interacció entre l'ambient i els factors genètics i epigenètics de predisposició determinen com es produiran aquestes adaptacions, tot afavorint el desenvolupament de la dependència en determinats individus.

Tot i que la dependència de cocaïna té una heretabilitat molt alta, que supera el 70% segons alguns estudis, encara se sap molt poc sobre el paisatge genètic d'aquesta patologia. És per això que en aquesta Tesi Doctoral ens hem proposat identificar factors genètics de risc utilitzant aproximacions diverses, que inclouen els estudis d'associació genètica, la transcriptòmica i els models animals. En relació als estudis d'associació cas-control, hem seguit dues aproximacions: els estudis basats en hipòtesis i els estudis lliures d'hipòtesis. Els primers ens han permès identificar dues variants de risc de tipus SNP que alteren llocs d'unió de microRNAs als seus gens diana (*NFAT5* i *PLCB1*) i una variant de nombre de còpies (CNV) al gen *NSF*. En el cas del gen *PLCB1* hem realitzat estudis en un model animal genoanul·lat per determinar la seva contribució a la dependència de cocaïna. Emprant la segona aproximació, d'una banda hem replicat a la nostra mostra una associació descrita prèviament en un estudi a escala genòmica (GWAS) de dependència de drogues, i d'altra banda s'ha realitzat una metanàlisi de diversos GWAS de dependència de cocaïna que ens ha permès estudiar la base genètica compartida entre la dependència de cocaïna i altres condicions comòrbides. També s'ha avaluat l'efecte agut de la cocaïna sobre l'expressió gènica a nivell de mRNAs i de microRNAs en un model dopaminèrgic en cultiu. I, finalment, s'ha analitzat la convergència de resultats de tots els estudis de transcriptòmica en humans als quals hem tingut accés, amb l'objectiu d'identificar gens i vies comunes que assenyalin possibles dianes terapèutiques.

ÍNDEX

ABREVIATURES

INTRODUCCIÓ	1
1. Addicció a drogues	3
2. Epidemiologia del consum de drogues	3
2.1 Dades epidemiològiques del consum de cocaïna	4
3. Diagnòstic de la dependència	5
4. Neurobiologia de l'addició	7
4.1 Etapes de l'addició	8
4.1.1 Afartament i intoxicació	9
4.1.2 Abstinència i sentiments negatius	10
4.1.3 Obsessió i anticipació (o deler)	12
5. La cocaïna	13
5.1 Clínica del consum de cocaïna	13
5.2 Dianses farmacològiques de la cocaïna	15
5.3 Tractament de l'addició a cocaïna	16
6. Genètica i cocaïna	18
6.1 Models animals genoanul·lats i transgènics en cocaïna	18
6.1.1 Models genoanul·lats pels transportadors de monoamines	20
6.1.2 Models transgènics pels transportadors de dopamina	21
6.1.3 Models genoanul·lats de receptor monoaminèrgics	22
6.1.4 Altres models genoanul·lats	24
6.2 Efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica	24
6.3 Regulació epigenètica	30
6.3.1 Modificació d'histones	30
6.3.2 Metilació del DNA	32
6.3.3 microRNAs	33
6.3.3.1 El paper dels microRNAs al SNC	34
6.3.3.2 El paper dels microRNAs en la dependència de cocaïna	35
6.4 Factors genètics de susceptibilitat a la dependència de cocaïna	38
6.4.2 Estudis d'associació genètica	38
6.4.2.1 Estudis de gens i sistemes candidats	39
6.4.2.2 Estudis d'associació a escala genòmica	44
OBJECTIUS	47
RESULTATS	51
Informe dels directors	53
CAPÍTOL 1: ESTUDI DE LA POSSIBLE ASSOCIACIÓ ENTRE UNA VARIANT DE NOMBRE DE CÒPIES (CNV) AL GEN NSF I LA DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA.	57

Article 1: “Associació a la dependència de cocaïna d’una variant de nombre de còpies molt polimòrfica del gen <i>NSF</i> ”.	57
CAPÍTOL 2: CONTRIBUCIÓ DEL GEN <i>PLCB1</i> A LA DEPENDÈNCIA DE DROGUES EN GENERAL, I A LA COCAÏNA EN PARTICULAR.	71
Article 2: “Associació del gen <i>PLCB1</i> a la dependència de drogues”.	71
ANNEX A L’ARTICLE 2	85
CAPÍTOL 3: ESTUDIS D’ASSOCIACIÓ A ESCALA GENÒMICA (GWAS) AMB LA DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA.	95
Article 3: “Avaluació de variants prèviament associades a escala genòmica a la dependència de drogues en una mostra espanyola”.	95
Article 4: “Metanàlisi de GWAS de dependència de cocaïna: base genètica compartida amb condicions comòrbides”.	107
CAPÍTOL 4: EFECTE DE LA COCAÏNA SOBRE L’EXPRESSIÓ GÈNICA: ESTUDIS EN MODELS NEURONALS EN CULTIU I MOSTRES DE CERVELL POST-MORTEM HUMANES.	149
Article 5: “Un estudi transcryptòmic i genètic identifica el gen <i>NFAT5</i> com un candidat per la dependència de cocaïna”.	149
Article 6: “Els miRNAs miR-9, miR-153 i miR-124 estan regulats a la baixa per l’efecte de la cocaïna en un model cel·lular dopaminèrgic i contribueixen a la dependència de cocaïna”.	191
Article 7: “Identificació de gens i vies comunes alterades per l’efecte de la cocaïna en estudis de transcriptòmica en humans”.	213
DISCUSSIÓ	235
1. Variants de susceptibilitat a la dependència de cocaïna	237
1.1 Estudis d’associació cas-control: consideracions i metodologia emprada	237
1.2 Identificació de variants associades en els nostres estudis	243
1.2.1 Estudis basats en hipòtesis	243
1.2.2 Estudis lliures d’hipòtesis	245
2. Canvis d’expressió gènica induïts per la cocaïna	249
2.1 Microarrays i seqüenciació massiva (RNAseq)	249
2.2 Estudis transcriptòmics en humans i ratolins	250
2.3 Gens i vies identificades en els nostres estudis d’expressió	251
3. Gens amb expressió alterada per cocaïna que tenen variants de risc	253
4. Models animals genoanul·lats (<i>knock-out</i>)	254
5. Perspectives de futur	256
CONCLUSIONS	259
BIBLIOGRAFIA	263

ABREVIATURES

5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina

ACh: Acetilcolina

BDNF: Factor neurotròfic derivat de cervell, *Brain-derived neurotrophic factor*

CDCV: Malaltia comuna- variant comuna, *common disease - common variant*

CDRV: Malaltia comuna- variant rara, *common disease - rare variant*

CNV: Variant de número de còpies, *copy number variant*

CPP: Preferència de lloc condicionada, *conditioned place preference*

CRF: Factor alliberador de la corticotropina

DA: Dopamina

DAT: Transportador monoaminèrgic de dopamina

DRD1-5: Receptor de dopamina 1-5

DS: Nucli estriat dorsal

DSM: Manual Diagnòstic i Estadístic de Trastorns Mentals, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

EMCDDA: Observatori Europeu de les Drogues i Toxicomanies, *European Monitoring Center For Drugs and Drug Addiction*

FDR: *False Discovery Rate*

FR: Test de raó fixa, *fixed ratio*

GABA: Àcid γ -aminobutíric

GRIA2: Subunitat 2 del receptor ionotròpic AMPA de glutamat

GWAS: Estudi d'associació a escala genòmica, *genome-wide association study*

HWE: Equilibri Hardy-Weinberg

HPC: Hipocamp

HZ: heterozigot

ICD: Classificació Internacional de Malalties, *International Classification of Diseases*

KD: Genomívat, *gene Knock-Down*

KO: Genoanul·lat, *gene Knock-Out*

LD: Desequilibri de lligament

LDSC: *Linkage Disequilibrium Score regression*

LTP: Potenciació a llarg termini, *Long-term potentiation*

MAF: freqüència de l'al·lel menor

MAPK: Proteïnes-cinases activades per mitògens, *mitogen activated protein kinase*

MeCP2: Proteïna d'unió 2 a grups metil CpG

NAC: Nucli accumbens

NE: Noradrenalina

NET: Transportador monoaminèrgic de noradrenalina

NSF: N-etilmaleimida

OFC: Escorça orbitofrontal

OMS: Organització Mundial de la Salut

PFC: Escorça prefrontal

PR: Test de raó progressiva, *progressive ratio*

PRS: *Poligenic Risk Score*

SERT: Transportador monoaminèrgic de serotonina

SNC: Sistema nerviós central

SNP: Canvi d'un sol nucleòtid, *single nucleotide polymorphism*

TDAH: Trastorn per dèficit d'atenció/hiperactivitat

TDM: Trastorn depressiu major

UNDOC: Oficina de les Nacions Unides Contra la Droga i els Delictes

VTA: Àrea ventral tegmental

WT: Soca salvatge, *wild-type*

INTRODUCCIÓ

1. Addicció a drogues

L'addicció a drogues és un trastorn neuropsiquiàtric complex associat a comportaments maladaptatius i destructius, que consisteixen en l'ús persistent, compulsiu i incontrolat d'una droga. Les drogues d'abús produeixen sensació de plaer, reforç i gratificació tot desplaçant les recompenses naturals de l'organisme i afavorint el seu ús continuat. L'ús reiterat d'aquestes substàncies indueix canvis adaptatius al Sistema Nerviós Central (SNC) alterant-ne el funcionament i donant lloc a la simptomatologia associada a la dependència: la tolerància, la pèrdua de control, l'establiment del *deler* o *craving* (desig intens de consumir una substància), l'abstinència i els canvis emocionals i anímics que persisteixen fins molt de temps després de que cesi el consum. Els canvis neurobiològics induïts pel consum de drogues es mantenen, són progressius i són els responsables de la cronificació de l'addicció i l'aparició de recaigudes.

2. Epidemiologia del consum de drogues

A nivell personal, el consum i l'abús de drogues és un problema que afecta tant l'entorn familiar com les relacions interpersonals i laborals. A més a més, suposa seriosos riscos per a la salut del consumidor que poden arribar a causar-ne la mort. A nivell global, el consum de drogues té un gran impacte socio-sanitari, i els factors narco-polítics i narco-econòmics generen desequilibris en les relacions entre països i regions.

L'últim informe de l'Oficina de les Nacions Unides Contra la Droga i els Delictes (UNDOC, 2017) estimava que uns 250 milions de persones (el 5% de la població mundial d'entre 15 i 64 anys) va consumir alguna droga il·lícita com a mínim un cop durant l'any 2015. Aquestes dades incrementen significativament si ens centrem en les drogues legals, com l'alcohol i el tabac, amb una prevalença del 42% i 25%, respectivament. S'estima que 29,5 milions de persones que consumeixen drogues (0,6% de la població adulta mundial) pateixen trastorns relacionats amb el seu consum (UNDOC, 2017). En conjunt aquestes substàncies van produir uns 190.000 morts l'any 2015, és a dir 39,8 morts per milió de persones entre 15 i 64 anys (UNDOC, 2017).

L'Observatori Europeu de les Drogues i Toxicomanies (*European Monitoring Center For Drugs and Drug Addiction*; EMCDDA) va estimar l'any 2016 que a Europa aproximadament 93 milions de persones, el 25% dels adults entre 15 i 64 anys, havien provat drogues il·lícites com a mínim una vegada a la seva vida (EMCDDA, 2017), amb una major proporció d'homes (56,8 milions) que de dones (36,8 milions). D'aquests, la majoria haurien consumit més d'un tipus de substància a la vegada, per exemple un 33%

hauria consumit dos tipus de substàncies diferents i un 10% n'hauria consumit tres (EMCDDA, 2014). Aquesta elevada prevalença del consum simultani de múltiples drogues és degut a que part de la base genètica i ambiental de totes les dependències és comuna, a més dels factors específics de cada substància (Xian *et al.*, 2008; Ozburn, Janowsky i Crabbe, 2015; Palmer *et al.*, 2015).

La droga il·legal més consumida arreu del món és el cànnabis (aproximadament entre 128 i 238 milions de consumidors; Taula 1), seguida dels opiacis (28,4 - 42,7 milions) i la cocaïna (13,0 - 22,8 milions).

Taula 1. Nombre estimat de consumidors de drogues il·legals (milions) d'entre 15 i 64 anys per regió i subregió l'any 2015. *World Drug Report 2017*, UNDOC.

	Cànnabis	Opiacis	Cocaïna	Èxtasi	Amfetamines
Europa	27,4 - 29,5	4,3 - 4,9	3,5 - 5,3	3,2 - 4,7	1,9 - 3,2
Àfrica	21,1 - 64,4	0,9 - 3,5	0,9 - 5,1	0,4 - 2,2	1,5 - 10,2
Nord	2,5 - 10,4	0,1 - 0,6	0,21 - 0,26	-	0,3 - 1,4
Oest i Central	13,1 - 33,8	-	0,6 - 2,7	-	-
Amèrica	48,4 - 33,8	13,4 - 16,2	7,8 - 9,1	3,3 - 3,5	6,3 - 8,8
Nord	39,6 - 40,0	13,2 - 14,6	5,5 - 5,8	2,8 - 2,9	
Central	-	-	0,1 - 0,2	0,01 - 0,03	0,1 - 0,3
Sud	7,9 - 8,5	0,2 - 1,4	2,1 - 2,7	0,4 - 0,5	0,6 - 0,7
Carib	0,2 - 1,9	0,03 - 0,2	0,05 - 0,3	0,01 - 0,1	0,01 - 0,5
Àsia	29,1 - 88,8	9,1 - 17,3	0,3 - 2,2	1,9 - 23,1	4,4 - 37
Oceania	2,2 - 3,7	0,6 - 0,8	0,4 - 0,5	0,5 - 0,6	0,4 - 0,5
Estimació Global	128,1 - 237,7	28,4 - 42,7	13,0 - 22,8	9,3 - 34,1	14,5 - 59,7

2.1 Dades epidemiològiques del consum de cocaïna

La cocaïna és la droga psicoestimulant il·legal més consumida arreu del món. Des de 1998 el seu consum ha incrementat de forma generalitzada, excepte a Amèrica del Nord, on el seu ús ha disminuït en els últims anys (Figura 1, UNDOC, 2016).

A Europa, s'estima que al voltant de 17,5 milions de persones (5,2% dels adults entre 15 i 64 anys) han consumit cocaïna almenys un cop

a la seva vida, dels quals 2,3 milions d'adults joves de 15 a 34 anys (l'1,9% d'aquest grup d'edat) en van consumir durant l'any 2015, majoritàriament homes (2:1). Tot i que hi ha grans diferències entre països

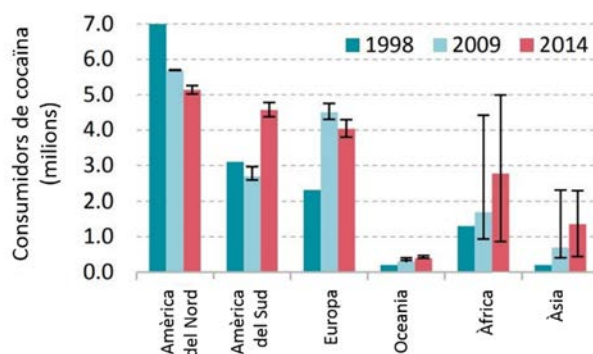


Figura 1. Nombre de consumidors de cocaïna (en milions) per regió des de 1998 a 2014. Adaptat de *World Drug Report 2016*, UNDOC.

europèus, la cocaïna és la segona droga il·legal més consumida a Europa, després del cànnabis, amb una prevalença d'entre 0,5 i 9,7% de la població adulta de cada país. A Espanya, un dels països europeus amb més prevalença de consum de cocaïna, el 9,1% dels adults han consumit cocaïna algun cop a la seva vida i el 3% dels adults joves (entre 15 i 34 anys) ho han fet durant el 2015 (EMCDDA, 2017).

En relació a la prevalença de la dependència de cocaïna hi ha poca informació disponible. En els últims 20 anys tant sols 5 països han realitzat estudis per estimar la prevalença: Alemanya, Espanya, Suïssa, Iran i els Estats Units, i els resultats obtinguts oscil·len entre 0,07 i 0,52% (Degenhardt *et al.*, 2011). Un altre estudi realitzat als Estats Units va concloure que aproximadament el 5,5% dels consumidors de cocaïna poden desenvolupar dependència d'aquesta droga durant el primer any de consum, però que no més d'un 20% crearan dependència a llarg termini (Wagner i Anthony, 2002). Una nova anàlisi de les dades utilitzades en l'estudi anterior en base als criteris diagnòstics del DSM-IV (Manual Diagnòstic i Estadístic de Trastorns Mentals, American Psychiatric Association, 2013), van estimar que als Estats Units la prevalença de dependència a cocaïna al llarg de la vida era de l'1% (Compton *et al.*, 2007).

3. Diagnòstic de la dependència

L'ús o consum d'una substància és una expressió que engloba conductes que van des de l'ús ocasional fins la dependència. Clínicament hi ha una clara diferència entre l'ús ocasional d'una droga i el seu consum creixent, acompanyat de pèrdua de control del consum i aparició de la cerca compulsiva que caracteritzen l'addició.

El diagnòstic diferencial entre consum ocasional, abús i dependència es fa en base a un conjunt de criteris que dicta el Manual Diagnòstic i Estadístic de Trastorns Mentals de l'Associació Americana de Medicina (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; DSM). Aquest manual conté la classificació de totes les malalties mentals i proporciona descripcions clares de les categories diagnòstiques. Clàssicament s'utilitza la quarta edició revisada del manual (DSM-IV-TR) que permet distingir entre l'abús i la dependència d'una substància (Taula 2). En base a aquest manual es pot definir la dependència o addició com una patologia que compleix de 3 a 7 dels criteris. En els casos en què hi ha presència de tolerància i/o l'abstinència es parla de dependència fisiològica.

Actualment hi ha una versió més recent d'aquest manual, el DSM-V, que combina l'abús i la dependència en un sol trastorn a causa de les dificultats per distingir-los. En aquesta nova versió s'agrupen els 11 criteris descrits al DSM-IV-TR i s'estableixen tres graus de dependència en funció del

nombre de criteris que es compleixin: de 2 a 3 criteris es considera addicció lleu (similar a allò que abans es considerava abús d'una substància), de 4 a 5 addicció moderada i a partir de 6 criteris addicció severa. Tot i que aquest manual fou publicat el 2013, en molts centres se segueix utilitzant el DSM-IV-TR.

Taula 2. Criteris diagnòstics per a la dependència o abús d'una substància segons el DSM-IV-TR.

CRITERIS PER A L'ABÚS

Un o més dels següents criteris durant 12 mesos, sempre i quan el símptomes no assoleixin els criteris de dependència.

1. Consum recurrent que dona lloc a l'incompliment d'obligacions a nivell personal i/o professional.
2. Consum recurrent en situacions en les quals és físicament perillós.
3. Problemes legals relacionats amb la substància de forma reiterada.
4. Consum continuat tot i tenir problemes socials continuats o recurrents, o problemes interpersonals causats o exacerbats pels efectes de la substància.

CRITERIS PER A LA DEPENDÈNCIA

Tres o més dels següents criteris durant 12 mesos:

1. Tolerància, definida com a:
 - a) Necessitat d'incrementar el consum per aconseguir l'efecte desitjat.
 - b) L'efecte d'una mateixa quantitat de droga disminueix amb l'ús continuat.
2. Abstinència, definida com:
 - a) La síndrome d'abstinència típica de cada substància.
 - b) Consum de la substància per reduir o evitar els símptomes de l'abstinència.
3. Consum de quantitats més grans o durant un període més llarg del que inicialment es pretenia.
4. Presència d'un desig persistent o esforços infructuosos per controlar-ne o interrompre'n el consum.
5. Es destina molt de temps a activitats relacionades amb l'obtenció de la substància o en la recuperació dels seus efectes.
6. Reducció d'activitats socials importants, laborals o recreatives degut a consum.
7. Se segueix consumint la substància tot i tenir consciència dels problemes psicològics o físics persistents causats o exacerbats pel seu consum.

Un altre manual molt utilitzat per al diagnòstic de les addiccions és La Classificació Internacional de Malalties (*International Classification of Diseases; ICD*), desenvolupat per l'Organització Mundial de la Salut (OMS). La versió vigent és la desena (ICD-10). Aquest manual conté un total de 8 criteris, tot ells molt similars al DSM-V: tolerància, abstinència, ús continuat tot i conèixer les conseqüències negatives que això comporta, i altres indicadors de pèrdua de control. En aquest cas, per diagnosticar la dependència s'han de complir tres o més d'aquests criteris de forma continuada durant els últims 12 mesos. Tot i que hi ha petites diferències entre els dos manuals, ambdós permeten classificar de forma fiable la dependència d'una substància.

4. Neurobiologia de l'addicció

L'estudi de la neurobiologia de l'addicció a drogues va començar amb l'estudi de l'efecte agut de les drogues al SNC. Actualment, els estudis se centren en l'administració crònica i els canvis neuroadaptatius que donen lloc a la recaiguda. L'objectiu final és entendre els mecanismes genètics/epigènetics, cel·lulars i moleculars que participen en la transició del consum ocasional a la dependència (Koob i Volkow, 2010). Les drogues d'abús actuen directament o indirecta sobre diferents àrees del SNC produint plaer, recompensa i gratificació, però també pèrdua de control, tolerància, sensibilització, deler, síndrome d'abstinència, estrès cerebral i recaigudes en el consum (Caixa 1).

Caixa 1. Definicions.

Impulsivitat: Comportament definit per la predisposició a decisions ràpides i no planificades en resposta a un estímul sense considerar les conseqüències negatives envers un mateix o els altres (Moeller *et al.*, 2001).

Compulsivitat: Comportament que resulta en la perseveració en la resposta tot i les conseqüències adverses, perseveració en l'elecció de respostes incorrectes o en la reiniciació constant d'actes habituals (Everitt i Robbins, 2005).

Reforç positiu: Procés pel qual la presentació d'un estímul plaent incrementa la probabilitat de resposta.

Reforç negatiu: Procés pel qual la retirada d'un estímul aversiu incrementa la probabilitat de resposta.

Tolerància: Disminució progressiva dels efectes d'una substància després d'administracions repetides. En aquest cas s'ha d'incrementar la dosi per obtenir la mateixa resposta.

Sensibilització: Increment dels efectes d'una substància després d'administracions repetides.

Síndrome d'abstinència: Conjunt de símptomes físics i emocionals que apareixen després de repetides administracions d'una droga i la interrupció sobtada del consum. Podrien estar causats per l'activació de mecanismes compensatoris en resposta a l'efecte de la droga.

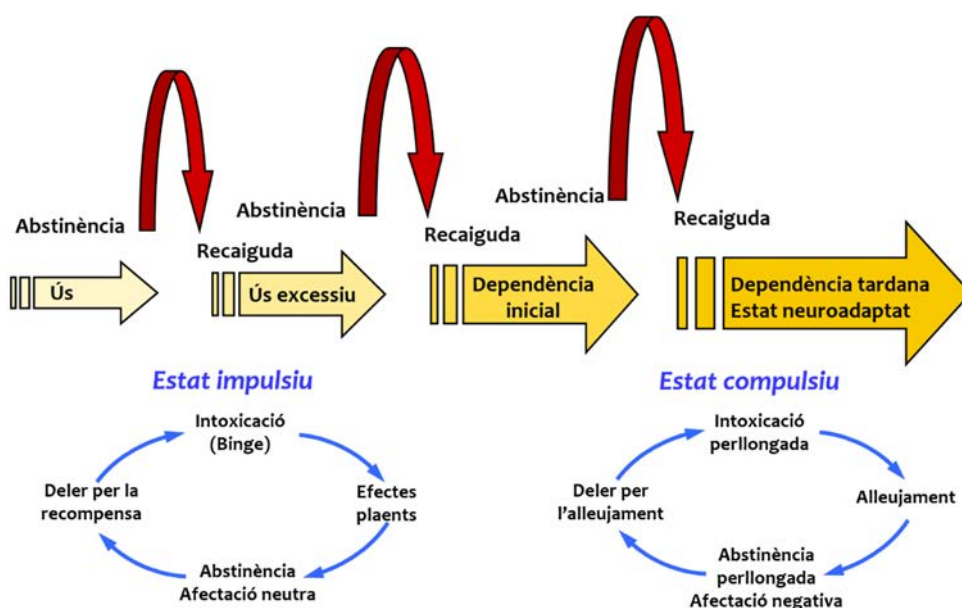


Figura 2. Esquema de la progressió de la dependència al llarg del temps, il·lustrant el canvi subjacent als mecanismes motivacionals. El procés addictiu progressa des del reforç positiu inicial, degut als efectes de la droga, cap a un reforç negatiu mantingut. Adaptat de Koob, 2009.

El desenvolupament de l'addicció combina aspectes tant del trastorn de control impulsiu com compulsiu (Caixa 1). Els cicles d'impulsivitat i compulsivitat donen lloc a un cicle addictiu complex en què la impulsivitat, associada al reforç positiu de la droga, acostuma a dominar en les fases primerenques, i la compulsivitat en les tardanes, on predomina el reforç negatiu (Figura 2). Les diferents etapes d'aquest cicle es van magnificant donant lloc a l'estat patològic conegut com a addicció (Koob, 2009).

4.1 Etapes de l'addicció

Podem dividir el cicle addictiu en tres etapes que se succeeixen les unes a les altres progressivament: afartament i intoxicació, abstinència i sentiments negatius, i obsessió i anticipació (o deler; Figura 3). Cadascun d'aquests estadis està associat a l'activació d'un conjunt de circuits neuronals específics i unes conseqüències clíniques i comportamentals característiques (Volkow, Koob i McLellan, 2016).

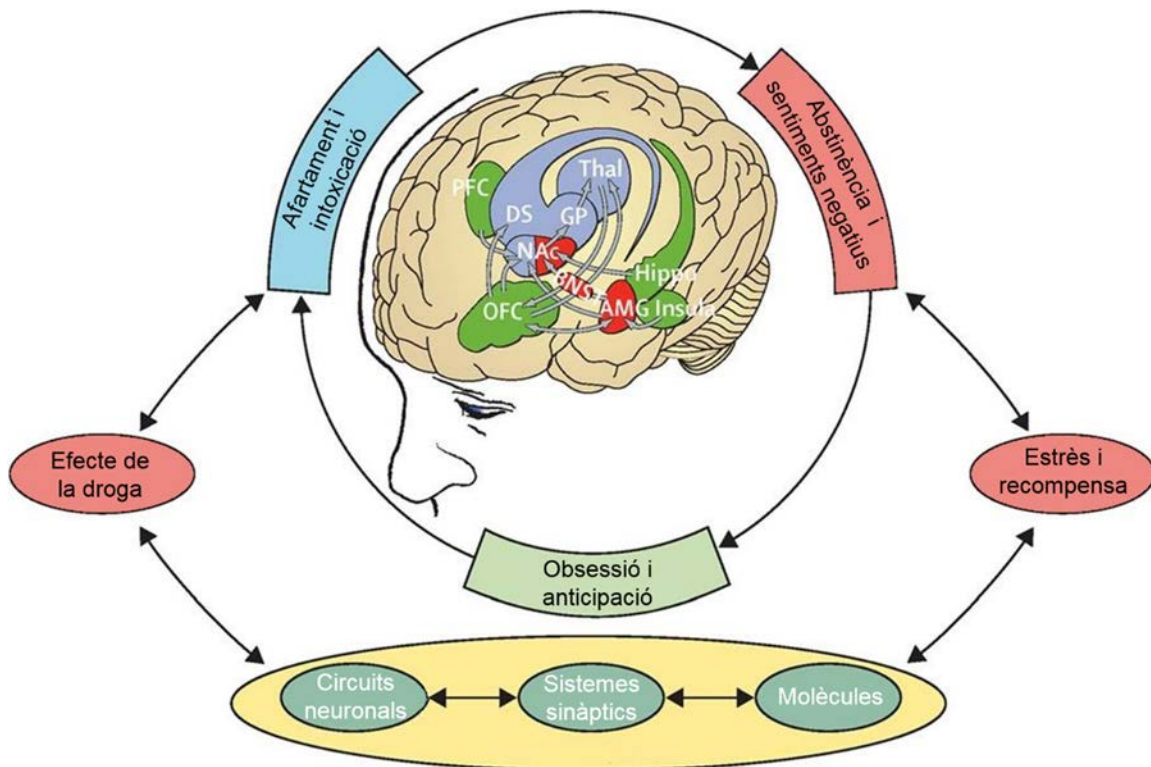


Figura 3. Etapes del cicle addictiu. Durant la intoxicació, l'activació del sistema de recompensa induïda per la droga (en blau) potencia els estímuls condicionats a les regions més sensibilitzades (en verd). Durant l'abstinència, l'activació de regions cerebrals implicades en les emocions (en vermell) produeix mal humor i fa més sensible a l'estrès. Durant l'obsessió, l'alteració de les funcions als escorça prefrontal (PFC) disminueixen la capacitat de contenir-se al fort desig de consum de la droga, la qual cosa desencadena la recaiguda i el cicle torna a començar. En aquest procés queden afectats tant el sistema dopaminèrgic i glutamatèrgic, com el sistema de control d'estrès del cervell, amb alteracions en la corticotropina i la dinorfina. En els diferents estadis del procés addictiu, el comportament de l'individu va canviant al llarg de la transició des de l'experimentació amb la droga fins l'addicció a causa dels canvis neuroadaptatius que es produeixen al cervell. AMG= Amígdala; BNST= Nuclis basals de l'estria terminal; DS= Nuclis estriat dorsal; GP= Globus pàl·lid; Hippo= Hipocamp; Insula= Escorça insular; NAC= Nuclis Accumbens; OFC= Escorça orbitofrontal; Thal= Tàlem. Adaptat de Volkow i Koob, 2015.

4.1.1 Afartament i intoxicació

Hi ha nombroses evidències que totes les drogues d'abús convergeixen en el circuit cerebral del sistema límbic (Koob i Le Moal, 2001; Nestler, 2001; *Di Chiara et al.*, 2004; Volkow *et al.*, 2004), anomenat sistema de recompensa. Aquest circuit mesolímbic està format pels cossos de les neurones dopaminèrgiques situades a l'àrea ventral tegmental (VTA) del cervell mitjà que projecten els seus axons principalment cap al nucli accumbens (NAc), al nucli estriat ventral, l'amígdala, l'hipocamp (HPC), l'escorça prefrontal (PFC) i el tàlem (Caixa 2)(Gardner, 1997; Cooper, Robison i Mazei-Robison, 2017).

Caixa 2. Principals àrees cerebrals implicades en l'addició a les drogues.

Àrea tegmental ventral: Conjunt de neurones del mesencèfal (als ganglis basals), origen del sistema dopaminèrgic mesocorticolímbic. Participa en el plaer, recompensa, cognició i motivació.

Nucli estriat: Regió subcortical del prosencèfal. Es divideix en dues àrees anatòmiques:

- El nucli estriat dorsal: format pel nucli caudat i el putamen (situat als ganglis basals). Tots dos participen en processos d'aprenentatge. A més, el nucli caudat participa en la memòria i el putamen regula el moviment.
- El nucli estriat ventral està format pel tubercle olfatori i el nucli accumbens (situat als ganglis basals). Aquest últim està associat al sistema límbic i té un paper molt important en la presa de decisions i el sistema de recompensa.

Hipocamp: Estructura situada al lòbul temporal medial. Forma part del sistema límbic, té un paper molt important en el processament de la memòria declarativa, que inclou la formació de records (memòria episòdica), així com en l'orientació i la memòria espacial, però no la memòria procedimental.

Amígdala: Situada al lòbul temporal medial, és l'altra gran estructura del sistema límbic. Joga un paper molt important en el processament i la memòria de reaccions emocionals. També modula la memòria a llarg termini associant-la a emocions, i és dependent de la intensitat d'aquestes.

Escorça prefrontal: És la part anterior dels lòbuls frontals del cervell. Està implicada en el plantejament de comportaments cognitius complexos, l'expressió de la personalitat, la presa de decisions i la moderació del comportament social correcte. L'escorça orbitofrontal (OFC) n'és una subregió, està situada darrere les òrbites oculars, està implicada en el processament cognitiu de la presa de decisions, i també juga un paper molt important en la recompensa i les emocions.

Nuclis del rafe: Grups de neurones serotoninèrgiques que estan situades formant una columna al tronc encefàlic. Estan implicats en la detecció i resposta a estímuls externs, la son i la vigília. Són l'origen de totes les vies serotoninèrgiques que innerven regions corticals, subcorticals, cerebel i medul·la espinal. El nucli dorsal del rafe és el nucli més gran i els seus axons projecten a l'amígdala, el nucli caudat, el putamen i el bulb olfatori.

Tàlem: Estructura més gran del diencèfal, situada sobre l'hipotàlem. Totes les senyals sensorials (excepte l'olfacte) arriben al tàlem, que s'encarrega de dirigir-les a la regió cortical adient.

Totes les drogues d'abús conegudes activen els sistema de recompensa del cervell tot produint un increment molt ràpid i pronunciat de dopamina (DA) a l'espai sinàptic (Figura 4; Koob, 1992; Di Chiara, 2002; Wise, 2008). Aquesta interactua amb els receptors postsinàptics de dopamina D₁ (Caine *et al.*, 2007) produint sensació de plaer i activant vies de plasticitat neuronal com PKA (proteïna cinasa dependent de cAMP), CREB (element d'unió en resposta de cAMP), i induint l'expressió de gens immediats primerencs (*immediate early genes*: IEGs) com *cFos* (Kalivas i Volkow, 2005; Koob i Volkow,

2016). Això fa que s'estableixi una connexió entre l'estímul (la droga) i la resposta (el plaer) anomenada aprenentatge associatiu o condicionament. A mesura que s'estableix aquest condicionament les neurones dopaminèrgiques deixen de respondre a l'estímul en si mateix, la droga, i ho fan de forma anticipada en resposta a un estímul neutre condicionat que inicialment no produïa cap resposta (Schultz, 2002). Aquest tipus de condicionament es dóna al NAc i a l'amígdala i és el que s'anomena aprenentatge incentiu-condicionat. A més a més, en aquest procés hi participen l'aprenentatge d'hàbits (nucli caudat i putamen) i la memòria declarativa o explícita (hipocamp) de forma que qualsevol estímul associat a la droga (per exemple, l'ambient en què es consumeix la droga, les persones amb qui s'acostuma a consumir, l'estat d'ànim, etc) produeix per si sol la motivació per la cerca de la droga i desig de consum (Volkow *et al.*, 2002). Aquest condicionament està produït per una sèrie d'adaptacions cel·lulars i moleculars que persisteixen després de llargs períodes d'abstinència i segueixen provocant desig de consum en resposta a determinats estímuls (Volkow, Koob i McLellan, 2016).

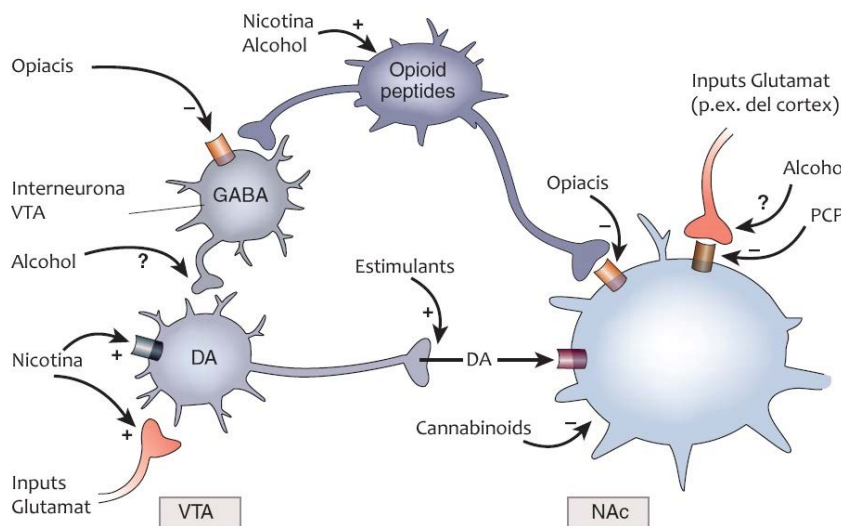


Figura 4. Esquema simplificat de les accions agudes de les drogues d'abús sobre la via dopaminèrgica VTA-NAc. Les drogues psicoestimulants activen directament la transmissió dopaminèrgica al nucli accumbens (NAc). Els opiacis ho fan de manera indirecta inhibint tant les interneurons GABAèrgiques a l'àrea ventral tegmental (VTA) com els receptors opioïdes al NAc. Les accions de les altres

drogues són menys conegudes. La nicotina actua estimulant els receptors nicotínics de les neurones dopaminèrgiques de la VTA i els receptors de les terminals glutamatèrgiques que les innerven. L'alcohol inhibiria les terminals GABAèrgiques al VTA, de forma que les neurones del NAc es desinhibirien. El cànnabis activaria els receptors cannabinoids CB1 a les terminals GABAèrgiques i glutamatèrgiques del NAc, i sobre les mateixes neurones del NAc. PCP= penicilidina. Adaptada de Nestler, 2005.

4.1.2 Abstinència i sentiments negatius

La droga produeix un reforç molt més potent que qualsevol altre reforç natural (menjar, beure, sexe...) de forma que, un cop establerta l'addició, aquests no poden competir com una elecció alternativa viable (Di Chiara, 2002). En aquest procés té gran rellevància l'escorça òrbitofrontal (OFC), l'àrea de cervell implicada en canviar els valors relatius dels reforçants (Rolls, 2000; Schultz, Tremblay i Hollerman, 2000). D'altra banda, els nivells de dopamina al sistema de recompensa dels individus

addictes són molt més baixos, per la qual cosa perceben menys plaer tant per l'estimulació de la droga com per la resta de recompenses naturals (Hyatt *et al.*, 2012; Konova *et al.*, 2012; Hägele *et al.*, 2015). Això produeix, per una banda, que no tornin a sentir l'eufòria que els produïa inicialment la droga i, per l'altra, que se sentin menys motivats per estímuls quotidians (p.e. relacions o activitats) que abans sí que eren motivadors.

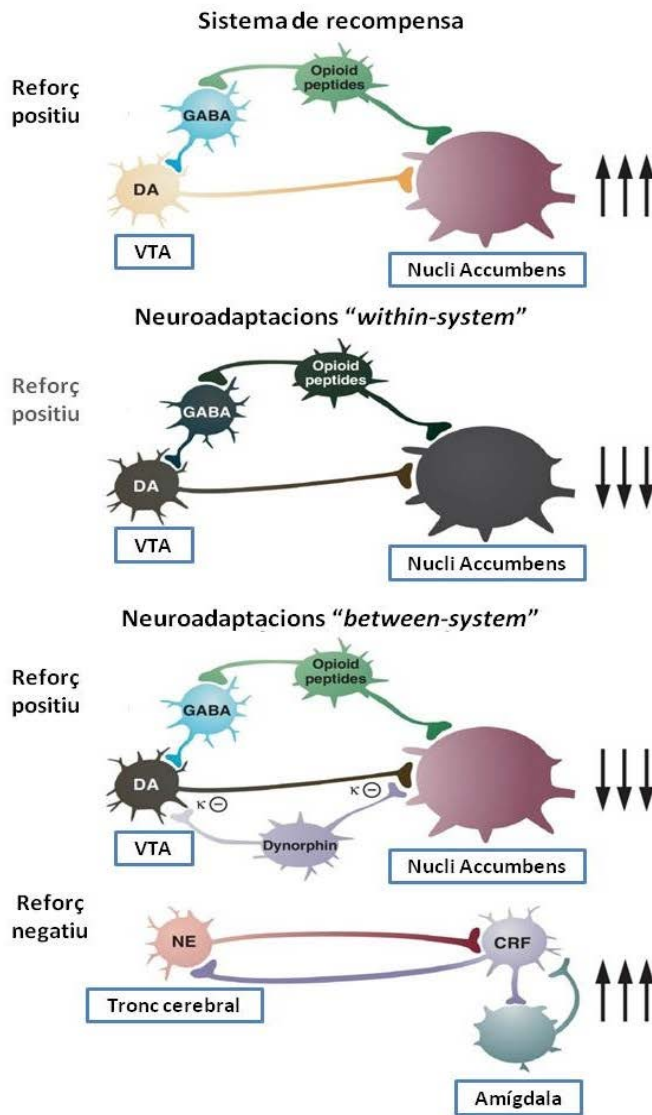


Figura 5. Diagrama dels canvis neuronals segons la teoria "within-system" i "between-system" que donen lloc al reforç negatiu. (A dalt) Esquema del sistema de recompensa activat per les drogues en què es representen les projeccions dopaminèrgiques (DA) mesolímbiques i els pèptids opioides que actuen sobre el nucli accumbens. Durant la fase d'afartament i intoxicació del cicle addictiu aquest sistema està molt actiu. (Centre) L'excés d'activació desencadena les adaptacions neurobiològiques "within-system" durant l'etapa d'abstinència i sentiments negatius, incloent l'activació de *cAMP* i *CREB*, la disminució dels receptors de dopamina D2 i de l'activitat de les neurones DA de l'àrea ventral tegmental (VTA). (A sota) A mesura que es va repetint aquest cicle de consum i abstinència es va establint la dependència i això provoca que dos grans sistemes neuroadaptatius "between-system" s'activin. D'una banda, l'activació del feedback de dinorfina que produeix una disminució de l'activitat dopaminèrgica. D'altra, el reclutament extrahipotàlmic de noradrenalina (NE) i corticotropina (CRF) a l'amígdala, que dona lloc a l'estrès cerebral que condueix a l'etapa d'obsessió i anticipació. Adaptat de Koob, 2013.

A més dels canvis en el sistema de recompensa, l'exposició continuada a la droga provoca canvis adaptatius a l'amígdala que fan que la persona sigui més sensible a l'estrès i propensa a tenir emocions negatives. És el que s'anomena reforç negatiu (Koob i Le Moal, 2008). Aquest sistema "d'anti-recompensa" està produït per l'alliberació de neuropèptids implicats en la resposta a l'estrès i el manteniment de l'homeòstasi cerebral, com la corticotropina (*Corticotropin-releasing factor*, CRF), la dinorfina (*Dynorphin*, Dyn) o la noradrenalina (*Norepinephrine*, NE) (Koob i Volkow, 2016). Finalment, l'exposició crònica a la droga produeix neuroadaptacions que donen lloc a una desregulació del sistema

endocannabinoide, molt important en la resposta a l'estrès cerebral, contribuint a l'increment de l'estrès reactiu present en l'addició (Koob i Volkow, 2016). Recentment, s'han vist que el tàlem, en concret el nucli paraventricular (PVT), es connecta mitjançant sinapsis glutamatèrgiques amb el NAc i la seva estimulació produeix aversió, enlloc de produir plaer, per la qual cosa està directament relacionada amb la síndrome d'abstinència (Zhu *et al.*, 2016).

Com a resultat de tots aquests canvis produïts per l'addicció, els individus deixen de prendre la droga per sentir plaer o eufòria (reforç positiu causat pel sistema de recompensa) i passen a fer-ho per evitar els efectes negatius que els produeix la falta de consum (reforç negatiu, Figura 5). Durant l'abstinència, el consum de la droga permet alleugerir momentàniament la simptomatologia negativa però reforça els canvis neuroadaptatius donant lloc al cercle viciós de l'addicció.

4.1.3 Obsessió i anticipació (o deler)

Aquesta etapa es considera un element clau per les recaigudes en humans, i la identificació de les bases neurobiològiques subjacents pot ser molt important per al desenvolupament de teràpies.

Les drogues d'abús també actuen al PFC, implicat en el control de processos cognitius complexos. La disminució de la senyalització dopaminèrgica produïda en l'addició produeix alteracions importants en el seu funcionament, entre les quals destaquem la capacitat d'auto-control i control social, la presa de decisions, la predicció de conseqüències futures d'una activitat i la creació d'expectatives (Goldstein i Volkow, 2011). Les neurones glutamatèrgiques del PFC connecten directament amb les neurones dopaminèrgiques mesocorticolímbiques. En individus addictes, tant la senyalització dopaminèrgica com la glutamatèrgica del PFC estan alterades, amb la qual cosa la seva capacitat de prendre decisions i resistir-se a les recaigudes està molt debilitada. Aquests canvis neuroadaptatius en persones addictes permetrien explicar la falta de control sobre el consum de drogues i la incapacitat d'interrompre'n el consum.

Taula 3. Sistemes de neurotransmissió implicats en les etapes del neurocircuit de l'addició. Adaptat de Koob i Volkow, 2016.

	Resposta
Afartament i intoxicació	
Dopamina	Augment
Pèptids opioides	Augment
Serotonina	Augment
Àcid γ-aminobutíric	Augment
Acetilcolina	Augment
Abstinència i sentiments negatius	
Corticotropina	Augment
Dinorfina	Augment
Noradrenalina	Augment
Substància P	Augment
Dopamina	Disminució
Serotonina	Disminució
Receptors de pèptids opioides	Disminució
Neuropèptid Y	Disminució
Nociceptina	Disminució
Endocannabinoïdes	Disminució
Oxitocina	Disminució
Obsessió i anticipació	
Dopamina	Augment
Glutamat	Augment
Hipocretina	Augment
Serotonina	Augment
Corticotropina	Augment

És important tenir present que, a més de la dopamina, molts altres neurotransmissors i neuromoduladors estan implicats en el procés addictiu, com ara els pèptids opioïdes, el glutamat, l'àcid γ-aminobutíric (GABA), la serotonina (5-HT), l'acetilcolina (ACh) i el sistema endocannabinoide (Taula 3) al VTA o NAc. El funcionament correcte i balancejat d'aquests sistemes permet el funcionament normal del control inhibitori i de la presa de decisions, així com un funcionament adequat del sistema de recompensa, motivació, estrès i els circuits de memòria. Tanmateix, aquests circuits interaccionen amb d'altres per regular l'estat d'ànim, la resposta a l'estrès (amígdala, hipotàlem i habènula) i la interocepció (ínsula i escorça cingulada anterior). Les drogues d'abús actuen sobre tots aquests sistemes tot produint neuroadaptacions que donen lloc a la dependència.

5. La cocaïna

La cocaïna o benzoilmetilecgonina és un alcaloide que s'extreu de les fulles de dos arbustos cultivats a la regions tropicals dels Andes, *Erythroxylum coca lam* i *Erythroxylum novogranatense*. Els natius d'aquesta regió mastegaven les fulles de coca per obtenir-ne els efectes estimulants que els permetia tenir una major aportació d'oxigen, i així aconseguien un augment de la seva resistència física en regions on la concentració d'oxigen a l'aire és menor. La fulla de coca es va començar a importar a Europa a partir de 1580, però el seu principi actiu no fou aïllat fins el 1860 per Friedrich Wöhler i Albert Niemann. Les seves propietats anestèsiques i vasoconstrictores van fer que a partir dels anys 1870s es comencés a utilitzar en diversos medicaments i procediments mèdics (Fernández-Espejo, 2006). A més, durant disset anys va ser un component més de la coneguda beguda refrescant Coca-Cola, fins que els efectes negatius d'aquesta substància es van començar a conèixer i es van eliminar de la seva fórmula. El 1922 la cocaïna va ser declarada il·legal als Estats Units, on durant a principis dels anys 1900s va causar unes 5.000 morts anuals segons el Govern dels Estats Units. En l'actualitat la cocaïna és una de les drogues recreatives il·legal més utilitzades a tot el món.

5.1 Clínica del consum de cocaïna

La cocaïna es pot consumir en forma de clorhidrat inhalada per via intranasal o injectada via intravenosa, o fumada en forma de cocaïna base, més coneguda com a crack. Els efectes de l'administració intranasal de cocaïna comencen a aparèixer als 3-5 minuts, assolint el seu màxim als 10-20 minuts. D'altra banda, fumada o injectada, els efectes es produeixen als 8-10 segons i desapareixen en pocs minuts (Fernández-Espejo, 2006). Els principals efectes consisteixen en eufòria intensa, plaer i estat d'èxtasi, seguits de diversos minuts d'excitació i inquietud. A més a més, produeix desinhibició social que facilita la comunicació interpersonal (Morton, 1999) i produeix sacietat sense

intensificar els plaers associats al menjar (Gawin i Kleber, 1985; Johanson i Fischman, 1989). Aproximadament entre 5 i 20 minuts després d'aquesta excitació la persona comença a sentir-se irritable i incòmode, i per tal d'evitar aquesta simptomatologia freqüentment torna a consumir.

Un altre fenomen típic de tot els psicoestimulants és la sensibilització, causada en gran mesura per la hiperfunció dopaminèrgica corticolímbica que produeixen. Els primers canvis que apareixen són de tipus ansiós o depressiu, amb confusió, agressivitat i pèrdua d'interès per la majoria d'activitats. En ocasions poden aparèixer psicosis tòxiques amb al·lucinacions visuals, tàctils i il·lusions paranoides. Amb l'exposició repetida a la droga apareix un augment progressiu de l'activitat motora, anomenat sensibilització comportamental, i s'associa a canvis plàstics en circuits nerviosos en què el sistema serotoninèrgic sembla tenir una gran importància (revisat a Filip *et al.*, 2010). D'altra banda, la majoria de consumidors de psicoestimulants presenten tolerància, i necessiten cada cop dosis més elevades per obtenir els mateixos efectes subjectius com l'eufòria o l'anorèxia.

No tots els individus que proven la cocaïna arriben a tenir-ne un consum regular. En algunes persones l'efecte principal de la cocaïna els produeix un estat d'ansietat insuportable en comptes d'eufòria, fet que produeix la interrupció immediata del consum. En d'altres, limitacions com l'accés restringit a la droga, l'elevat preu o la por a la pèrdua de control sobre el consum eviten que es desenvolupi una dependència (Gawin, 1991). Finalment, però, un subconjunt dels consumidors aniran incrementant en dosi i freqüència fins a desenvolupar l'addicció.

Hi ha una elevada comorbiditat entre la dependència de cocaïna i altres trastorns psiquiàtrics, com per exemple trastorns de l'estat d'ànim i de la son, ansietat, trastorn per dèficit d'atenció i hiperactivitat, trastorns de la personalitat i psicosi induïda per la droga (Volkow, 2008). A més, el consum de cocaïna també altera l'estat de salut general arribant a produir hipertensió, accidents cardiovasculars, disfunció sexual, convulsions...

La síndrome d'abstinència associada a la cocaïna es caracteritza per tres fases (Gawin, 1991):

- Fase 1 - davallada: Immediatament després de l'eufòria inicial produïda per la cocaïna es produeix una davallada de l'estat d'ànim i l'energia. Aquesta simptomatologia es va intensificant donant lloc a depressió, agitació, ansietat i deler. Aquesta fase dura entre una i quatre hores, i progressivament el deler de cocaïna decreix i augmenta l'esgotament i la son.
- Fase 2 - abstinència: En els individus que tenen un ús continuat de la cocaïna aquesta fase apareix després de la davallada i pot durar fins a 4 dies. Es caracteritza per una disfòria perllongada marcada per manca de motivació, ansietat, avorriment... Un dels símptomes més interessants d'aquesta etapa és l'anhedònia, és a dir, la incapacitat per experimentar plaer, la

qual es pot perllongar entre 2 i 12 setmanes si l'abstinència continua. Aquesta simptomatologia contrasta fortament amb els records de l'eufòria induïda per la cocaïna desencadenant el deler sever de cocaïna, responsable de les recaigudes.

- Fase 3 - supressió: Després de que l'anhedònia de l'abstinència finalitzi, encara pot aparèixer deler condicionat de cocaïna de manera intermitent, durant mesos o fins i tot anys després de l'últim consum de la droga, que gradualment anirà desapareixent.

5.2 Diances farmacològiques de la cocaïna

Els transportadors monoaminèrgics de dopamina (DAT), serotonina (SERT) i noradrenalina (NET) són els responsables de transportar aquests neurotransmissors des de l'espai sinàptic a la terminal presinàptica inhibint així la seva activitat sinàptica (Filip *et al.*, 2005). S'ha demostrat que la cocaïna té elevada afinitat pels transportadors DAT ($K_i = 230\text{nM}$), SERT ($K_i = 740\text{nM}$) i NET ($K_i = 480\text{nM}$), per la qual cosa es considera que tots tres sistemes de neurotransmissió podrien tenir un paper important en els efectes bioquímics i comportamentals de la cocaïna (Han i Gu, 2006). Aquest bloqueig provoca l'augment de la vida mitjana d'aquests neurotransmissors a l'espai sinàptic, permetent que difonguin de forma més efectiva i per tant potenciant el seu efecte.

Experiments *in vivo* en models animals han demostrat que l'administració de cocaïna augmenta els nivells de DA i 5-HT al NAc (Broderick *et al.*, 2004). Es van observar resultats similars al NAc (Dworkin, Co i Smith, 1995; Parsons, Koob i Weiss, 1995) i al globus pàl·lid (Sizemore, Co i Smith, 2000) en models animals d'autoadministració intravenosa de cocaïna, que permeten simular l'abús de cocaïna en humans. Quant als efectes reforçants de la cocaïna, els resultats són més complexos, donat que l'eliminació d'un sol d'aquests transportadors no dóna lloc a la supressió de l'autoadministració (Rocha *et al.*, 1998; Sora *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000; Caine *et al.*, 2007). Tot i que estudis més recents semblarien demostrar que la falta de DAT sí que altera l'adquisició del comportament d'autoadministració de cocaïna (Thomsen *et al.*, 2009). En qualsevol cas, es creu que DAT estaria més associat a les propietats reforçants de la cocaïna, mentre que NET contribuiria més als efectes aversius d'aquesta, i en canvi SERT podria contribuir a ambdues propietats a través de l'estimulació de diferents subtipus de receptors (Figura 6) (Sizemore, Co i Smith, 2000).

Tot i que tradicionalment s'ha assignat a les vies dopaminèrgiques el rol de principals mediadors dels efectes reforçants i també les propietats addictives de la cocaïna, avui dia sabem que d'altres sistemes, com el serotoninèrgic, tenen un paper molt important en la modulació de l'acció de la cocaïna. Així, diferents subtipus de receptors de 5-HT contribueixen a la sensibilització de la cocaïna,

l'autoadministració, les recaigudes en la cerca de la droga i els símptomes d'abstinència en models animals (Filip *et al.*, 2010; Howell i Cunningham, 2015).

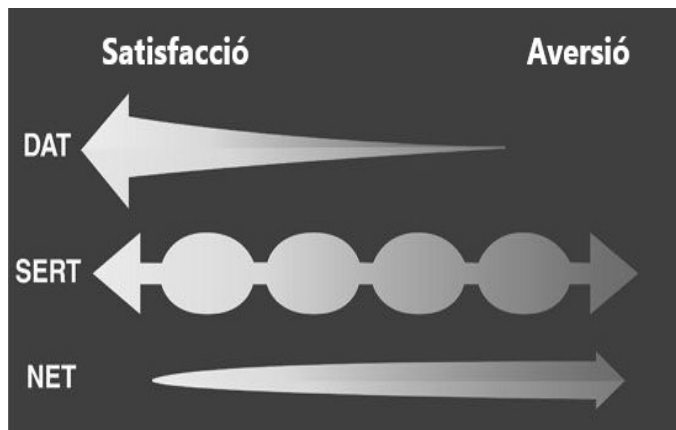


Figura 6. Model de la contribució relativa als efectes reforçants o aversius que produeix el bloqueig dels transportadors de dopamina (DAT), serotonina (SERT) i noradrenalina (NET) per part de la cocaïna en animals de soca salvatge. DAT: el bloqueig produeix satisfacció. SERT: el bloqueig produeix tant satisfacció com aversió, suggerint que els diferents subtipus de receptors presenten diferents propietats. NET: el bloqueig produeix aversió. Adaptat de Sizemore, Co i Smith, 2000.

5.3 Tractament de l'addició a cocaïna

No hi ha actualment cap farmacoteràpia aprovada per al tractament de l'abús de psicoestimulants. S'ha vist que la teràpia comportamental pot ser d'ajuda en molts individus (Simpson *et al.*, 1999; Vocci i Montoya, 2009), però en el cas de la dependència de cocaïna, la taxa de fracàs d'aquests programes d'ajuda ronda el 50% (Alterman *et al.*, 1996), segurament a causa de la simptomatologia de l'abstinència crònica. Tradicionalment s'ha considerat que hi ha dos punts d'actuació claus en el procés addictiu dels psicoestimulants: el bloqueig del mecanisme de recompensa (p.e. bloquejant DAT) i el tractament de la depressió i l'ansietat present durant l'abstinència. No obstant això, si es considera tot el cicle de l'addició hi ha més etapes en què es podria incidir (Figura 7).

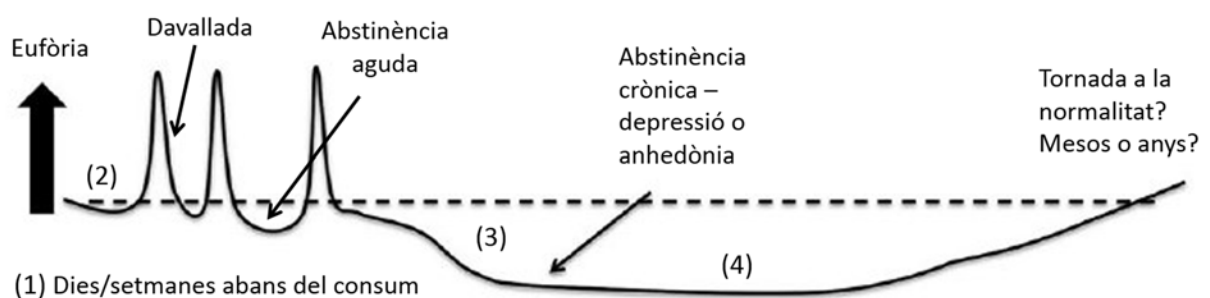


Figura 7. Oportunitats de tractament durant el consum de psicoestimulants i l'abstinència. Inicialment hi ha una fase de consum actiu en què la droga produeix un efecte euforitzant ràpid, seguit d'una fase de davallada en què s'experimenta una baixada de l'estat d'ànim temporal i la síndrome d'abstinència aguda. Per superar aquesta fase l'individu pren una nova dosi. Després d'aquesta fase de consum i intoxicació, l'individu deixa de consumir drogues setmanes o mesos, la qual cosa li produeix síndrome d'abstinència crònica amb símptomes d'ansietat i depressió. El tractament farmacològic es podria aplicar en qualsevol estadi: (1) mesures profilàctiques com vacunes de cocaïna o teràpia amb agonistes; (2) antagonistes de DAT per reduir el efectes del estimulants; (3) tractament amb antidepressius o ansiolítics per reduir els símptomes de l'abstinència; i (4) fàrmacs que bloquegin o disminueixin els records associats a la droga. Adaptat de Davidson, 2016.

Actualment s'ha provat una sèrie de fàrmacs per tractar la dependència de cocaïna però cap d'ells ha tingut els resultats esperats (Davidson, 2016):

- **Teràpia amb agonistes:** utilització d'un fàrmac que tingui efectes més llargs (de forma que sigui menys addictiu) i més segur que la droga d'abús, per atenuar l'eufòria i reduir el consum de la droga. En el cas de la cocaïna s'utilitzen molècules que s'uneixen a DAT o als receptors de dopamina D1-5. Alguns dels fàrmacs assajats pel tractament de la dependència de cocaïna són: les amfetamines, el metilfenidat, el bupropió (inhibidor feble de DAT) i el modafinil (estimulant que activa també la transmissió glutamatèrgica).
- **Tractament amb antagonistes:** l'objectiu és bloquejar els receptors de dopamina per atenuar la recompensa produïda per la cocaïna. S'ha observat que antagonistes del receptor D3 funcionen satisfactòriament en ratolins (Heidbreder, 2008; Ashby *et al.*, 2015) però encara no s'ha provat en humans.

A causa de la baixa eficàcia d'aquests tractaments, s'obren noves línies de recerca centrades en altres neurotransmissors que modulen directament o indirecta l'efecte de la cocaïna:

- Corticotropina i/o noradrenalina: La seva expressió augmenta durant l'abstinència i estan associades a deler, depressió i ansietat. Actualment s'han provat dos antagonistes dels seus receptors: CP-154,526 que actua sobre CRF-1 tot disminuint les recaigudes i la cerca de cocaïna en ratolins (Gurkovskaya i Goeders, 2001; Przegaliński *et al.*, 2005; Boyson *et al.*, 2011; Cason, Kohtz i Aston-Jones, 2016) i Propanolol, un beta-bloquejant que s'utilitza com a ansiolític per tractar l'abstinència, disminuint la probabilitat de recaiguda (Kampman *et al.*, 1999, 2001, 2006).
- Serotonina: En models de ratolins genoanul·lats s'ha observat que la inhibició de DAT i SERT conjuntament altera el comportament de cerca de cocaïna (Sora *et al.*, 2001), per tant es podria aplicar una teràpia combinada per inhibir els dos sistemes i millorar la resposta. A més, es coneixen 14 subtipus de receptors de 5-HT (Filip *et al.*, 2010), fet que permetria actuar efectivament sobre la diana minimitzant els efectes secundaris. No obstant això, els resultats obtingut amb Ondansetron, un antagonista dels receptors 5-HT₂ i 5-HT₃, mostra baixa eficiència (Johnson *et al.*, 2006).
- Altres sistemes de neurotransmissió implicats en el desenvolupament de la dependència inclouen l'orexina (Aston-Jones *et al.*, 2010), els sistemes glutamatèrgic (Bisaga *et al.*, 2010), GABAèrgic (Minozzi *et al.*, 2015), colinèrgic (Plebani *et al.*, 2012; Mello *et al.*, 2014) i endocannabinoide. D'aquests, els millors resultats s'han obtingut amb el Rimonabat, un antagonista del receptor d'endocannabinoides CB1 (Hu, Liu i Yu, 2015; Marinho *et al.*, 2015,

2017; Delis *et al.*, 2017), i l'Acetilcisteïna que estimula el transportador de cisteïna-glutamat (Dean, Giorlando i Berk, 2011; Duailibi *et al.*, 2017; Nocito Echevarria *et al.*, 2017).

Una alternativa que també s'ha explorat és la utilització d'enzims que metabolitzen la cocaïna per disminuir la seva vida mitjana (Schindler i Goldberg, 2012), per exemple la Butirilcolinesterasa, que s'ha provat amb bons resultats en ratolins (Gorelick, 1997; Chen *et al.*, 2016; Smethells *et al.*, 2016) i en humans (Cohen-Barak *et al.*, 2015; Shram *et al.*, 2015). O l'enzim bacterià CocE, que redueix l'autoadministració de cocaïna en rates (Cooper *et al.*, 2006; Collins *et al.*, 2009; Narasimhan, Woods i Sunahara, 2012) i primats (Howell *et al.*, 2014). Una altra estratègia consistiria a actuar sobre la "memòria de la droga", és a dir sobre la consolidació dels records associats al consum per reduir la cerca de la droga i evitar les recaigudes. Aquest tipus de tractaments han tingut bons resultats en rates utilitzant tant antagonistes del receptor NMDA (Lee *et al.*, 2005; Lee, Milton i Everitt, 2006), com un antagonista del receptor 5-HT₃, Ondansetron (Lee *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2004). Per últim, s'han desenvolupat vacunes contra la cocaïna (Kosten *et al.*, 2014; Orson *et al.*, 2014; Ramakrishnan *et al.*, 2014; Kimishima *et al.*, 2016) amb l'objectiu de generar anticossos que l'ataquin per tal de limitar la quantitat de droga que arriba al cervell per produir els efectes de recompensa. Tot i que els primer resultats semblaven prometedors, s'ha observat que en la majoria de pacients la quantitat d'anticossos produïts és insuficient, fet que suggereix que cal millorar els adjuvants amb què s'administren (Alving *et al.*, 2014; Bremer i Janda, 2017).

6. Genètica i cocaïna

El consum de cocaïna provoca canvis en l'estructura sinàptica i en l'expressió gènica i, a mesura que el consum es cronifica, aquests canvis s'estabilitzen donant pas a la dependència. La interacció entre l'ambient i el factors genètics i epigenètics de predisposició són fonamentals tant en l'inici del consum de la droga com en la transició de l'ús a la dependència.

6.1 Models animals genoanul·lats i transgènics en cocaïna

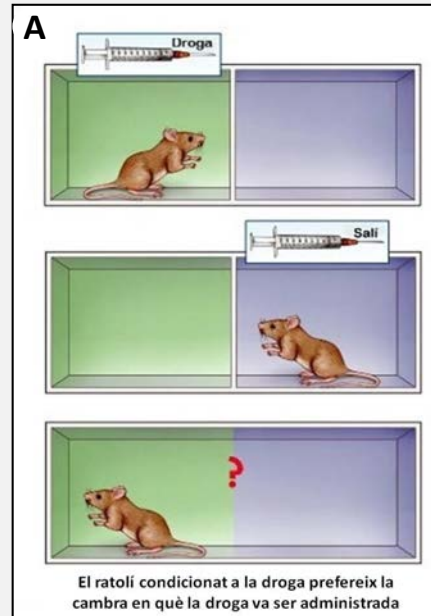
Els models animals genoanul·lats i transgènics ens han permès entendre els mecanismes a través dels quals la cocaïna produeix els seus efectes reforçants i de recompensa, així com per estudiar el paper que juguen gens específics en l'addició (Uhl, 2000; Uhl, Hall i Sora, 2002). La majoria d'aquests estudis se centren en l'efecte de recompensa i el condicionament de les drogues utilitzant tant la preferència de lloc condicionada (CPP) com l'autoadministració de la droga (Caixa 3).

Caixa 3. Model animals utilitzats en els estudis de drogues.

Els tests utilitzats en models animals per determinar les propietats addictives de les drogues es basen en el condicionament, tant clàssic o Pavlovià, com operant (Sanchis-Segura i Spanagel, 2006). Aquests models permeten valorar tant l'efecte reforçant de la droga, com altres aspectes relacionats amb l'addicció, entre els quals hi ha la sensibilització, la tolerància, la impulsivitat, la compulsivitat i la recaiguda després d'un període d'abstinència.

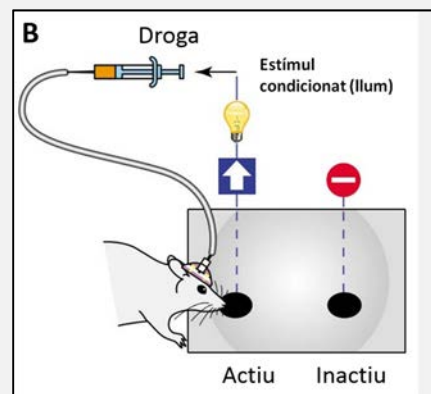
Model de preferència de lloc condicionada (CPP):

Aquest paradigma s'utilitza per avaluar les propietats de recompensa de les drogues d'abús mitjançant el condicionament clàssic (o Pavlovià), pel qual els animals associen un context específic amb els efectes hedònics de la droga administrada. El test consisteix en una capsa amb dos compartiments clarament diferenciats (color, textura o patró). Inicialment hi ha un període d'habituciació en el qual l'animal té lliure accés als dos compartiments (Figura A, adaptada de Camí i Farré, 2003). Durant les sessions de condicionament els animals es confinen a un compartiment o altre en dies alternats després de l'administració de la droga o del vehicle (salí), de forma que l'administració de la droga s'associa a un dels compartiments mentre que la del vehicle s'associa a l'altre. Durant el test de CPP no s'administra la droga a l'animal i se li deixa escollir entre els dos contextos, de forma que durant el test es mesura el temps que l'animal està en el context associat a la droga i l'associat al vehicle. Un augment de la preferència pel context de la droga serveix com a mesura dels seus efectes reforçants Pavlovians.



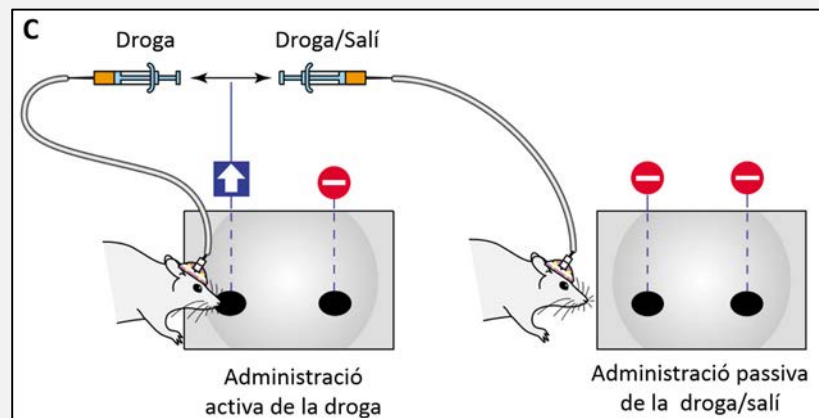
Model d'autoadministració:

En aquest test l'animal ha de prémer la palanca activa (o introduir el musell) per rebre la droga (via intravenosa, intracranial o oral), la qual va acompanyada d'un estímul condicionat (lumínic o sonor) que l'animal associarà als efectes de la droga. En la majoria de procediments s'estableix un programa de raó fixa (FR) per a obtenir la droga, seguit d'un test de raó progressiva (PR), en què l'animal ha de realitzar un nombre de respostes progressivament creixent per tal d'obtenir la droga, el qual permet valorar la motivació de l'animal per la droga. La premissa d'aquest procediment és que les drogues psicoactives controlen el comportament funcionant com a reforçants positius operants. És una aproximació més motivacional comparada amb els models no operants (com la CPP), ja que l'animal ha de fer un esforç per a obtenir la droga. Hi ha una gran concordança entre els efectes de les drogues autoadministrades per animals de laboratori i les consumides per humans, amb alguna excepció, com el LDS (Figura B, adaptada de Jacobs *et al.*, 2003).



Model d'autoadministració operant acoblat a control:

Aquest model permet diferenciar els efectes farmacològics directes de les drogues d'abús d'aquells que resulten de processos cognitius associats a l'autoadministració en una tasca de condicionament operant. El mecanisme bàsic és el mateix que en el cas



anterior: un animal s'autoadministra la droga a través d'una resposta activa a la situació operant (animal "master" o contingent). Això provoca que un altre subjecte, un animal acoblat, rebí la mateixa dosi de droga de forma passiva. A més, es pot connectar un tercer subjecte que rep una infusió salina cada cop que l'animal master s'autoadministra la droga (Figura C, adaptada de Jacobs *et al.*, 2003). Els animals acoblats (no-contingents) no tenen control sobre el consum de la droga, i per tant en aquestes condicions no es produeix cap aprenentatge. Comparant els resultats entre els dos animals que han rebut droga podrem diferenciar els efectes farmacològics de la droga de l'aprenentatge de l'animal contingent.

6.1.1 Models genoanul·lats pels transportadors de monoamines

Els transportadors de monoamines (DAT, SERT i NET) tenen un gran interès en l'estudi de les bases neurobiològiques de l'addicció a cocaïna degut a que aquesta té una gran afinitat per tots tres. Per determinar la contribució d'aquests sistemes de neurotransmissió als efectes de recompensa de la cocaïna es van generar ratolins modificats genèticament, als quals els mancava el gen d'un d'aquests transportadors, animals genoanul·lats (*gene Knock-Out, KO*), en homozigosi o en heterozigosi (falta de dues i una còpia del gen, respectivament) (Taula 4).

Taula 4. Activitat locomotora basal i respostes comportamentals a la cocaïna en ratolins genoanul·lats dels transportadors monoaminèrgics. Adaptat de Filip *et al.*, 2005 i Sora *et al.*, 2010.

Genotip <i>Knock-Out</i>	Activitat locomotora basal	Efectes de la cocaïna			
		Hiperactivació locomotora	Sensibilització locomotora	CPP	Auto administració
Dat					
salvatge	- [1, 2]	+ [1, 3]	+ [3]	+ [2]	+ [4]
heterozigot	- [2]	- [3]	- [3]	+ [2]	
homozigot	↑ [1, 2]	- [1, 3,6,7]	- [3]	+ [2] ↓ [6,7]	+ [4] ↓ [8]
Net					
salvatge	- [3, 5]	+ [3, 5]	+ [3, 5]	+ [5]	
heterozigot					
homozigot	↓ [3, 5]	↑ [5] ↓ [3]	↑ [3] - [5]	↑ [5]	
Sert					
salvatge		+ [10]		+ [2]	
heterozigot				↑ [2]	
homozigot		↑ [10]		↑	

CPP: preferència de lloc condicionada; Salvatge (+/+); heterozigot (+/-); homozigot (-/-); + efecte existent; - manca d'efecte; ↑ augment d'efecte comparat amb la soca salvatge; ↓ disminució de l'efecte en comparació amb la soca salvatge. 1.Giros *et al.*, 1996; 2.Sora *et al.*, 1998; 3.Mead *et al.*, 2002; 4.Rocha *et al.*, 1998; 5.Xu *et al.*, 2000; 6.Morice *et al.*, 2004; 7.Medvedev *et al.*, 2005; 8.Thomsen *et al.*, 2009; 9.Sora *et al.*, 2001; 10.Homberg *et al.*, 2008.

Els primers estudis realitzats amb aquests ratolins, tant en els homozigots (*Dat -/-*) com en els heterozigots (*Dat +/-*), demostraven que els efectes de recompensa de la cocaïna no resultaven afectats, testats tant per la CPP (Sora *et al.*, 1998) com per l'autoadministració de cocaïna (Rocha *et al.*, 1998). En canvi, sí que es va observar que no manifestaven els efectes de sensibilització i hiperactivació locomotora de la cocaïna presents a la soca salvatge (Taula 4) (Giros *et al.*, 1996; Mead *et al.*, 2002). Aquests resultats no refutaven la importància de la DA com a principal substrat per

l'efecte de recompensa de la cocaïna, però suggerien que podria haver-hi una segona diana a través de la qual la cocaïna produïa recompensa. Sota aquesta hipòtesi, es van combinar models KO per a dos transportadors monoaminèrgics diferents i es va observar la supressió dels efectes de recompensa en la CPP en ratolins homozigots *Dat* *-/- Sert* *-/-* i en els heterozigots *Dat* *-/- Sert* *+/-* (Sora *et al.*, 2001), però no en els ratolins *Dat* *-/- Net* *-/-* o *Net* *-/- Sert* *-/-* (Taula 5) (Hall *et al.*, 2002; Uhl, Hall i Sora, 2002; Chen *et al.*, 2006). A més, sorprenentment, l'anul·lació de *Net*, *Sert* o d'ambdós no només no disminuïa els efectes de recompensa de la cocaïna sinó que els incrementava (Taula 4 i 5) (Sora *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000; Hall *et al.*, 2002; Mead *et al.*, 2002). En conjunt, aquests resultats suggereixen que *Sert* juga un paper important tant en la modulació dels efectes de recompensa com dels efectes adversos de la cocaïna, mentre que *Net* és responsable únicament dels efectes adversos de la droga (Serafine i Riley, 2009; Jones *et al.*, 2010).

Estudis més recents demostren que els ratolins *Dat* KO no són capaços d'autoadministrar-se cocaïna (Thomsen *et al.*, 2009), en contra d'allò que Rocha i col·laboradors havien demostrat. En aquest nou model de *Dat* KO observen que, tot i que inicialment els animals aprenen a autoadministrar-se cocaïna, els efectes de recompensa es veuen considerablement reduïts en comparació amb els animals de la soca salvatge, eliminant-se per complet en condicions més estrictes, com en el test de raó progressiva. Això reafirma la importància de DAT en les accions reforçants de la cocaïna.

6.1.2 Models transgènics pels transportadors de dopamina

L'eliminació completa de DAT produeix canvis adaptatius molt importants en l'homeòstasi de la DA, com ara alteracions en la síntesi i emmagatzematge de DA, canvis en els nivells extracel·lulars i alteracions en l'expressió i funció dels receptors (Giros *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1999). Aquests canvis podrien alterar les vies de recompensa, per la qual cosa s'han generat altres models transgènics per evitar l'activació d'aquests mecanismes compensatoris. Inicialment es va generar un model murí

Taula 5. Preferència de lloc condicionada induïda per la cocaïna en ratolins dobles genoanul·lats per transportadors de monoamines. Adaptada de Filip *et al.*, 2005.

Genotip <i>Knock-Out</i>		CPP
Dat	Net	
salvatge	salvatge	+ [1, 2]
homozigot	homozigot	+ [1, 2]
Net	Sert	
salvatge	salvatge	+ [3]
salvatge	homozigot	+ [3]
heterozigot	homozigot	+ [3]
homozigot	salvatge	+ [3]
homozigot	heterozigot	+ [3]
homozigot	homozigot	↑ [3]
Dat	Sert	
salvatge	salvatge	+ [4]
salvatge	heterozigot	+ [4]
salvatge	homozigot	↑ [4]
heterozigot	salvatge	+ [4]
heterozigot	heterozigot	+ [4]
heterozigot	homozigot	↑ [4]
homozigot	salvatge	+ [4]
homozigot	heterozigot	- [4]
homozigot	homozigot	- [4]

CPP: preferència de lloc condicionada; Salvatge (+/+); heterozigot (+/-); homozigot (-/-); + efecte existent; - manca d'efecte; ↑ augment efecte comparat amb la soca salvatge; 1. Hall *et al.*, 2006; 2. Uhl, Hall i Sora, 2002; 3. Hall *et al.*, 2002; 4. Sora *et al.*, 2001

transgènic de *Dat* que té un canvi puntual (*Knock-In*, KI) que provoca insensibilitat a la cocaïna, amb una recaptació de DA relativament normal (Chen *et al.*, 2006). En aquests ratolins la cocaïna no es pot unir a DAT, amb la qual cosa no aconsegueix incrementar els nivells de DA a l'espai sinàptic ni generar activitat elèctrica a les neurones. Aquest model animal no presenta ni increment de l'activitat locomotora, ni efectes de recompensa deguts a la cocaïna en el test CPP (Chen *et al.*, 2006; Tilley *et al.*, 2009) o en l'autoadministració de cocaïna (Thomsen *et al.*, 2009). Tampoc presenta comportament estereotípic induït per la cocaïna (Tilley i Gu, 2008). A més, s'ha vist que aquests ratolins *Dat*-KI no només no presenten preferència en el test CPP, sinó que mostren aversió per la cocaïna (O'Neill, Tilley i Gu, 2013). Aquests resultats reforcen la idea que el bloqueig de DAT per part de la cocaïna és necessari pels efectes de recompensa, però que altres sistemes de neurotransmissió són els que produeixen els efectes aversius de la droga, com ja s'ha mencionat prèviament. No obstant això, es va observar una disminució en la recaptació de DA per la proteïna DAT insensible a la cocaïna, fet que produïa increment de DA extracel·lular donant lloc a un fenotip d'hiperactivitat. Per aquesta raó els resultats obtinguts en resposta a cocaïna es podrien veure afectats.

Finalment, es va generar una nova línia genominvada (*gene Knock-Down*, KD) en què l'expressió de *Dat* es redueix en un 90% i s'evita l'activació de mecanismes compensatoris (Tilley *et al.*, 2007). A diferència dels ratolins *Dat* KO i KI, els *Dat* KD presenten efectes locomotors a baixes dosis de cocaïna, però igual que s'havia vist en els KO i KI no s'observen canvis en CPP, comparat amb la soca salvatge. Aquests resultats demostren que la manca de reforç de la cocaïna, mesurat a partir del CPP, en els animals *Dat*-KI no són deguts als mecanismes compensatoris sinó a la incapacitat de la cocaïna d'unir-se al *Dat*.

S'han generat ratolins amb mutacions similars al *Dat*-KI pels gens *Sert* (Henry *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 2011) i *Net* (Wei, Hill i Gu, 2009), però no s'hi han observat canvis en els efectes reforçants de la cocaïna.

6.1.3 Models genoanul·lats de receptor monoaminèrgics

S'han realitzat nombrosos estudis amb models animals per receptors dopaminèrgics, serotoninèrgics i noradrenèrgics (Taula 6), tot i que en molts casos els resultats obtinguts són contradictoris.

Dopamina:

Donat al paper rellevant que té la DA en la mediació dels efectes de la cocaïna, uns dels primers ratolins KO que es van generar van ser pels receptors dopaminèrgics. Els diversos receptors de DA tenen una distribució diferencial al cervell i també diferents propietats farmacològiques, i per tant la seva

manipulació genètica pot produir efectes més específics que els observats en les manipulacions dels transportadors. En el cas dels ratolins KO pel receptor D_1 (*Drd1* *-/-*) s'han observat resultats contradictoris en relació als efectes de recompensa de cocaïna en la CPP, tot i que inicialment es va observar una resposta igual a la dels animals controls (Miner *et al.*, 1995), un estudi posterior demostra que aquests animals no tenen preferència per la cocaïna (Chen i Xu, 2010). D'altra banda, diversos estudis mostren que els efectes estimulants de la cocaïna i de sensibilització locomotora queden suprimits (Miner *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2000; Karlsson *et al.*, 2008), així com també l'autoadministració (Caine *et al.*, 2007). Tot i que hi ha evidències farmacològiques que impliquen els receptors D2 en els efectes de recompensa de la cocaïna, en ratolins *Drd2* *-/-*, l'autoadministració de cocaïna no disminueix, i fins i tot augmenta quan les dosis de droga són molt elevades (Caine *et al.*, 2002), però presenten una lleugera reducció de CPP de cocaïna (Welter *et al.*, 2007). Els ratolins *Drd3* *-/-* i *Drd4* *-/-* presenten respostes incrementades a la cocaïna (Rubinstein *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; Katz *et al.*, 2003; Kong *et al.*, 2011; Caine *et al.*, 2012) i en canvi els ratolins *Drd5* *-/-* presenten respostes reduïdes en alguns estudis, però no en d'altres (Elliot, Sibley i Katz, 2003; Karlsson *et al.*, 2008).

Taula 6. Respostes comportamentals a la cocaïna en ratolins genoanul·lats per receptors monoaminèrgics. Adaptat de Filip *et al.*, 2005.

Gen <i>Knock-Out</i>	Hiperactivació locomotora	Sensibilització locomotora	CPP	Autoadministració
Dopamina				
<i>DRD1</i>	↓ [1] – [3]	– [5]	+ [2] – [24]	– [4]
<i>DRD2</i>	+ [6] ↓ [8]		↓ [8]	↑ [7]
<i>DRD3</i>	↑ [9] ↓ [10]	– [10]	↑ [9,22]	+ [17, 23]
<i>DRD4</i>	↑ [11]			
<i>DRD5</i>	↓ [12] + [5]	↓ [5]	+ [5]	
<i>DRD1/DRD3</i>	↓ [13]		↓ [13]	
Serotonina				
<i>5-HT1B</i>			– [15]	↑ [14, 16,19]
<i>5-HT2C</i>	↑ [20]	+ [20]		
<i>5-HT3</i>		– [21]		↑ [21]
Noradrenalina				
<i>ADRA1B</i>	↓ [18]	↓ [18]		

+ efecte existent; – manca d'efecte; ↑ efecte augmentat comparat amb la soca salvatge; ↓ efecte disminuït comparat amb la soca salvatge. 1. Xu *et al.*, 1994; 2. Miner *et al.*, 1995; 3. Xu *et al.*, 2000; 4. Caine *et al.*, 2007; 5. Karlsson *et al.*, 2008; 6. Chausmer *et al.*, 2002; 7. Caine *et al.*, 2002; 8. Welter *et al.*, 2007; 9. Xu *et al.*, 1997; 10. Carta, Gerfen i Steiner, 2000; 11. Katz *et al.*, 2003; 12. Elliot, Sibley i Katz, 2003; 13. Karasinska *et al.*, 2005; 14. Rocha *et al.*, 1997; 15. Belzung *et al.*, 2000; 16. Shippenberg, Hen i He, 2000; 17. Yuferov *et al.*, 2005; 18. Drouin *et al.*, 2002; 19. Rocha *et al.*, 1998; 20. Rocha *et al.*, 2002; 21. Hodge, Bratt i Kelley, 2008; 22. Kong *et al.*, 2011; 23. Caine *et al.*, 2012; 24. Chen i Xu, 2010.

Serotonina:

Els diferents receptors de 5-HT també tenen diferents distribucions i propietats farmacològiques, i només alguns d'ells s'han investigat en relació a la cocaïna. Els ratolins KO per *5-ht1b* (*-/-*) presenten increments en l'autoadministració de cocaïna (Rocha *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1998; Shippenberg, Hen

i He, 2000), i en canvi el paradigma CPP està suprimit (Belzung *et al.*, 2000). D'altra banda, els ratolins KO per *5-ht2c* (-/-) presenten un major alliberament de DA al NAc i un augment de l'eficàcia reforçant de la cocaïna (Rocha *et al.*, 2002). Finalment, els ratolins KO *5-ht3* (-/-) presenten un increment d'autoadministració de cocaïna acompanyada de la supressió de la sensibilització locomotora (Hodge, Bratt i Kelley, 2008). A més, la seva sobreexpressió produeix una reducció de la CPP, però són lleugerament més sensibles a baixes dosis de cocaïna (Allan *et al.*, 2001).

Noradrenalina:

En el cas del receptor noradrenèrgic *ADRA1B*, el ratolí KO presenta disminució del consum oral de cocaïna, de l'efecte estimulants sobre la locomoció i la sensibilització locomotora (Drouin *et al.*, 2002). Finalment, tot i que el desenvolupament de la CPP per cocaïna no està alterada en els ratolins dobles mutants pel receptors β ($\beta 1/\beta 2$), s'ha observat que l'extinció de la dependència és més ràpida, així com una disminució de l'estrès induït per la recaiguda (Vranjkovic *et al.*, 2012).

6.1.4 Altres models genoanul·lats

Els models murins genoanul·lats dels transportadors i els receptors de monoamines van ser els primers en ésser estudiats, a causa de la seva implicació directa amb l'establiment de la dependència de cocaïna. Tot i això, els avenços en la investigació han donat lloc a una gran quantitat de gens candidats relacionats amb altres funcions (p.e. vies de transducció de senyals o plasticitat neuronal) que podrien modular l'efecte de la droga al cervell (Uhl *et al.*, 2008). S'han generat models genoanul·lats d'alguns d'aquests gens per determinar la seva implicació en l'establiment de la dependència de cocaïna. Un dels principals problemes amb els ratolins KO, en què s'elimina per complet l'expressió del gen, és que no representen el que succeeix en humans, donat que rarament es produeix la deleció completa del gen. Per això alguns estudis opten per utilitzar animals KO heterozigots, que en general expressen el 50% de la proteïna, per simular millor les variacions que trobem en humans. En aquests casos, tenint en compte que l'addicció és una malaltia molt poligènica, la modificació parcial de només un gen pot complicar la detecció d'alteracions fenotípiques (Hall *et al.*, 2013).

6.2 Efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica

Les drogues d'abús actuen sobre el cervell a nivell cel·lular i molecular produint canvis en l'estructura i les connexions cerebrals, que condueixen a l'addicció. L'administració aguda i repetida de cocaïna altera l'expressió de nombrosos gens i vies de neurotransmissió. La majoria d'alteracions conegudes són transitòries, i s'hipotetitza que representen adaptacions compensatòries per mantenir l'homeòstasi, tot reduint els efectes de la droga. En canvi, les alteracions que persisteixen podrien participar en els processos d'addicció, abstinència i recaiguda (Yuferov *et al.*, 2005).

L'estudi de l'expressió gènica en cervells *post-mortem* d'individus d'addictes és una eina molt important per descobrir quins mecanismes moleculars són els responsables de les maladaptacions que donen lloc a l'addició. Aquests estudis donen resultats que permeten ampliar el coneixement sobre les addiccions (Taula 7) (Zhou, Enoch i Goldman, 2014), tot i que moltes vegades aquests són contradictoris entre ells, segurament a causa de les limitacions inherents d'aquest tipus d'estudis (variabilitat en el temps transcorregut des de la mort fins l'obtenció de la mostra, variabilitat en el temps des de l'últim consum, quantificació del consum de droga, consum d'altres drogues, condicions comòrbides amb altres trastorns psiquiàtrics, les causes de la mort i l'estat agònic). No obstant això, s'han pogut identificar canvis neuronals d'expressió gènica comuns entre individus addictes de diferents estudis (Lehrmann *et al.*, 2006; Marie-Claire *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011), alguns dels quals també s'ha observat en organismes models. Això demostra que totes les drogues d'abús activen un conjunt de vies moleculars comunes implicades en adaptacions neuronals (detallades a continuació), tot i que també es produeixen canvis específics de droga (Albertson *et al.*, 2006; Celentano *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2011).

Aquests estudis també ens han permès veure que els canvis d'expressió induïts per la cocaïna són específics d'àrea cerebral. Així, en les dues regions més estudiades del sistema mesolímbic, l'estriat dorsal i el NAc, s'han vist alteracions en gens implicats en la transmissió dopaminèrgica, glutamèrgica i GABAèrgica (McClung *et al.*, 2005; Ghasemzadeh, Mueller i Vasudevan, 2009; Schumann i Yaka, 2009), sistemes que tenen un paper molt important en la cerca de la droga i la recompensa. D'altra banda, en l'hipocamp, una regió essencial per la memòria associativa i l'aprenentatge, s'han vist alteracions en l'expressió de gens implicats en la potenciació a llarg termini (*long-term potentiation*, LTP) (Zhou *et al.*, 2011). La LTP és un procés que es basa en una intensificació perllongada de la transmissió de senyals entre dues neurones, i és essencial en tots els processos d'aprenentatge, com seria l'establiment de la dependència (Noda i Nabeshima, 2002; Thomas, Kalivas i Shaham, 2008; Pittenger, 2013).

La majoria d'estudis, però, s'han realitzat en models cel·lulars o animals (ratolí, rata i primats). En models cel·lulars només s'han realitzat tres estudis d'expressió, tot ells en progenitors neuronals humans tractats amb cocaïna, que assenyalen l'activació de vies pro-inflamatòries i de resposta a l'estrès oxidatiu i alteracions en la migració i diferenciació neuronal (Crawford *et al.*, 2006; Poon *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). D'altra banda, tot i que els models animals no mimetitzen tots els aspectes de l'addició a cocaïna en humans, presenten una menor variabilitat genètica i permeten controlar finament la resta de variables com la quantitat de droga consumida. A més, aquests estudis permeten avaluar l'efecte de la cocaïna a diferents temps d'exposició (agut, repetitiu o crònic), les conseqüències de l'administració passiva i l'autoadministració de la droga, l'efecte del consum de diferents quantitats

de droga i de diferents intervals de temps entre l'última administració i el sacrifici, així com els efectes de períodes d'abstinència i recaiguda en el consum.

Taula 7. Estudis d'expressió gènica realitzats en mostres de cervell *post-mortem* humanes.

Àrea	Individus	Tècnica (transcrits)	Vies identificades	Referència
PFC	7 casos i 7 controls	Neuroarray (15.000)	Funció mitocondrial, oligodendròcits, matriu extracel·lular i citoesquelet, transducció de senyals, neurotransmissió i factors de transcripció.	Lehrmann, 2003
NA	10 casos i 10 controls	Human Genome U133 AB set (39.000)	Processament del RNA, oligodendròcits, neurotransmissió, receptors, canals iònics i transportadors, matriu extracel·lular, resposta immune i transducció de senyals.	Albertson, 2004
NAC	I: 5 casos i 5 controls II: 10 casos i 10 controls	Human Genome u95 ABC set, U133 AB set (39.000)	Processament del RNA, neurotransmissió, receptors, canals iònics i transportadors, matriu extracel·lular, resposta immune, transducció de senyals i oligodendròcits.	Bannon, 2005
aPFC	42 casos i 30 controls	Mammalian Gene Collection (9216)	Senyalització per calmodulina, transcrits de l'aparell de golgi i el reticle endoplasmàtic, metabolisme del colesterol i lípids, apoptosi i mort cel·lular.	Lehrmann, 2006
HP	10 casos i 11 controls	Human Genome U133 AB set (39.000)	Angiogènesi, apoptosi i mort cel·lular, matriu extracel·lular, neurogènesi, receptors, canals iònics i transportadors, factors de transcripció i transducció de senyals.	Mash, 2007
HP	9 casos i 9 controls	RNA-seq	Processament del RNA, matriu extracel·lular i organització de la cromatina.	Zhou, 2011
VTA i NAC	10 casos i 10 controls	HT-12 BeadChips (16.500)	Organització de la cromatina, factors de transcripció, apoptosi i mort cel·lular, diferenciació neuronal.	Bannon, 2014

VTA: àrea ventral tegmental; NAC: nucli accumbens; HP: hipocamp; aPFC: escorça prefrontal anterior; PFC: escorça prefrontal

La majoria d'estudis, però, s'han realitzat en models cel·lulars o animals (ratolí, rata i primats). En models cel·lulars només s'han realitzat tres estudis d'expressió, tot ells en progenitors neuronals humans tractats amb cocaïna, que assenyalen l'activació de vies pro-inflamatòries i de resposta a l'estrès oxidatiu i alteracions en la migració i diferenciació neuronal (Crawford *et al.*, 2006; Poon *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009). D'altra banda, tot i que els models animals no mimetitzen tots els aspectes de l'addició a cocaïna en humans, presenten una menor variabilitat genètica i permeten controlar finament la resta de variables com la quantitat de droga consumida. A més, aquests estudis permeten avaluar l'efecte de la cocaïna a diferents temps d'exposició (agut, repetitiu o crònic), les conseqüències de l'administració passiva i l'autoadministració de la droga, l'efecte del consum de diferents quantitats de droga i de diferents intervals de temps entre l'última administració i el sacrifici, així com els efectes de períodes d'abstinència i recaiguda en el consum.

Degut a la gran quantitat d'estudis realitzats en models animals, la disparitat de resultats obtinguts, i la dificultat de resumir-los tots, ens centrarem en els estudis realitzats en humans i que es correlacionen amb els estudis en animals. És important tenir en compte que els resultats obtinguts en estudis en humans se centren únicament en els canvis deguts a l'exposició continuada a la droga, amb la qual cosa es fa difícil detectar els canvis aguts i transitoris que s'observen en animals. A més, en models animals l'exposició crònica a la droga normalment fa referència a pocs dies o setmanes, mentre que en humans normalment es refereix a una elevada exposició a la cocaïna que pot durar anys. Aquestes diferències podrien explicar moltes de discrepàncies observades entre els estudis en humans i els models animals.

Els estudis realitzats amb mostres de cervell *post-mortem* en humans s'han realitzat emprant majoritàriament *microarrays* però algun també s'ha dut a terme mitjançant la seqüenciació massiva de RNA (RNA-seq) (Taula 7). Aquests treballs han permès identificar centenar de gens implicats en una sèrie de processos moleculars diferencialment expressats en els cervells d'addictes a cocaïna:

Matriu extracel·lular

Les proteïnes de la matriu extracel·lular, bàsicament integrines, cadherines, i laminines, són responsables de la comunicació cèl·lula-cèl·lula i el suport estructural. L'expressió dels gens que codifiquen per aquestes proteïnes presenta alteracions en resposta a cocaïna (Lehrmann *et al.*, 2003, 2006; Albertson *et al.*, 2004; Mash *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011). Altres gens de la matriu extracel·lular alterats sota l'efecte de la cocaïna codifiquen proteïnes no estructurals implicades en l'organització de la matriu, com la metal·loproteïnasa 9 (MMP9), l'inhibidor de MMP i la proteïna *reversion-inducing-cysteine-rich* amb motius kazal (RECK) (Mash *et al.*, 2007). Tant les proteïnes estructurals com les no estructurals estan implicades en la comunicació sinàptica i remodelatge durant el procés de LTP (Huntley, Gil i Bozdagi, 2002; Wright i Harding, 2009; Thalhammer i Cingolani, 2014; Bijata *et al.*, 2017). En models animals s'ha vist que la inhibició de MMP disminueix la CPP i la recaiguda (Brown *et al.*, 2007), pel fet que l'activitat de MMP9 i MMP2 és necessària per tal que es pugi produir la plasticitat sinàptica associada a la recaiguda (Smith *et al.*, 2014).

Comunicació sinàptica i neuroplasticitat

L'observació de canvis neuroanatòmics en l'estructura sinàptica quan hi ha consum crònic de cocaïna, fa pensar en l'existència de canvis d'expressió de gens relacionats amb la sinapsi neuronal. En humans s'han identificat canvis d'expressió en gens implicats en la formació de la vesícula sinàptica i l'ancoratge (com la sinaptotagmina i la clatrina), neuropèptids (com la prodinorfina i transcrit regulat per cocaïna i amfetamina (*CART*)), síntesi de neurotransmissors (descarboxilasa 1 de glutamat (*GAD1*)),

Introducció

plasticitat neuronal (com la tubulina i l'axotrofina) i guiatge axonal (com la semaforina 6A i l'oligofrenina) (Chen *et al.*, 1999; Lehrmann *et al.*, 2003, 2006; Albertson *et al.*, 2004; Bannon, Kapatos i Albertson, 2005; Mash *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011; Bannon *et al.*, 2014). En animals també s'han observat canvis en l'expressió de la majoria d'aquests gens i d'altres amb funcions similars que podrien estar implicats en LTP i l'aprenentatge espacial observat en models animals d'abús de cocaïna (Del Olmo *et al.*, 2007; Schoenbaum i Shaham, 2008).

Receptors, canals iònics i transportadors

Els receptors, transportadors i canals iònics estan situats tant a la membrana pre- com postsinàptica. Un dels canvis més descrits, tant en humans com en ratolí, és la disminució de l'expressió de *DAT/SLC6A3*, una de les principals diana de la cocaïna (Little *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Arroyo, Baker i Everitt, 2000; Bannon *et al.*, 2002; Peraile *et al.*, 2010; Calipari *et al.*, 2013). També s'han descrit canvis en l'expressió de canals iònics i receptors de diversos sistemes de neurotransmissió com el dopaminèrgic, glutamatèrgic i GABAèrgic (Tang *et al.*, 2003; Lehrmann *et al.*, 2006; Mash *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011; Enoch *et al.*, 2012). Aquests canvis d'expressió en els sistemes de neurotransmissió són consistents amb els que s'observen en estudis realitzats en models animals.

Oligodendròcits i mielina

Els oligodendròcits són les cèl·lules responsables de produir mielina, la capa fosfolipídica que recobreix els axons de les neurones. La transmissió dels impulsos elèctrics al llarg de la neurona depenen de la presència i bon funcionament de la mielina. En els estudis humans d'abús de cocaïna s'ha observat la disminució de l'expressió de tres components de la mielina: els dos components majoritaris (proteïna bàsica de la mielina, *MBP*, i proteïna proteolipídica 1, *PLP1*) i també la proteïna bàsica associada a mielina oligodendrocítica (*MOBP*) (Lehrmann *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003; Albertson *et al.*, 2004; Bannon, Kapatos i Albertson, 2005; Kristiansen, Bannon i Meador-Woodruff, 2009; Bannon *et al.*, 2014). Aquests canvis es poden correlacionar amb els resultats obtinguts amb tècniques de neuroimatge en què es veu una disminució de la substància blanca i alteracions en els *tracks* de mielina en pacients dependents de cocaïna (Lim *et al.*, 2002; Moeller *et al.*, 2007; Narayana *et al.*, 2014). En ratolí també s'ha descrit alteracions en la mielina després de l'exposició crònica a cocaïna (Kovalevich *et al.*, 2012).

Apoptosi i mort cel·lular

L'augment de l'apoptosi neuronal podria jugar un paper important en els canvis anatòmics i comportamentals relacionats amb l'exposició a cocaïna. En estudis en humans s'han descrit canvis en l'expressió de gens relacionats amb l'apoptosi, com ara els gens de mort programada 7 i 8 (*PDCD7* i

AIFM1), i el gen de resposta a apoptosi (*DPF2*) (Albertson *et al.*, 2006; Lehrmann *et al.*, 2006; Mash *et al.*, 2007; Bannon *et al.*, 2014). També s'ha observat apoptosi induïda per cocaïna en cèl·lules *in vitro* fetals, en progenitors neuronals i en cèl·lules PC12 (Oliveira *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2007; Poon *et al.*, 2007; Lepsch *et al.*, 2009). En animals adults no s'han identificat canvis en l'expressió de gens proapoptòtics, al contrari que en els estudis humans.

Funció mitocondrial

Els gens implicats en la funció mitocondrial i el metabolisme energètic són dels que més recurrentment es troben diferencialment expressats, com ara l'ATP sintasa mitocondrial i la deshidrogenasa de malat (*MDH*) (Lehrmann *et al.*, 2003; Albertson *et al.*, 2004, 2006; Bannon, Kapatos i Albertson, 2005; Mash *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011). Aquests resultats són consistents amb els nombrosos estudis de neuroimatge en humans, primats i ratolins que demostren reduccions en l'activitat metabòlica del cervell associades a la cocaïna (London *et al.*, 1990; Volkow *et al.*, 1991, 1992; Beveridge *et al.*, 2006; Thanos *et al.*, 2008).

Transducció de senyals

En base al gran nombre de gens diferencialment expressats pel consum de cocaïna, s'han identificat dues vies de transducció de senyals que, a més, estan alterades per altres drogues d'abús (Li, Mao i Wei, 2008). La primera, la via de les proteïna-cinases activada per mitògens (*mitogen activated protein kinases*, MAPK), és una cascada de senyalització intracel·lular que regula una gran quantitat de processos, inclosa la supervivència cel·lular (Tiedje, Holtmann i Gaestel, 2014), la neuroplasticitat i la inducció de l'expressió gènica per cocaïna (Radwanska, Caboche i Kaczmarek, 2005; Ferguson *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006). La segona via identificada, que se solapa amb la via de les MAPK, és la LTP sinàptica, que es creu que s'estimula tant per MAPK com per la via de senyalització per calmodulina a través de l'activació dels receptors NMDA i AMPA de glutamat. Aquesta via està altament activada a l'hipocamp on es processa la memòria a curt i llarg termini. S'ha observat que en individus dependents de cocaïna aquesta via està altament desregulada, fet que facilitaria el remodelatge sinàptic produït per la cocaïna i la creació de records associats a la droga que donen lloc al deler (Thompson, Gosnell i Wagner, 2002; Thompson, Swant i Wagner, 2005; del Olmo *et al.*, 2006; Huang, Lin i Hsu, 2007; Guan *et al.*, 2009).

Factors de transcripció

Les alteracions que produeix la cocaïna sobre la dopamina sinàptica altera vies de senyalització donant lloc a l'activació o inhibició de factors de transcripció, que són els responsables de modular els efectes de la cocaïna sobre l'expressió gènica. Tot i que s'han identificat canvis d'expressió en diferents factors de transcripció tant en humans com en animals, hi ha un grup de gens identificat majoritàriament en

models animals, els gens immediats primerencs (*immediate early genes*: IEGs). Els IEGs funcionen com a resposta ràpida i transitòria a estímuls que posteriorment donen lloc a respostes de llarga durada. Entre els IEGs que més freqüentment s'han trobat alterats en animals hi ha *c-fos*, *c-jun*, *fosB* i *homer1a* (Nestler, 2008; Chandra i Lobo, 2017). En els estudis humans és més difícil detectar els IEG perquè l'exposició a la droga és crònica i a través de llargs períodes. Tot i això, en un estudi recent amb mostres de cervell *post-mortem* d'individus dependents a cocaïna es van identificar 99 gens diferencialment expressats, entre els quals hi ha *JUN*, *FOS* i *FOSB* (Bannon *et al.*, 2014).

Organització de la cromatina i processament del RNA

Tant en models animals com en estudis amb mostres humanes, s'ha vist que l'exposició a cocaïna produeix canvis en l'expressió dels gens que codifiquen proteïnes encarregades de modificar les histones i de metilar el DNA, com per exemple HDAC2 o DNMT3a (Chandrasekar i Dreyer, 2010; LaPlant *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Bannon *et al.*, 2014). Aquestes alteracions activen mecanismes de regulació epigenètica que contribueixen a incrementar i estabilitzar els canvis descrits anteriorment. A més, l'exposició crònica a la cocaïna també altera l'expressió de gens que codifiquen proteïnes d'unió a RNA implicades en el processament del RNA ribosomal i el RNA missatger (Bannon, Kapatos i Albertson, 2005; Zhou *et al.*, 2011).

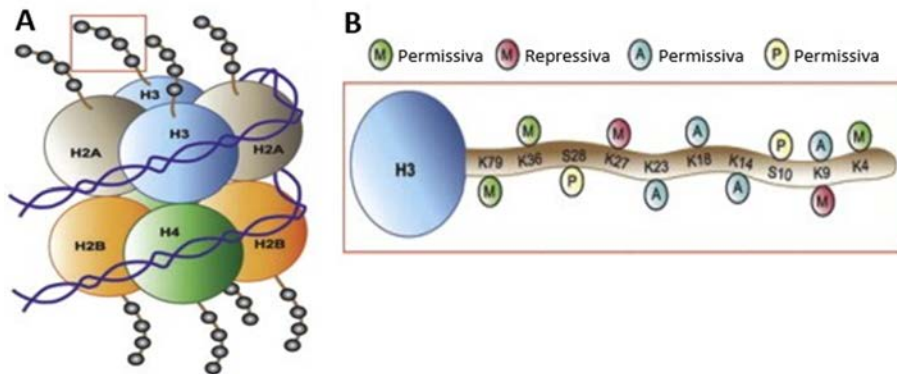
6.3 Regulació epigenètica

Una de les característiques principals de les addiccions és la cerca compulsiva de la droga sense tenir en compte les conseqüències negatives que això pot comportar. Aquest comportament persisteix molt de temps després de cessar el consum de la droga a causa de les neuroadaptacions induïdes per la cocaïna i les alteracions en l'expressió gènica a diferents àrees cerebrals. En els últims anys, una gran quantitat d'estudis han demostrat que els mecanismes epigenètics podrien tenir un paper en l'alteració de l'expressió genètica a llarg termini observada en individus dependents. Entre aquests mecanismes hi ha la modificació d'histones, la metilació del DNA i els microRNAs (miRNAs).

6.3.1 Modificació d'histones

A l'interior del nucli cel·lular el DNA està empaquetat en forma de cromatina (DNA, histones i proteïnes no-histones; Figura 8A) (Nestler, 2014). La modificació covalent de les cues N-terminals de les histones regula el grau de condensació de la cromatina fent que els gens d'aquella regió siguin més o menys accessibles a la maquinària de transcripció. Les modificacions més freqüents són l'acetilació dels residus de lisina (K), associada a un increment de la transcripció, la metilació dels residus de lisina o arginina (R) i la fosforilació dels residus de serina (S) o treonina (T), que poden promoure o reprimir la

transcripció, en funció del residu que es modifiqui. A més, hi ha altres tipus de modificacions com l'ubiquitinació, la SUMOilació i l'ADP-ribosilació, l'efecte de les quals no està encara ben caracteritzat (Figura 8B) (Jenuwein i Allis, 2001). Aquestes marques són reversibles i es coneix una gran quantitat d'enzims que actuen afegint o eliminant aquestes marques en funció del context cel·lular.



fosforilació (P), acetilació (A) i metilació (M) a les cues de les histones canvien el grau de compactació de la cromatina i permeten la regulació de l'expressió gènica. K= Lisina. Adaptat de Nestler, 2014.

Hi ha moltes evidències que relacionen els canvis d'expressió gènica que produeix l'exposició crònica a les drogues d'abús, com la cocaïna, amb canvis en els mecanismes que regulen les marques de les histones, i per tant l'estat de compactació de la cromatina. L'exposició aguda i crònica a cocaïna produeix un increment global de l'acetilació de les histones H3 i H4 al NAc (Kumar et al, 2005; Schroeder et al, 2008; Shen et al, 2008), una regió molt important en el sistema de recompensa. Tot i que les vies intracel·lulars que donen lloc a aquests canvis no estan massa ben definides, s'han relacionat amb l'acetil transferasa d'histones (HAT) CBP (*CREB-binding protein*) i la desacetilasa d'histones (HDAC) HDAC5 (Levine et al., 2005; Renthal et al., 2007; Malvaez et al., 2011; Taniguchi et al., 2012; Valzania et al., 2017). D'altra banda, també s'ha vist que l'administració crònica de cocaïna produeix una disminució de la metilació d'histones global al NAc, juntament amb la disminució de l'expressió dels enzims G9a i GLP (*G9a-like protein*) (Maze et al., 2010; Benevento et al., 2015), dues metil transferases d'histones (HMT) que catalitzen la dimetilació de la K9 a la H3 (H3K9me2).

Estudis d'immunoprecipitació de cromatina seguits de seqüenciació massiva (ChIP-seq) o hibridació amb un *microarray* de DNA (ChIP-chip) ens permeten estudiar les regions de la cromatina modificades. S'han realitzat diversos estudis de ChIP a gran escala utilitzant anticossos contra H3 i H4 acetilades i contra H3K9me2 (Renthal et al., 2009) en mostres de NAc després de l'administració crònica de cocaïna, i contra H3K9me3 en mostres *post-mortem* d'hipocamp d'individus dependents de cocaïna (Farris, Harris i Ponomarev, 2015). Aquests estudis ens permeten veure una correlació entre aquests marques i l'alteració de l'expressió gènica, tot i que la majoria de gens no segueixen el patró esperat, la qual cosa suggereix que el codi de regulació d'histones és molt més complex i que són necessaris més estudis per entendre'l correctament.

6.3.2 Metilació del DNA

La metilació del DNA es produeix per l'addició d'un grup metil al C5 de la citosina (5-mC), majoritàriament a les illes CpG (Klose i Bird, 2006). En general, aquesta modificació promou la unió de proteïnes d'unió a grups metil-CpG, com MeCP2, que recluten co-repressors transcripcionals, com HDACs (Figura 9A) (Bird i Wolffe, 1999; Kundu i Rao, 1999). També s'ha vist que la presència citosines metilades al promotor directament inhibeix la transcripció evitant la unió de factors de transcripció (Figura 9B), un mecanisme especialment important en la dependència de cocaïna (Hope, 1998; Domcke *et al.*, 2015).

La metilació del DNA està catalitzada per metiltransferases de DNA (DNMTs) i, tot i que no és un procés irreversible, es considera una modificació més estable que la modificació d'histones (Figura 9C). L'ús d'inhibidors i activadors de la metilació permet estudiar el paper de la metilació del DNA en diferents aspectes de l'addició a cocaïna en animals.

Per exemple, la inhibició de l'activitat Dnmt a l'hipocamp abans de començar l'entrenament de CPP dificulta el condicionament (Han *et al.*, 2010). En canvi, si la inhibició es realitza al NAc, incrementa tant la CPP com la sensibilització locomotora associada a cocaïna (Laplant *et al.*, 2010). Els resultats obtinguts en aquest tipus d'estudis mostren que el paper de la metilació *de novo* en l'addició depèn de l'estadi de l'adquisició en què s'apliqui el fàrmac, del comportament que es pretén estudiar i de les àrees cerebrals implicades.

D'altra banda, utilitzant tècniques d'immunoprecipitació i seqüenciació massiva (com MBD-seq o MeDip-seq) es poden analitzar a gran escala les regions diferencialment metilades (DMRs). Diversos estudis han utilitzat aquesta tècnica per comparar els nivells de metilació en ratolins o rates que

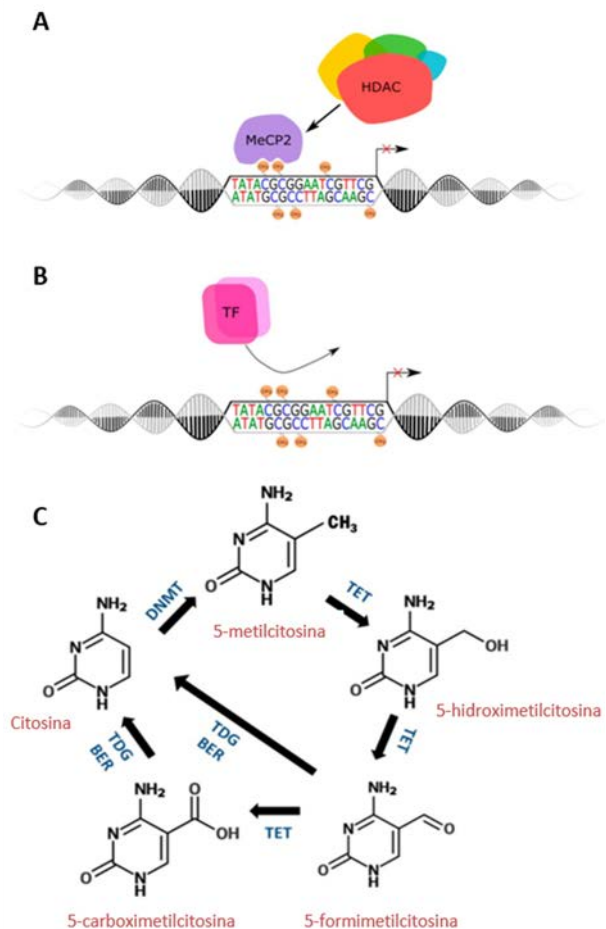


Figura 9. Dinàmica i funcions de la metilació del DNA. A) Les citosines metilades a la regió promotora dels gens recluten proteïnes d'unió a grups metil i complexes remodeladors de la cromatina per inhibir la transcripció. B) La metilació de promotors evita la unió de factors de transcripció. C) Cicle de modificació de citosines. MeCP2= methylated-CpG binding protein2; HDAC= desacetilasa d'histones; DNMT= metiltransferasa de DNA; TET= ten-eleven translocation protein; TDG= glicosilasa de DNA-timina; BER= base excision repair; TF= factor de transcripció. Adaptada de Vaillancourt *et al.*, 2017.

s'autoadministren cocaïna contra controls, en diferents àrees cerebrals (NAc i mPFC) (Baker-Andresen *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2015; Fonteneau *et al.*, 2017). Aquests estudis mostren que la majoria de DMRs estan a l'interior dels gens o en regions intergèniques, i solament una petita part es troben en regions promotores. En aquests casos s'ha vist correlació negativa entre l'expressió del gen i el grau de metilació del promotor. En canvi, en les DMRs intragèniques s'ha vist correlació amb canvis d'expressió d'isoformes específiques d'aquests gens (p.e *Cdh13*, *Cpeb4* i *Mctp1*) (Baker-Andresen *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2015), un mecanisme de regulació del *splicing* alternatiu prèviament descrit (Oberdoerffer, 2012).

La gran estabilitat d'aquestes marques epigenètiques juntament amb l'augment de les evidències que les associen amb canvis neuroadaptatius, plasticitat sinàptica i memòria (Heyward i Sweatt, 2015), potencien la hipòtesi que la metilació del DNA podria tenir un paper rellevant en el desenvolupament de la dependència.

6.3.3 microRNAs

Els microRNAs (miRNAs) són molècules de RNA no-codificants (ncRNAs) curtes que actuen com a reguladors post-transcripcionals de l'expressió gènica unint-se a RNA missatgers (mRNA) diana per complementaritat de bases a la regió 3'UTR (*3'-untranslated region*), tot i que en alguns casos també es pot unir a la regió 5'UTR (*5'-untranslated region*) o a la regió codificant del mRNA (Lytle, Yario i Steitz, 2007; I. Lee *et al.*, 2009; Forman i Collier, 2010). La unió miRNA-mRNA bloqueja l'accés dels ribosomes al mRNA o indueix la degradació del mRNA, donant lloc a una disminució de la síntesi de la proteïna (Figura 10). A més de la funció citoplasmàtica canònica, hi ha nombroses evidències que demostren que els miRNAs poden actuar al nucli regulant l'estabilitat del mRNA al nuclèol i també el *splicing* alternatiu, així com activant o inhibint la transcripció dels gens diana (Catalanotto, Cogoni i Zardo, 2016).

La major part dels gens que codifiquen miRNAs estan situats en regions intergèniques i es poden trobar en forma d'una sola còpia, múltiples còpies o en forma de clústers de gens diferents (Lim *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004). Aproximadament el 6,5% dels gens humans codifiquen miRNAs i més del 60% dels gens codificants estan regulats per miRNAs. Això és degut a que un miRNA pot regular l'expressió de 10 a 100 mRNAs diana diferents, i a la vegada, un gen pot estar regulat per desenes o centenars de miRNAs diferents (Friedman *et al.*, 2009). A més, la funció dels miRNAs no és del tipus "tot o res" (*on-off switch*), sinó que permet la regulació fina de l'expressió del gen diana, donant lloc a un mecanisme de control dinàmic de l'expressió (Kim, Han i Siomi, 2009; Afonso-Grunz i Müller, 2015; Gulyaeva i Kushlinskiy, 2016).

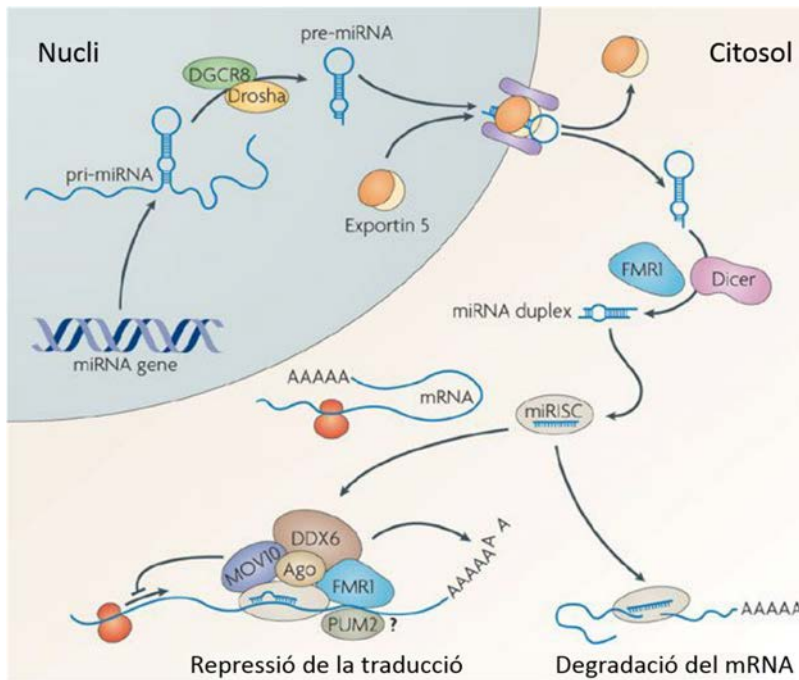


Figura 10. La transcripció del miRNA per la RNA polimerasa II genera els pri-miRNAs, que són tallats al nucli cel·lular per un complex microprocessador que inclou Droscha i DGCR8, donant lloc al pre-miRNA. Aquest és transportat al citoplasma per la via dependent de l'exportina 5, on serà processat per la RNasa Dicer donant lloc a un miRNA dúplex. En funció de les característiques termodinàmiques del miRNA dúplex, una de les cadenes (líder) serà carregada al complex multiproteic miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) i l'altra (passatgera) serà degradada. El complex miRISC guiarà el miRNA cap al mRNA

diana, que s'unirà, preferiblement, a la regió 3'UTR. Aquesta interacció provocarà la inhibició de la traducció o la degradació del mRNA diana, modificant així la seva expressió. Adaptada de Schratt, 2009.

Aquests transcrits reguladors estan molt conservats entre espècies, i tenen funcions molt importants en diferents processos biològics com ara el desenvolupament, la proliferació cel·lular, la diferenciació i l'apoptosi (Huang *et al.*, 2011). Diversos estudis suggereixen que els canvis d'un sol nucleòtid (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) localitzats als miRNAs o als seus llocs d'unió als mRNAs poden alterar la regulació de l'expressió gènica dels miRNAs, donant lloc a malalties o fenotips no patològics (Saunders, Liang i Li, 2007; Borel i Antonarakis, 2008; Song i Chen, 2011). Recentment es va fer un estudi a gran escala per identificar les interaccions entre miRNA i mRNAs al cervell humà, mitjançant la tècnica d'immunoprecipitació contra la proteïna argonauta 2 (AGO2), una de les proteïnes del complex miRISC. En aquest estudi es van identificar unes 7000 regions d'unió a AGO2 en les quals hi havia 916 SNPs que alterarien la unió miRNA:mRNA (Boudreau *et al.*, 2014).

6.3.3.1 El paper dels microRNAs al SNC

Al cervell dels mamífers, les neurones estan interconnectades mitjançant milions d'unions especialitzades, anomenades sinapsis. La formació i el funcionament correcte d'aquestes sinapsis és crucial per a la cognició, i molts trastorns neuropsiquiàtrics es caracteritzen per disfuncions sinàptiques (Lepeta *et al.*, 2016). En els últims anys, moltes vies d'investigació en aquest camp s'han centrat en el paper dels miRNAs en el funcionament de les neurones i l'establiment de les sinapsis i activitats cerebrals superiors i la memòria (Wang, Kwon i Tsai, 2012; Kolshus *et al.*, 2013). Hi ha dues característiques clau que mostren la importància que tenen els miRNAs en la funció sinàptica: d'una

banda, la seva capacitat per regular finament la traducció dels mRNAs de forma localitzada al compartiment sinaptodendrític i, d'altra banda, la modulació de la seva pròpia expressió i funció segons l'activitat neuronal (Schratt, 2009).

El control espaciotemporal de la traducció del mRNA és essencial pel desenvolupament de les sinapsis i la plasticitat neuronal. En un estudi de Schratt i col·laboradors es va detectar un miRNA específic de cervell, el miR-134, localitzat al compartiment sinaptodendrític de les neurones de l'hipocamp, on mitjançant la regulació de la síntesi de la proteïna Limk1 controla la mida de les espines dendrítiques (Schratt *et al.*, 2006). En un estudi més recent es va demostrar que aquest miRNA també regula l'expressió de la desacetilasa sirtuin-1 (*SIRT1*), la qual està implicada en processos de memòria i aprenentatge (Gao *et al.*, 2010). A més del seu paper en el desenvolupament i plasticitat neuronal, els miRNAs també juguen un paper important en les alteracions neuronals associades a malalties neurodegeneratives (Ferrante i Conti, 2017). Per exemple, a l'hipocamp de pacients amb Alzheimer s'ha detectat un augment en l'expressió del miR-34c, que es relaciona negativament amb la consolidació de la memòria, i la seva inhibició podria utilitzar-se com a diana terapèutica (Zovoilis *et al.*, 2011).

6.3.3.2 El paper dels microRNAs en la dependència de cocaïna

L'addicció sovint es conceptualitza com un trastorn de la plasticitat sinàptica, en el qual els miRNAs tenen un paper fonamental. Per això en els últims anys una gran quantitat d'estudis s'han centrat en l'estudi del paper dels miRNAs en el desenvolupament de la dependència, tots ells realitzats en models animals. Els miRNAs duen a terme el control de l'expressió gènica a través de la unió al mRNA gràcies al complex RISC, un dels components principal del quals és la proteïna Ago2 (Hammond *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2004; Diederichs i Haber, 2007; O'Carroll *et al.*, 2007). S'ha vist que en neurones que expressen *Drd2* al nucli estriat de ratolins deficients en proteïna Ago2, es produeix una disminució considerable de l'autoadministració de cocaïna en comparació amb els controls, així com també de la preferència en el test CPP (Schaefer *et al.*, 2010). En canvi, la resposta al menjar o al sucre no està alterada, tot demostrant que els canvis obtinguts són específics de les vies activades per la cocaïna.

L'exposició a la cocaïna altera els nivells d'expressió de miRNAs en diferents àrees cerebrals (Taula 8). En un estudi de Chandrasekar i Dreyer es va observar que l'administració crònica de cocaïna en ratolins de la soca salvatge produïa l'increment de l'expressió del miR-181 i la disminució del miR-124 i el Let-7 al sistema mesolímbic dopaminèrgic. La sobreexpressió d'aquests miRNAs al NAc del ratolí produeix un increment de la CPP induït per cocaïna en el cas de miR-181, i una atenuació de la resposta en el

cas de miR-124 i Let-7. I s'observaven resultats contraris quan s'inhibia el miRNA corresponent. Per últim, la sobreexpressió d'aquests miRNAs produeix la disminució de l'expressió de gens importants en plasticitat neuronal, recompensa i memòria, com ara *Bdnf*, *FosB*, *Mecp2*, *Gria2*, *Drd3* i *Dat* (Chandrasekar i Dreyer, 2009, 2011). Aquests resultats suggereixen que aquests miRNAs podrien tenir un paper molt important en la remodelació de l'estriat que donen lloc a les propietats motivacionals de la cocaïna. La disminució de l'expressió del miR-124 també s'ha observat en cèl·lules neuronals en cultiu (Be(2)-M17 i SH-SY5Y) tractades amb cocaïna (Rodrigues *et al.*, 2011).

Taula 8. Alteració de l'expressió de miRNAs i efectes sobre el comportament produïts per la cocaïna. Adaptat de Doura i Unterwald, 2016.

miRNA	Expressió i àrea*	Efectes de la sobreexpressió del miRNA sobre el fenotip induït per cocaïna	Dianes conegudes
miR-181a	↑ S ^[1]	Augment CPP per cocaïna ^[2]	<i>BDNF</i> , <i>SIRT1</i> , <i>GluA2</i> ^[3,4]
miR-124/124a	↓ S ^[1]	Disminució CPP per cocaïna ^[2]	<i>BDNF</i> , <i>CREB</i> , <i>NR3C2</i> ^[1,5]
miR-134	↑ HPC ^[6]	Modulació de la plasticitat ^[7]	<i>CREB</i> , <i>BDNF</i> , <i>SIRT1</i> ^[7]
miR-212/132	↑ S ^[8]	Disminució autoadministració de cocaïna ^[8]	<i>BDNF</i> , <i>CREB:TORC</i> , <i>MeCP2</i> ^[8]
Let-7	↓ S ^[1]	Modulació de la plasticitat ^[1] Disminució CPP per cocaïna ^[2]	<i>SIRT1</i> ^[9]

*Canvis d'expressió induïts per l'exposició crònica a cocaïna i àrea cerebral en què s'ha detectat el canvi; ↑ Augment de l'expressió induïda per cocaïna; ↓ Disminució de l'expressió induïda per cocaïna; S= estriat; HPC= hipocamp; 1. Chandrasekar i Dreyer, 2009; 2. Chandrasekar i Dreyer, 2011; 3. Rivetti di Val Cervo *et al.*, 2012; 4. Saba *et al.*, 2012; 5. Söber, Laan i Annilo, 2010; 6. Chen, Liu i Guan, 2013; 7. Gao *et al.*, 2010; 8. Hollander *et al.*, 2010; 9. Xie *et al.*, 2014.

Un estudi recent mostra que l'autoadministració de cocaïna produeix la supressió de l'expressió de miRNAs rellevants pel procés addictiu (miR-101b, miR-137, miR-212 i miR-132) a NAc i estriat dorsomedial. Aquests miRNAs regulen gens implicats en neuroplasticitat, raó per la qual aquests canvis podrien ser una resposta compensatòria a la droga per incrementar l'expressió de gens associats a plasticitat neuronal, que són els responsables de la neuroadaptació produïda per la droga (Quinn *et al.*, 2017). Per exemple, miR-101 és un conegut regulador de *mTOR*, una cinasa associada a plasticitat que regula la motivació per les drogues (Neasta *et al.*, 2010; James *et al.*, 2014, 2016; Quinn *et al.*, 2015). El miR-137 regula negativament el gen *SLC6A3*, que codifica la proteïna DAT, la principal diana de la cocaïna al cervell (Jia *et al.*, 2016).

Un altre aspecte molt important de la dependència és la compulsivitat. Per explorar quins miRNAs poden estar implicats en el consum compulsiu de cocaïna es va generar un model animal d'autoadministració amb ampli accés a la droga (6h). Es va detectar un augment de l'expressió del miR-212/132 a l'estriat dorsal en comparació tant amb els animals control (salí) com amb els que tenien un accés limitat a la droga (1h) (Hollander, *et al.*, 2010). La sobreexpressió d'aquest miRNA produeix una disminució de l'autoadministració de cocaïna, tot suggerint que l'increment d'expressió observat prèviament està relacionat amb una resposta adaptativa per inhibir l'augment progressiu del consum

de cocaïna. El mecanisme pel qual el miR-212/132 es relaciona amb el consum de cocaïna és complex i implica la participació de la via de senyalització per CREB, la qual està implicada en una disminució del consum, i la via de MeCP2-BDNF, la qual promou l'efecte contrari (Figura 11). Els factors que actuen sobre l'equilibri entre aquestes dues vies poden determinar que el consum de cocaïna augmenti progressivament i es desenvolupi la dependència (Im *et al.*, 2010).

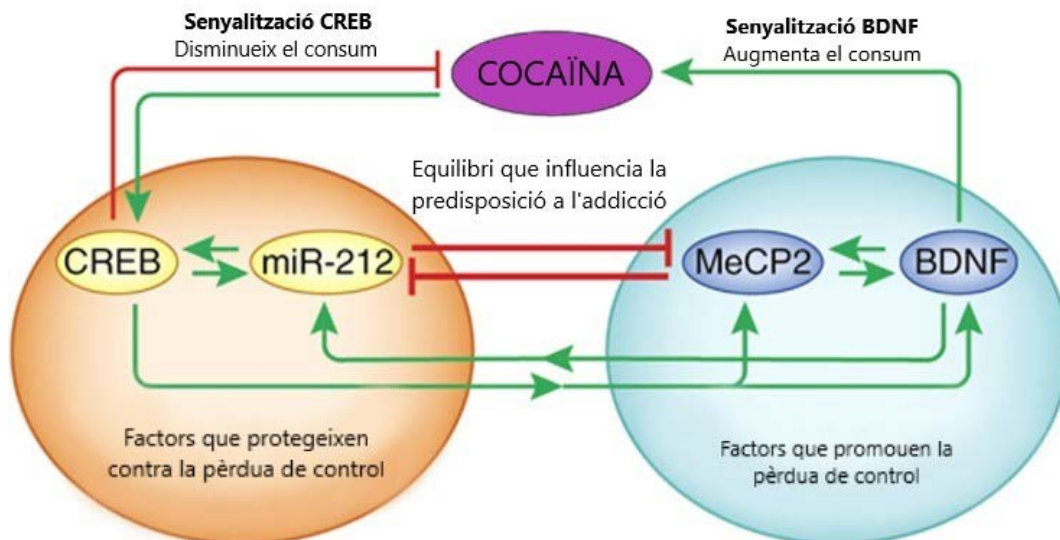


Figura 11. Esquema de les complexes interaccions entre miR-212, CREB, MeCP2 i BDNF. El cercle taronja representa senyals protectores contra l'increment progressiu del consum de cocaïna, mentre que el cercle blau representa senyals MeCP2-BDNF que el promouen. Les fletxes verdes indiquen una regulació activadora mentre que les vermelles indiquen inhibició. La cocaïna activa tant la senyalització CREB com la MeCP2-BDNF, i l'equilibri entre les dues vies, coordinat per miR-212, regula el consum de cocaïna i té un paper important en el desenvolupament de l'addicció. Adaptada de Jonkman i Kenny, 2013.

D'altra banda, també s'han fet estudis a gran escala per veure com afecta l'exposició crònica a cocaïna a l'expressió dels miRNAs. A les densitats post-sinàptiques (complexes proteics situats a les terminals post-sinàptiques, PSD, Boeckers, 2006) de l'estriat, es va veure que més d'una dotzena de miRNAs estaven significativament alterats, la majoria dels quals formaven part de quatre famílies (miR-8, miR-7, miR-142 i Let-7), tot suggerint que la cocaïna actua sobre l'expressió de miRNAs similars que comparteixen dianes (Eipper-Mains *et al.*, 2011). En un estudi posterior dels mateixos autors es van comparar bioinformàticament els resultats obtinguts en un estudi previ de mRNA-seq de PSD (Suzuki *et al.*, 2007) amb els 16 miRNAs més desregulats per cocaïna (Eipper-Mains *et al.*, 2011), per identificar possibles dianes d'aquests miRNAs (Eipper-Mains, Eipper i Mains, 2012). Aquest estudi va revelar que aquests miRNAs podrien regular gens implicats en adhesions cèl·lula-cèl·lula i matriu extracel·lular com *Mtdh*, *Pcdh8* i *Pch12*. En un altre estudi similar es van analitzar mostres del compartiment sinaptodendrític del NAc i es van detectar augments d'expressió de 9 miRNAs i disminució de 7, entre els quals trobem el miR-181a, encarregat de regular la subunitat *GluA2* del receptor AMPA de glutamat, implicat en la neuroadaptació induïda per la cocaïna (Saba *et al.*, 2012). Finalment, un altre estudi va analitzar el perfil d'expressió dels miRNAs a l'hipocamp al llarg del procés d'adquisició (34

miRNAs diferencialment expressats) i extinció de CPP (42 miRNAs) induït per cocaïna (Chen, Liu i Guan, 2013). Entre ells destaquen el miR-134, específic de cervell, que controla la mida de les espines sinàptiques a través de la regulació de la síntesi de la proteïna Limk1 (Schratt *et al.*, 2006).

6.4 Factors genètics de susceptibilitat a la dependència de cocaïna

La dependència de drogues és una malaltia complexa i multifactorial, on juguen un paper important factors ambientals i genètics, que interactuen entre ells. Com s'ha descrit abans en aquest treball, molt freqüentment els individus dependents de drogues ho són per més d'una substància a la vegada, i això podria ser degut al fet que part de la base genètica i ambiental de totes les dependències és comuna (Xian *et al.*, 2008; Ozburn, Janowsky i Crabbe, 2015; Palmer *et al.*, 2015). Aquest substrat genètic compartit se sumaria als factors de risc específics de cada substància.

6.4.1 Heretabilitat de la dependència de drogues

Tot i que els factors ambientals que participen en l'establiment de la dependència són fàcilment identificables i tenen un paper molt important, estudis familiars i de bessons mostren evidències de l'existència d'una forta component genètica. L'heretabilitat és la proporció de la variació fenotípica atribuïble a la variació genètica, i es pot estimar mitjançant estudis de parelles de bessons o estudis familiars d'adopcions. Les addiccions estan entre els trastorns psiquiàtrics que presenten una major heretabilitat, des del 39% en el cas dels al·lucinògens fins al 72% per a la cocaïna (Kendler i Prescott, 1998; Kendler *et al.*, 2000; Goldman, Oroszi i Ducci, 2005). D'altra banda, s'ha vist que el risc de desenvolupar dependència de cocaïna, opiàcis, cànnabis i/o alcohol en familiars de primer grau de pacients dependents d'aquestes drogues és, de mitjana, 8 vegades superior que en familiars d'individus control. En el cas concret de la cocaïna el risc relatiu és 4,4 vegades superior que el dels individus control (Merikangas *et al.*, 1998). A més, hi ha evidències d'agregació familiar quant a la droga d'abús predominant, tot recolzant la idea que hi ha factors genètics de risc específics de cada substància, així com factors de risc comuns per a totes les drogues.

6.4.2 Estudis d'associació genètica

Els estudis d'associació de tipus cas-control són una de les metodologies més emprades per a la identificació de factors genètics de susceptibilitat a les malalties complexes, com la dependència de cocaïna. Es tracta de mètodes no paramètrics basats en la comparació, mitjançant taules de contingència, de les freqüències genotípiques o al·lèliques d'un determinat marcador entre un grup d'individus afectats i un grup de controls. En funció de la naturalesa de la mostra control distingim entre dos tipus d'estudis d'associació:

- Poblacionals, en què la mostra control consisteix en individus no relacionats amb els casos. Són els més utilitzats fins ara en el cas de la dependència de cocaïna.
- Familiars, en què normalment s'utilitzen famílies amb un únic fill afectat, i on la mostra control consisteix en els al·lels no transmesos dels progenitors.

La major part dels estudis d'associació realitzats fins ara en la dependència de cocaïna se centren en variants genètiques comunes (polimorfismes) que estan presents a la població general, però que tenen una freqüència superior en els individus afectats. Per tant, la hipòtesi "malaltia comuna-variant comuna" o "*common disease-common variant (CDCV)*" s'imposa en els primers treballs. No obstant això, amb l'adveniment de les tecnologies de seqüenciació massiva, s'estan començant a considerar també variants poc comunes o rares en moltes malalties complexes, per tal de contrastar la hipòtesi "malaltia comuna-variant rara" o "*common disease-rare variant (CDRV)*", segons la qual les variants genètiques poc freqüents també podrien contribuir a l'etiologia de les malalties freqüents, probablement amb efectes més penetrants sobre el fenotip.

D'altra banda, els estudis d'associació en la dependència de cocaïna se centren sobretot en canvis d'un únic nucleòtid o *single-nucleotide polymorphisms (SNPs)*, perquè són els més freqüents al genoma i probablement també per la facilitat tècnica de la seva genotipació. No obstant això, hi ha molts altres tipus de variants, com microsatèl·lits, insercions i delecions, número variable de repeticions en tàndem (*Variable Number of Tandem Repeats, VNTR*) o variats de número de còpies (*Copy Number Variation, CNV*), que també han estat i són objecte d'estudi (Schork *et al.*, 2009).

Fins ara els estudis d'associació han utilitzat dos tipus d'aproximacions: i) Anàlisi de gens candidats o de sistemes gènics candidats basats en evidències prèvies; ii) Estudis a escala genòmica (*Genomewide Association Studies, GWAS*) que analitzen polimorfismes que cobreixen tot el genoma.

6.4.2.1 Estudis de gens i sistemes candidats

La selecció de gens candidats pels estudis d'associació es basa en resultats previs d'estudis farmacològics, d'expressió, de neuroimatge, estudis realitzats en animals genoanul·lats o transgènics o, fins i tot, en deduccions derivades del fenotip. D'entre els gens candidats estudiats en relació a la dependència de cocaïna hi ha gens dels sistemes de neurotransmissió sobre els quals actua la cocaïna (dopaminèrgic, serotoninèrgic, opioide, endocannabinoide, etc), gens que codifiquen proteïnes implicades en la síntesi i degradació d'aquests neurotransmissors, neuropeptids o factors neurotròfics, entre d'altres.

Com s'ha descrit anteriorment, en els individus dependents de drogues és molt freqüent l'ús de més d'una substància a la vegada, amb la qual cosa és difícil tenir poblacions de casos homogènies en les quals els individus siguin dependents d'una sola droga d'abús. Per això, alguns estudis consideren tots els individus dependents d'alguna droga conjuntament com a grup cas sota el nom de dependència de drogues (*substance dependence, SD*), incloent-hi individus dependents d'alcohol, cocaïna, cànnabis i opiacis (Taula 9) (Comings *et al.*, 1994; Persico *et al.*, 1996; Lachman, 1997; Kranzler *et al.*, 1998; Vandenberg *et al.*, 2000; Blomqvist, Gelernter i Kranzler, 2000; Hoehe *et al.*, 2000; Covault, Gelernter i Kranzler, 2001; Luo *et al.*, 2005, 2006, 2003; Agrawal *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006, 2008; Herman *et al.*, 2006; Xuei *et al.*, 2007; Al-Eitan *et al.*, 2014).

Taula 9. Estudis de gens candidats realitzats en individus dependents de múltiples drogues.

Gen/via estudiada	Associació significativa	Tipus d'estudi	Mostra	Dependències incloses	Referència
<i>D2A1</i>	sí	Cas/control	104ca - 763co	OH i altres	Comings, 1994
<i>DRD2</i>	no	Cas/control	409ca - 119co	COCA, OPI, AMF, altres	Persico, 1996
<i>COMT</i>	sí	Cas/control	226ca - 124co	OH, CNN, TB, altres	Vandenberg, 1997
<i>OPRM1</i>	sí (EA)	Cas/control	EA: 236ca - 84co AA: 74ca - 34co	OH, COCA i OPI	Kranzler, 1998
<i>DRD2</i>	no	Trios	85 casos	OH, OPI, COCA	Blomqvist, 2000
<i>OPRM1</i>	sí	Cas/control	51ca - 158co	COCA, OPI i altres	Hoehe, 2000
<i>DRD3 i DRD4</i>	no	Cas/control	184ca - 122co	OH, CNN, TB, altres	Vandenberg, 2000
<i>CNR1</i>	no	Cas/control	EA: 330ca - 226co AA: 232ca - 98co	OH, OPI, COCA	Covault, 2001
<i>OPRM1</i>	sí (EA)	Cas/control	EA: 318 ca- 179co AA: 124ca - 55co	OH, COCA i OPI	Luo, 2003
<i>CHRM2</i>	sí	Cas/control	346ca -333co	OPI, COCA	Luo, 2005
<i>GABAA</i>	sí	Familiar	2.282 de 262 famílies	OH, CNN, COCA, altres	Agrawal, 2006
<i>CNR1</i>	no	Cas/control	EA: 615ca - 388co AA: 280ca - 84co	OH, OPI, COCA	Herman, 2006
<i>ADH4</i>	sí	Cas/control	EA: 207ca - 317co AA: 149ca - 48co	OPI, COCA	Luo, 2006
<i>OPRM1</i>	sí	Cas/control	382ca - 338co	OH, OPI, COCA	Zhang, 2006
Sistema opioide	no	familiar	1.923 de 219 famílies (508ca)	CNN, COCA, OPI i altres	Xuei, 2007
<i>OPRD1 i OPRK1</i>	sí	Cas/control	620ca - 443co	OH, COCA,OPI	Zhang, 2008
<i>SLC6A4</i>	sí	Cas/control	192ca - 230co	OPI,CNN,OH, COCA	Al-Eitan, 2014

EA: Americans d'origen europeu; AA: Americans d'origen africà; ca= casos; co= controls; CNN: Cànnabis; COCA: Cocaïna; OH= Alcohol; OPI: Opiacis.

Tot i que per a l'anàlisi de la base genètica específica de la dependència de cocaïna l'ideal seria utilitzar individus que fossin només dependents d'aquesta droga, aquesta situació és molt poc freqüent a la població. Per això, en aquests estudis s'agrupen individus que tenen com a dependència principal la

cocaïna, tot i que també poden presentar altres dependències, i s'utilitzen com una població homogènia (Taula 10) (Noble *et al.*, 1993; Freimer *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002; Patkar *et al.*, 2002; Messas *et al.*, 2005; Dahl *et al.*, 2006; Lohoff *et al.*, 2008; Lohoff *et al.*, 2008b; Wetherill *et al.*, 2008; Foroud *et al.*, 2008; Gruzca *et al.*, 2008; Zuo *et al.*, 2009; Lohoff *et al.*, 2010; Sherva *et al.*, 2010; Fernández-Castillo *et al.*, 2010, 2012; Ambrose-Lanci *et al.*, 2012; Multani *et al.*, 2012; Clarke *et al.*, 2012, 2013; Fernández-Castillo *et al.*, 2013; Tristán-Noguero *et al.*, 2013; Yang i Li, 2014).

Taula 10. Estudis de gens candidats realitzats en individus dependents de cocaïna.

Gen/via estudiada	Associació significativa	Tipus d'estudi	Mostra	Referència
<i>DRD2</i>	sí	Cas/control	53ca - 265co	Noble, 1993
<i>DRD3</i>	no	Cas/control	62ca - 61co	Freimer, 1996
<i>PDYN</i>	sí	Cas/control	61ca - 91co	Chen, 2002
<i>5-HTT</i>	no	Cas/control	156ca - 82co	Patkar, 2002
<i>DRD2 i DRD3</i>	sí	Cas/control	730ca - 782co	Messas, 2005
<i>TPH2</i>	sí	Cas/control	299ca - 208co	Dahl, 2006
<i>NK3R</i>	sí	Familiar	219 famílies	Foroud, 2008
<i>CHRNA5</i>	sí	Cas/control	260ca - 244co	Gruzca, 2008
<i>COMT</i>	sí	Cas/control	330ca - 255co	Lohoff, 2008
<i>CARTPT</i>	sí	Cas/control	348ca - 256co	Lohoff, 2008
<i>NPY</i>	sí	Familiar	1.923 de 219 famílies (302ca)	Wetherill, 2008
<i>CNR1</i>	sí (EA)	Familiar	EA: 734 de 307 famílies (551ca) AA: 834 de 299 famílies (664ca)	Zou, 2009
<i>DAT, DBH i DRD2</i>	sí (EA)	Cas/control	EA:175ca - 403co AA:136ca - 48co	Fernández-Castillo, 2010
<i>DRD2 i DAT</i>	sí	Cas/control	347ca - 257co	Lohoff, 2010
<i>CHRNA5, CHRNA3 i CHRN4</i>	sí	Cas/control	3.533ca - 1.483co	Sherva, 2010
Alliberament de neurotransmissors	sí	Cas/control	360ca - 260co	Fernández-Castillo, 2012
<i>ARRB2</i>	no	Cas/control	336ca - 656co	Ambrose-Lanci, 2012
<i>PDYN</i>	no	Cas/control	EA: 336ca - 656co AA:1.248ca- 674co	Clarke, 2012
<i>DRIPs</i>	sí	Cas/control	796ca - 416co	Multani, 2012
<i>CNR1</i>	sí	Cas/control	860ca-334co	Clarke, 2013
Sistema serotoninèrgic i dopaminèrgic	sí	Cas/control	432ca - 482co	Fernández-Castillo, 2013
<i>5-HTT</i>	no	Cas/control	504ca - 508co	Tristán-Noguero, 2013
<i>HTR3A/B</i>	sí (EA)	Cas/control	EA:454ca-1018co AA:458ca - 397co	Yang, 2014

EA: Americans d'origen europeu; AA: Americans d'origen africà; ca= casos; co= controls.

Tot i que s'han publicat un gran nombre d'estudis dirigits a gens candidats tant en SD com en dependència de cocaïna, la majoria d'associacions identificades són nominals i en molts pocs casos s'han pogut replicar els resultats obtinguts. Això podria ser degut a diferències en el disseny o a una mida mostral insuficient per detectar associacions. En el cas de la dependència de cocaïna, tant sols dos SNPs s'han trobat associats de forma significativa a la patologia en diversos estudis: rs16969968 al gen *CHRNA5* (associat en tres estudis independents, p-valor combinat = $7,64 \times 10^{-05}$) i rs806368 al gen *CNR1* (associat en dos estudis independents, p-valor combinat = $6,49 \times 10^{-03}$).

El sistema nicotínic juga un paper molt important en l'addicció a nicotina, ja que aquesta actua directament unint-se als receptors d'ACh (Bühler *et al.*, 2015). A més, diversos estudis han detectat associacions positives entre receptors d'aquest sistema i la dependència de cocaïna (Williams i Adinoff, 2008). El SNP rs16969968 del gen *CHRNA5* (receptor colinèrgic nicotínic alfa 5) es va associar a la dependència de cocaïna per primera vegada en una mostra d'individus americans d'origen europeu (EA) i d'americans d'origen africà (AA) (Saccone *et al.*, 2008). Un segon estudi va replicar aquesta associació en dues mostres independents d'individus dependents de cocaïna d'ascendència europea (Grucza *et al.*, 2008). El polimorfisme rs16969968:G > A produeix un canvi d'aminoàcid (D398N) que dóna lloc a una hipofuncionalitat del receptor nicotínic (Kuryatov, Berrettini i Lindstrom, 2011). Curiosament, l'al·lel minoritari A, que està associat a un increment del risc de desenvolupar dependència de nicotina (Saccone *et al.*, 2007; Berrettini *et al.*, 2008; Bierut *et al.*, 2008; Thorgeirsson *et al.*, 2008), sembla que tindria un paper protector de la dependència de cocaïna (Grucza *et al.*, 2008; Sherva *et al.*, 2010; Sadler *et al.*, 2014).

El sistema endocanabinoide participa en molts processos cognitius i fisiològics importants com l'aprenentatge, la memòria, la coordinació motora, així com en processos de recompensa i control emocional (Ameri, 1999; López-Moreno, Echeverry-Alzate i Bühler, 2012). El SNP rs806368 del gen *CNR1* (receptor d'endocannabinoides 1) s'ha trobat associat a la dependència de cocaïna en dos estudis independents. El primer estudi mostrava associació significativa en dues mostres d'individus EA (cas-control i estudi familiar, Taula 10), però en el cas de la mostra AA només donava resultats significatius l'estudi cas-control, el familiar no (Zuo *et al.*, 2009). Posteriorment, un altre estudi va replicar aquests resultats en una mostra d'individus AA, tot i que la meta-anàlisi d'individus AA dels dos estudis no era significativa (Clarke *et al.*, 2013). Aquest SNP estaria localitzat en una regió conservada del gen *CNR1* que podria afectar l'estabilitat del mRNA, alterant els nivells d'expressió d'aquest receptor i contribuint així a l'establiment de la dependència (Clarke *et al.*, 2013).

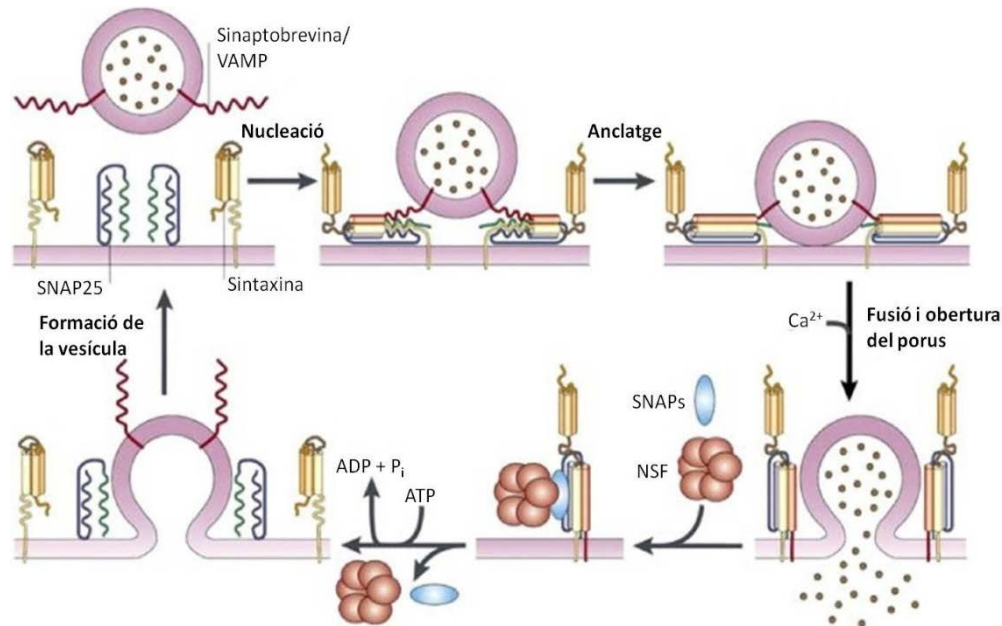


Figura 12. Representació esquemàtica de les proteïnes del complex SNARE i el seu paper en el control de l'alliberament de neurotransmissors. Les vesícules carregades de neurotransmissors estan preparades a la neurona presinàptica, i la proteïna n-Sec1 manté inactiva la sintaxina. La proteïna Rab podria facilitar la dissociació de n-Sec de la sintaxina, tot facilitant la unió entre les tres SNARE neuronals: sinatxina, SNAP-25 i VAMP. El Ca^{2+} permet la unió completa de les cadenes del complex, que dóna lloc a la fusió de les membranes i l'alliberament del contingut de la vesícula. Després de la fusió es recluten les proteïnes α -SNAP i NSF del citoplasma i, mitjançant la hidròlisi de ATP per part del NSF, es produeix la dissociació del complex SNARE. Les proteïnes SNARE tornen a estar disponibles per a un nou cicle d'exocitosi. Adaptada de Chen i Scheller, 2001; Hussain i Davanger, 2011.

Tot i que la majoria d'estudis d'associació se centren en el paper dels SNPs, no són l'única font de variació del genoma. Alguns estudis han analitzat el paper dels CNVs en la dependència d'alcohol (Bae *et al.*, 2012; Boutte *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Ulloa *et al.*, 2014; Sulovari *et al.*, 2017) i d'opiacis (Li *et al.*, 2015), però cap en la dependència de cocaïna. En aquest treball s'ha analitzat la contribució a la dependència de cocaïna d'un CNV situat al gen *NSF*, implicat en la regulació de l'alliberació de vesícules de neurotransmissió. Les proteïnes del complex SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein Receptor*) són les encarregades de fusionar les vesícules de neurotransmissors amb la membrana presinàptica, en resposta a la despolarització de la membrana, produint-se l'alliberament dels neurotransmissors a l'espai sinàptic. La proteïna NSF s'encarrega de reciclar les proteïnes SNARE un cop s'ha produït la fusió de les vesícules amb la membrana, de forma que tornen a estar disponibles per un nou cicle d'alliberament de neurotransmissors (Figura 12) (Barszczewski *et al.*, 2008; Baker i Hughson, 2016). En un treball anterior al grup, es va identificar un SNP (rs183211) al gen *NSF* significativament associat a la dependència de cocaïna que, a més, formava part d'un haplotip de risc (rs183211G-rs1769817T) associat al desenvolupament ràpid de la dependència (Fernández-Castillo *et al.*, 2012).

6.4.2.2 Estudis d'associació a escala genòmica

També s'han realitzat GWAS d'abús o dependència de cocaïna. Aquests estudis no es basen en coneixements previs sinó que exploren variants genètiques que cobreixen tot el genoma, de forma que els resultats no presenten biaixos. El problema principal d'aquest enfocament és que l'elevat número de tests que es duen a terme fa necessària una mostra molt més gran per assolir prou poder estadístic en la detecció de les associacions.

Fins ara només s'ha realitzat un GWAS amb pacients dependents de cocaïna (Gelernter *et al.*, 2014). Es van analitzar 5.697 individus, dels quals eren casos 2.482 individus AA i 1.809 EA, i controls 186 AA i 292 EA individus que havien provat la cocaïna, com a mínim un cop a la seva vida, sense desenvolupar la dependència. En la metanàlisi de les dues mostres no es va detectar cap associació entre la patologia i variants genètiques que arribés a la significació estadística després d'aplicar correccions per tests múltiples, tot i que alguna mostrava alguna tendència. Posteriorment es va realitzar una altra aproximació per eliminar l'efecte de les altres drogues d'abús i facilitar així la identificació de factors de risc genètic deguts únicament a la dependència de cocaïna. Amb aquesta nova estratègia es va identificar una variant significativament associada al fenotip situada al gen *FAM53B* (rs2629540; Taula 11). Tot i que la funció d'aquest gen en humans no està ben definida, s'ha descrit que el seu homòleg en peix (*simplet*) participa en la proliferació cel·lular (Thermes, 2006) i l'extensió dels axons en el desenvolupament (Aoki *et al.*, 2014).

Taula 11. Associacions significatives identificades en GWAS de dependència de cocaïna o de múltiples drogues. Adaptat de Jensen, 2016.

Variant associada	P-valor	Gen proper	Mostra	P-valor rèplica	Referència
Dependència de cocaïna					
rs2629540	$4,28 \times 10^{-8}$	<i>FAM53B</i>	2.668 AA, 2.101 EA		Gelernter, 2014
Dependència de múltiples substàncies					
rs1868152	$4,9 \times 10^{-8}$	<i>CRYGS</i>	7.188 EA	-	McGue, 2013
rs9829896	$4,63 \times 10^{-8}$	<i>KAT2B</i>	3.742 AA	$1,9 \times 10^{-3}$	Johnson, 2016
rs2952621	$1,8 \times 10^{-8}$	<i>LOC151121</i>	2.322 EA	0.02	Wetherill, 2015
rs2567261	$3,8 \times 10^{-8}$	<i>ARHGAP28</i>		0.29	

EA= americans d'origen europeu; AA= americans d'origen africà

De la mateixa forma que els estudis de gens candidats, alguns GWAS consideren tots els individus dependents d'alguna droga conjuntament com a grup cas (Taula 11). McGue i col·laboradors van realitzar un GWAS amb una mostra de 7.188 individus i van detectar una associació entre la variant rs1868152, pròxima al gen *CRYGS*, i l'ús de drogues il·lícites (McGue *et al.*, 2013). D'altra banda, Wetherill i col·laboradors van realitzar un estudi d'associació familiar de 2.322 individus de 118 famílies

diferents. Els individus afectats estaven diagnosticats per, com a mínim, una de les quatre substàncies de l'estudi (alcohol, cànnabis, cocaïna i opiacis). En aquest estudi van detectar dues associacions significatives: rs2952621 (pròxima al gen *LOC151121*) i rs2567261 (al gen *ARHGAP28*). Ambdues es van avaluar en una mostra independent, però només la primera es va poder replicar (Wetherill *et al.*, 2015). Finalment, Johnson i col·laboradors van realitzar un estudi amb individus que presentaven dependències a múltiples substàncies, tot i que la majoria eren dependents d'opiacis (>60%) i de cocaïna (>25%). A la mostra de descoberta van detectar una variant associada (rs9829896) situada al gen *KAT2B*, que fou replicada en una mostra independent (Johnson *et al.*, 2016). A més, en aquest mateix estudi van constatar que la variació genètica associada presentava correlació amb els nivells d'expressió del gen *KAT2B* en mostres de cervell *post-mortem*.

OBJECTIUS

Aquesta Tesi té com a objectiu principal contribuir a la identificació de gens de susceptibilitat a la dependència de drogues, i més específicament a la dependència de cocaïna, tant en humans com en models animals. També ens proposem aprofundir en l'estudi de les alteracions en l'expressió gènica induïdes pel seu consum.

Els objectius concrets d'aquest treball són els següents:

CAPÍTOL 1. Estudi de la possible associació entre una variant de nombre de còpies (CNV) al gen *NSF* i la dependència de cocaïna.

- 1.1. Avaluació de l'associació entre el CNV i la dependència de cocaïna mitjançant un estudi d'associació cas-control poblacional en dues etapes (mostra de descoberta i rèplica).
- 1.2. Avaluació de l'efecte funcional d'aquesta variant sobre l'expressió del gen *NSF*.

CAPÍTOL 2. Contribució del gen *PLCB1* a la dependència de drogues en general, i a la cocaïna en particular.

- 2.1. Identificació de variants genètiques de risc a la dependència de cocaïna situades al lloc d'unió de microRNAs, mitjançant un estudi d'associació cas-control poblacional en dues etapes.
- 2.2. Avaluació funcional de les variants identificades en l'objectiu anterior, situades al gen *PLCB1*, mitjançant un assaig amb gen reporter.
- 2.3. Exploració dels nivells d'expressió del gen *PLCB1* en dades de cervell *post-mortem* d'individus amb abús de cocaïna i en cèl·lules en cultiu tractades amb cocaïna.
- 2.4. Determinació de la contribució del gen *PLCB1* a la dependència de cocaïna mitjançant un model animal genoanul·lat.

CAPÍTOL 3. Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS) amb la dependència de cocaïna.

- 3.1. Realització d'un estudi de rèplica d'associacions a la dependència de drogues i de cocaïna prèviament identificades en diversos GWAS.
- 3.2. Estudi de variants de susceptibilitat a la dependència de cocaïna mitjançant la realització d'una metanàlisi a partir de dades GWAS disponibles al repositori de base dbGaP.
- 3.3. Avaluació de la correlació genètica entre la dependència de cocaïna i diverses condicions comòrbides emprant les dades GWAS obtingudes en l'objectiu anterior.

CAPÍTOL 4. Efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica: estudis en models neuronals en cultiu i en mostres de cervell *post-mortem* humanes.

- 4.1. Anàlisi de l'efecte de la cocaïna en neurones dopaminèrgiques en cultiu a nivell d'expressió gènica i activitat neuronal.
- 4.2. Determinació de la possible contribució a la dependència de cocaïna de variants potencialment funcionals en alguns dels gens prèviament identificats (objectiu 4.1), mitjançant un estudi d'associació cas-control poblacional.
- 4.3. Anàlisi de l'efecte de la cocaïna sobre l'expressió de microRNAs que són potencials reguladors dels gens identificats prèviament (objectiu 4.1).
- 4.4. Avaluació de la contribució a la dependència de cocaïna dels gens que codifiquen pels microRNAs identificats al punt anterior mitjançant un estudi d'associació cas-control poblacional (objectiu 4.3)
- 4.5. Identificació de gens i vies comunes en estudis realitzats en neurones en cultius tractades amb cocaïna (objectiu 4.1) i en mostres de cervell *post-mortem* d'individus amb abús de cocaïna.

RESULTATS

INFORME DELS DIRECTORS DE TESI SOBRE LA CONTRIBUCIÓ DEL DOCTORANDA A LES PUBLICACIONS D'AQUESTA TESI DOCTORAL

Títol de la Tesi: “Genètica i dependència de cocaïna: estudis d'associació, transcriptòmica i models animals”.

Autor: Judit Cabana Domínguez

Directors: Dr. Bru Cormand i Rifà, Dra. Noèlia Fernández Castillo

CAPÍTOL 1: Estudi de la possible associació entre una variant de nombre de còpies (CNV) al gen *NSF* i la dependència de cocaïna.

Article 1

Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Lara Grau-López, Laia Rodríguez-Cintas, Carmen Barral, Alfonso C. Abad, Galina Erikson, Nathan E. Wineinger, Bàrbara Torrico, Concepció Arenas, Miquel Casas, Marta Ribasés, Bru Cormand, Noèlia Fernández-Castillo. *A highly polymorphic copy number variant in the NSF gene is associated with cocaine dependence*. Scientific Reports 2016; 6:31033. doi: 10.1038/srep21033

Índex de qualitat: IF₂₀₁₆: 4,259. 1r quartil de la categoria MULTIDISCIPLINARY SCIENCES.

Aportació de l'autora a l'article: Participació en l'extracció de mostres de DNA genòmic de casos i controls. Disseny de l'assaig de genotipació i delimitació del CNV del gen *NSF*, genotipació manual de les mostres i realització de l'estudi d'associació. Extracció de DNA i RNA de controls, genotipació i quantificació dels nivells d'expressió dels transcrits del gen *NSF* i anàlisi estadística dels resultats. Redacció del primer esborrany del manuscrit, figures i taules, i participació en l'edició final.

CAPÍTOL 2: Contribució del gen *PLCB1* a la dependència de drogues en general, i a la cocaïna en particular.

Article 2

Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Laura Pineda-Cirera, R. Felipe Palma-Álvarez, Elena Ros-Cucurull, Lara Grau-López, Abderaman Esojo, Miquel Casas, Concepció Arenas, Josep Antoni Ramos-

Resultats

Quiroga, Marta Ribasés, Noèlia Fernández-Castillo, Bru Cormand. *Association of the PLCB1 gene with drug dependence*. Scientific Reports 2017; 7:10110. doi: 10.1038/s41598-017-10207-2.

Índex de qualitat: IF₂₀₁₆: 4,259. 1r quartil de la categoria MULTIDISCIPLINARY SCIENCES.

Aportació de l'autora a l'article: Participació en l'extracció de mostres de DNA genòmic de casos i controls. Preparació de les mostres per genotipar, selecció dels SNPs i estudi d'associació cas-control. Priorització dels miRNAs a validar, realització dels clonatges, validació funcional de l'impacte dels SNPs sobre la unió dels miRNAs i anàlisi estadística dels resultats. Validació dels nivells d'expressió del gen *PLCB1*. Redacció del primer esborrany del manuscrit, figures i taules, i participació en l'edició final.

CAPÍTOL 3: Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS) amb la dependència de cocaïna.

Article 3

Autors: Laura Pineda-Cirera, Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Monica Cozar, Lara Grau-Lopez, Alfons C. Abad, Nieves Martínez-Luna, María Robles-Martínez, Cristina Sánchez-Mora, Josep Antoni Ramos-Quiroga, Miquel Casas, Marta Ribasés, Noèlia Fernández-Castillo, Bru Cormand. *Evaluation of previous substance dependence GWAS findings in a Spanish sample*. Drug and Alcohol Dependence 2018; (187) 358-362. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.03.013.

Índex de qualitat: IF₂₀₁₆: 3,222. 1r quartil de la categoria SUBSTANCE ABUSE.

Aportació de l'autora a l'article: Participació en l'extracció de mostres de DNA genòmic de casos i controls, en la preparació de les mostres per genotipar i en la realització de la metanàlisi. Participació en l'edició final del manuscrit.

Article 4

Judit Cabana-Domínguez, Anu Shivalikanjli, Noèlia Fernández-Castillo, Bru Cormand. *Genome-wide association meta-analysis of cocaine dependence: shared genetics with comorbid conditions*. Neuropsychopharmacology (sotmès).

Índex de qualitat: IF₂₀₁₆: 6,403. 1r quartil de les categories NEUROSCIENCES, PHARMACOLOGY & PHARMACY i PSYCHIATRY.

Aportació de l'autora a l'article: Participació en l'obtenció de permisos per accedir a les mostres del dbGaP. Realització de l'anàlisi bioinformàtica de les dades: controls de qualitat, imputació, estudi d'associació a escala genòmica i metanàlisi. Realització de les anàlisis secundàries de la metanàlisi: anotació de les variants i identificació de regions d'interés, estudi d'associació basat en gens (*gene-based analysis*) i en conjunts de gens (*gene-set analysis*), determinació de l'heretabilitat deguda a SNPs, anàlisi de correlació genètica i *Polygenic Risk Score* amb altres condicions comòrbides. Redacció del primer esborrany del manuscrit, figures i taules, i participació en l'edició final.

CAPÍTOL 4: Efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica: estudis en models neuronals en cultiu i mostres de cervell *post-mortem* humanes.

Article 5

Noèlia Fernández-Castillo, Judit Cabana-Domínguez, Jordi Soriano, Cristina Sánchez-Mora, Carlos Roncero, Lara Grau-López, Elena Ros-Cucurull, Constanza Daigre, Marjolein M.J. van Donkelaar, Barbara Franke, Miguel Casas, Marta Ribasés, Bru Cormand. *Transcriptomic and genetic studies identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence*. *Translational Psychiatry* 2015; 5,e667. doi:10.1038/tp.2015.158

Índex de qualitat: IF₂₀₁₅: 5,538. 1r quartil de la categoria PSYCHIATRY.

Aportació de l'autora a l'article: Priorització dels miRNAs a validar, realització dels clonatsges, validació funcional de l'impacte dels SNPs sobre la unió dels miRNAs en els dos models cel·lulars testats i anàlisi estadística dels resultats. Participació en la redacció del primer esborrany del manuscrit i en l'edició final.

Article 6

Judit Cabana-Domínguez, Concepció Arenas, Bru Cormand, Noèlia Fernández-Castillo. *Mir-9, miR-153 and miR-124 are down-regulated by cocaine in a dopaminergic cell model and contribute to cocaine dependence*. *Translational Psychiatry* (en revisió).

Índex de qualitat: IF₂₀₁₆: 4,743. 1r quartil de la categoria PSYCHIATRY.

Aportació de l'autora a l'article: Priorització dels miRNAs, realització del model cel·lular, determinació dels nivells d'expressió dels miRNAs i anàlisi estadística dels resultats. Anàlisi de xarxes gèniques.

Resultats

Realització de l'estudi d'associació cas-control. Redacció del primer esborrany del manuscrit, figures i taules, i participació en l'edició final.

Article 7

Noèlia Fernández-Castillo, Judit Cabana-Domínguez, Concepció Arenas, Alejandro Arias-Vàquez, Bru Cormand. *Common genes and pathways altered by cocaine in transcriptomic studies in humans*. The World Journal of Biological Psychiatry (sotmès).

Índex de qualitat: IF₂₀₁₆: 3,658. 2n quartil de la categoria PSYCHIATRY.

Aportació de l'autora a l'article: Participació en l'anàlisi bionfornàmica de les dades, en la redacció del primer esborrany del manuscrit i en l'edició final.

Barcelona, 19 de Juny de 2018

Signatura dels directors

Dr. Bru Cormand Rifà

Dra. Noèlia Fernández Castillo

CAPÍTOL 1: ESTUDI DE LA POSSIBLE ASSOCIACIÓ ENTRE UNA VARIANT DE NOMBRE DE CÒPIES (CNV) AL GEN *NSF* I LA DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA.

Article 1:

“Associació a la dependència de cocaïna d’una variant de nombre de còpies molt polimòrfica del gen *NSF*”.

Resum:

La dependència de cocaïna és un trastorn psiquiàtric complex que és el resultat de la interacció entre factors de risc genètics i ambientals. Diversos sistemes de neurotransmissió participen en els efectes produïts per la cocaïna, així com en l’establiment de la dependència i les recaigudes. Això fa que els components del sistema d’alliberació de neurotransmissors siguin bons candidats a contribuir al desenvolupament de l’addicció. En un estudi anterior del grup es va identificar un haplotip de risc associat a la dependència de cocaïna. Aquest haplotip està al gen *NSF*, que codifica el Factor Sensible a N-Etilmaleimida (*NSF*), essencial en el reciclatge de les vesícules de neurotransmissors. En aquest treball hem examinat la possible contribució a la dependència de cocaïna d’una variant de nombre de còpies (CNV) que engloba parcialment el gen *NSF*. Mitjançant un estudi d’associació cas-control en una mostra de 359 casos i 356 controls hem identificat una associació significativa entre la dependència de cocaïna i el CNV ($P = 0,013$). Aquesta associació s’ha confirmat en una mostra de rèplica independent (508 casos i 569 controls, $P = 7,1 \times 10^{-03}$) i en l’anàlisi conjunta de les dues mostres ($P = 1,8 \times 10^{-04}$), amb una sobre-representació dels individus amb baix número de còpies en el grup de casos. A més, la variant de risc del CNV (baix nombre de còpies) també està associada a l’aparició ràpida de la dependència (1 any o menys des del primer consum de cocaïna). A continuació hem estudiat l’impacte funcional d’aquest CNV sobre l’expressió del gen. En mostres de RNA de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) d’individus control, hem observat un augment dels nivells d’expressió de dos transcrits del gen en relació directa amb el nombre de còpies del CNV. Aquests resultats, juntament amb els obtinguts en l’estudi previ, donen suport a la idea que el gen *NSF* podria participar en la susceptibilitat a la dependència de cocaïna.

Referència:

Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Lara Grau-López, Laia Rodríguez-Cintas, Carmen Barral, Alfonso C. Abad, Galina Erikson, Nathan E. Wineinger, Bàrbara Torrico, Concepció Arenas, Miquel Casas, Marta Ribasés, Bru Cormand, Noèlia Fernández-Castillo. *A highly polymorphic copy number variant in the NSF gene is associated with cocaine dependence*. Scientific Reports 2016; 6:31033. doi: 10.1038/srep21033

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A Highly Polymorphic Copy Number Variant in the *NSF* Gene is Associated with Cocaine Dependence

Received: 08 April 2016
Accepted: 12 July 2016
Published: 08 August 2016

Judit Cabana-Domínguez^{1,2,3,4}, Carlos Roncero^{5,6,7,8}, Lara Grau-López^{5,6,7,8},
Laia Rodríguez-Cintas^{6,7}, Carmen Barral^{5,6,7,8}, Alfonso C. Abad^{5,6}, Galina Erikson⁹,
Nathan E. Wineinger⁹, Bàrbara Torrico^{1,2,3,4}, Concepció Arenas¹, Miquel Casas^{5,7,8},
Marta Ribasés^{5,8,10}, Bru Cormand^{1,2,3,4,*} & Noèlia Fernández-Castillo^{1,2,3,4,*}

Cocaine dependence is a complex psychiatric disorder involving both genetic and environmental factors. Several neurotransmitter systems mediate cocaine's effects, dependence and relapse, being the components of the neurotransmitter release machinery good candidates for the disorder. Previously, we identified a risk haplotype for cocaine dependence in the *NSF* gene, encoding the protein N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor essential for synaptic vesicle turnover. Here we examined the possible contribution to cocaine dependence of a large copy number variant (CNV) that encompasses part of the *NSF* gene. We performed a case-control association study in a discovery sample (359 cases and 356 controls) and identified an association between cocaine dependence and the CNV ($P = 0.013$), that was confirmed in the replication sample (508 cases and 569 controls, $P = 7.1e-03$) and in a pooled analysis ($P = 1.8e-04$), with an over-representation of low number of copies in cases. Subsequently, we studied the functional impact of the CNV on gene expression and found that the levels of *NSF* transcripts were significantly increased in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) along with the number of copies of the CNV. These results, together with a previous study from our group, support the role of *NSF* in the susceptibility to cocaine dependence.

Cocaine dependence is a complex psychiatric disorder that results from the interaction between genetic and environmental factors, with an estimated heritability of 65–79%^{1–3}. Cocaine inhibits dopamine, serotonin and norepinephrine reuptake by binding to their transporters (DAT1, SERT and NET, respectively), increasing their levels at the synaptic cleft^{4,5}. Also, other neurotransmitter pathways participate in cocaine dependence, withdrawal or relapse, including the glutamatergic, GABAergic and endocannabinoid systems^{6–12}. Their involvement in mediating cocaine effects and dependence makes the molecular machinery that controls neurotransmitter release to the synaptic cleft a strong candidate for participating in the development of cocaine dependence. As part of this complex process that involves many different proteins, the N-ethylmaleimide sensitive factor (*NSF*) plays an essential role in the synaptic vesicle turnover. *NSF* is responsible for the recycling of Soluble NSF Attachment

¹Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Spain. ³Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain. ⁴Institut de Recerca Pediàtrica Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues, Barcelona, Catalonia, Spain. ⁵Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain. ⁶Addiction and Dual Diagnosis Unit Clinic Vall Hebron, Psychiatric Services, Hospital Universitari Vall d'Hebron-ASPB, Barcelona, Catalonia, Spain. ⁷Psychiatric Department and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalonia, Spain. ⁸Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Spain. ⁹Scripps Translational Science Institute, La Jolla, CA, United States of America. ¹⁰Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.C. (email: bcormand@ub.edu) or N.F.-C. (email: noefernandez@ub.edu)

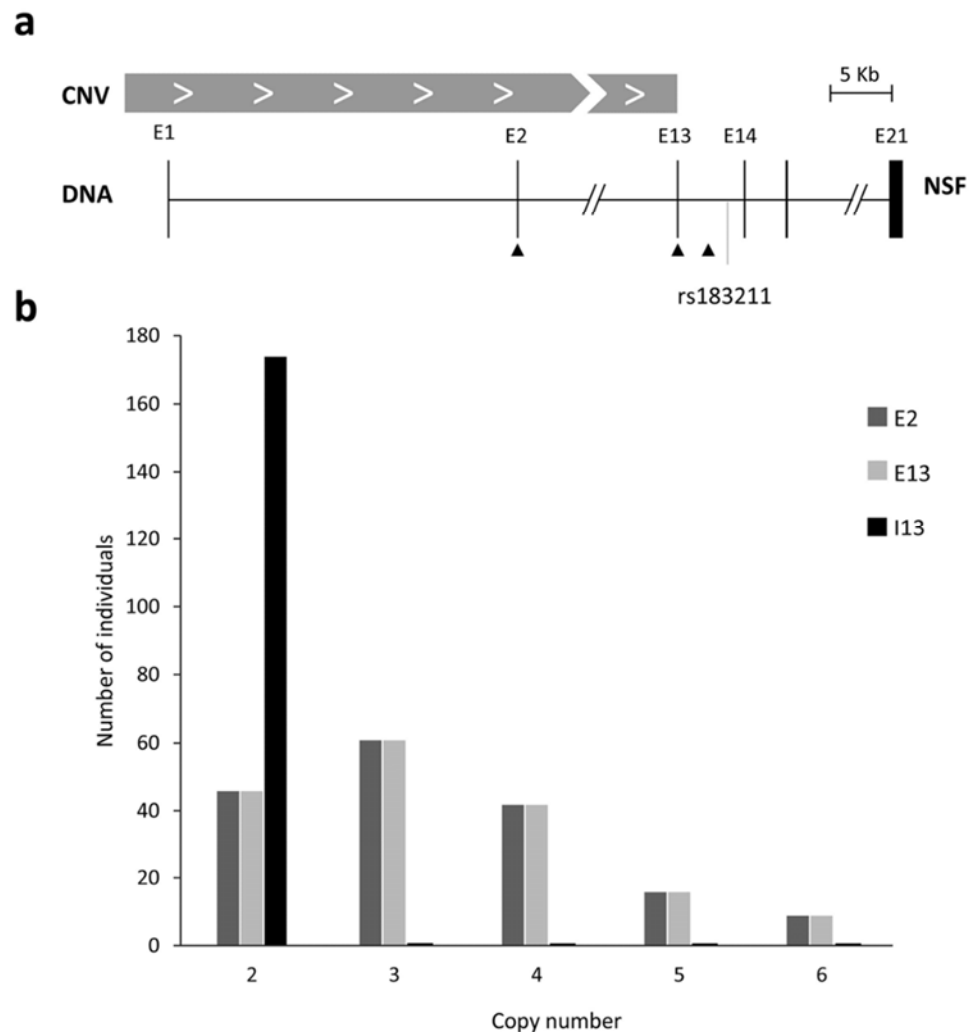


Figure 1. Delimitation of the CNV region. (a) Representation of the 3' end of the CNV spanning the *NSF* gene. The CNV is indicated with a grey box, exons with black boxes, and triangles show the position of primers used in qRT-PCR assays. The location of SNP rs183211 is indicated. (b) Number of individuals grouped by copies of the *NSF* CNV in exons 2 and 13 and in intron 13.

Protein Receptor (SNARE) complexes, preventing their accumulation and ensuring the maintenance of intracellular membrane trafficking¹³.

Previous genetic evidence supports the contribution of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *NSF* gene to cocaine addiction, where a two-SNPs risk haplotype was associated with a rapid development of cocaine dependence, shortly after the first cocaine use¹⁴. To date, association studies with SNPs have unraveled only a small fraction of the estimated heritability for cocaine dependence. Thus, exploring structural variation may help to capture part of the missing heritability underlying this complex disorder¹⁵. Interestingly, a large copy number variant (CNV) of about 734 kb encompasses the first 13 exons of the *NSF* gene (including two additional genes, *LRRC37A2* and *ARL17A*) and ranges from 2 to 6 copies per individual (1 to 3 haploid copies)¹⁶. In the European population, about 72% of individuals have more than two copies. This CNV is located immediately distal from the *MAPT* locus at 17q21.31, which was previously found to be subjected to positive selection and rapid evolutionary turnover, and associated with neurological disorders¹⁷.

Since CNVs are common forms of genetic variation that often impact gene expression and may have a greater effect on transcriptional regulation than that attributed to SNPs^{18–20}, we hypothesize that the CNV spanning *NSF* has an influence on the expression of the gene and may contribute to cocaine dependence. To our knowledge, association between CNVs and drug dependence has been explored mainly for alcohol or opioid dependence^{21–24}, but no study has investigated cocaine dependence so far. To address this issue, we explored the role of the CNV encompassing *NSF* in cocaine addiction through a two stage case-control association study with cocaine

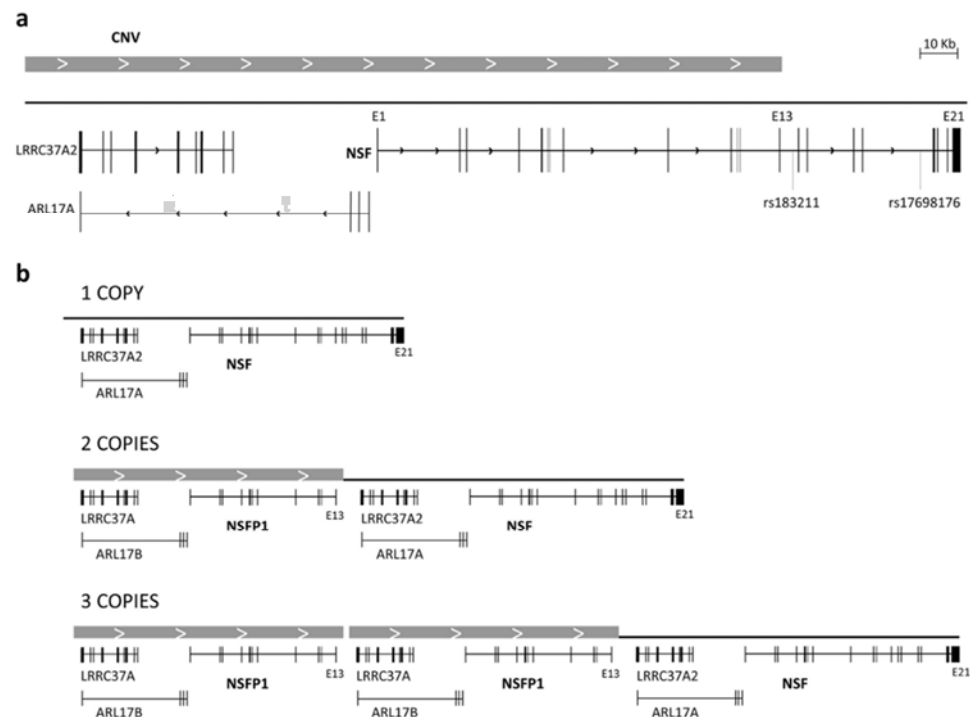


Figure 2. Schematic representation of the CNV region. (a) Representation of genes *NSF* (ENSG00000073969), *ARL17A* (ENSG00000185829) and *LRRC37A2* (ENSG00000238083). Exons are indicated with black boxes, CNV is indicated with a grey box. The location of the two SNPs previously associated with cocaine dependence is indicated. (b) Schema of genetic context of the three possible alleles of the CNV in this region: 1, 2 or 3 repeats.

Genotype	Discovery		Replication		Pooled analysis ¹	
	Controls N (%)	Cases N (%)	Controls N (%)	Cases N (%)	Controls N (%)	Cases N (%)
Low copy [*]	226 (63.5)	260 (72.4)	349 (61.3)	352 (69.3)	575 (62.2)	612 (70.6)
High copy ^{**}	130 (36.5)	99 (27.6)	220 (38.7)	156 (30.7)	350 (37.8)	255 (29.4)
SUM	356	359	569	508	925	867
p-value	0.01287		0.00713		0.00017	
(OR –95% CI)	1.51 [1.10–2.07] [*]		1.42 [1.10–1.83] [*]		1.46 [1.19–1.78] [*]	

Table 1. Association study of the CNV in the *NSF* gene in cocaine-dependent Spanish patients. In bold: significant p-values. ¹Discovery + replication samples. ^{*}Low copy genotype include genotypes 2 and 3. ^{**}High copy genotype include genotypes 4, 5 and 6. ^{*}When OR < 1, the inverted score is shown.

dependence. Subsequently, we studied the linkage disequilibrium (LD) between the previous associated SNPs and the CNV, as well as the impact of this CNV on *NSF* expression.

Results

A CNV encompassing part of the *NSF* gene was previously reported¹⁶. According to published data and information in the Ensembl database (www.ensembl.org), it spans the first 13 exons of the gene. We refined the distal end of the CNV in our population by amplifying two *NSF* regions by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), one in exon 13 and another one in intron 13 (Fig. 1a), and comparing the results with an internal CNV control in exon 2. All subjects were confirmed to bear only two copies of the DNA segment in intron 13, and a variable (and identical) number of copies in exons 13 and 2 (Fig. 1b), confirming that the CNV encompasses the first 13 exons of the gene in all 174 individuals assessed, ranging from 2 to 6 copies per diploid genome (Fig. 2).

In order to explore whether the *NSF* CNV was associated with cocaine dependence, we performed a case-control association study. The comparison of the number of copies of the CNV between 359 cocaine-dependent patients and 356 controls showed significant differences between groups ($P = 0.036$, Supplementary Table S1). When we subdivided subjects into 'low number of copies of the CNV' (2 and 3) and 'high number of copies' (4, 5 and 6), we identified a significant overrepresentation of low number of copies in

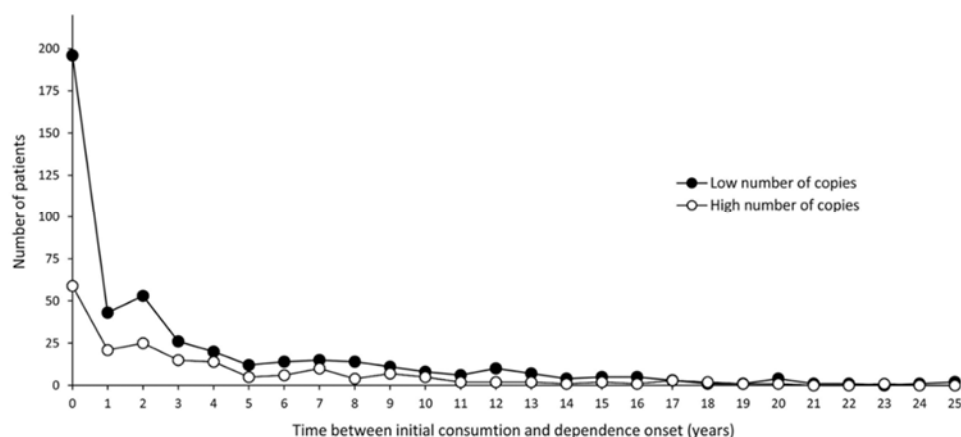


Figure 3. Time between initial consumption and onset of cocaine dependence (years) in individuals with low (2 or 3) and high (4, 5 or 6) number of copies of the NSF CNV.

		rs183211-rs17698176		
		CC	GT	AT
Copy number	1	0.0102	0.4984	0.0491
	2	0.0632	0.0449	0.2312
	3	0.0765	0.0046	0.0220

Table 2. Haplotype frequencies in the NSF gene, including SNPs and CNV.

cocaine-dependent patients (72% vs 63%; $P=0.013$; OR = 1.51, CI = [1.10–2.07]). This overrepresentation was replicated in an independent sample (69% vs 63%; $P=7.1e-03$; OR = 1.42, CI = [1.10–1.83]). The pooled analysis of both the discovery and replication samples also rendered statistically significant results (71% vs 62%; $P=1.8e-04$; OR = 1.459, CI = [1.20–1.78]), which remained significant after adjusting by age ($P_{adj}=3.1e-03$), with a higher frequency of subjects carrying 2 or 3 copies of the NSF CNV in the group of cocaine-dependent subjects when compared to controls (Table 1).

Then, we observed that individuals with low number of copies showed an earlier dependence onset than individuals with high number of copies ($P=0.042$). The main differences were observed in the group of patients that develop cocaine dependence within a year after the first drug use (Fig. 3). When we subdivided subjects in two subgroups, early (<1 year) and late (≥ 1 year) dependence onset, we identified an overrepresentation of individuals with low number of copies in the group of patients showing early regular cocaine consumption ($P=5e-03$; OR = 1.62, CI = [1.13–2.32]).

Previously, a SNP located in intron 13 of the NSF gene, rs183211, was associated with cocaine dependence either as a single marker or as part of a risk haplotype with rs17698176 (intron 17; Fig. 2a)¹⁴, also associated with an early onset of cocaine dependence. These two SNPs are located distal from the CNV according to our above experiments. Thus, we studied whether the associations between cocaine dependence and either the CNV or the two SNPs in the risk haplotype at NSF were related. To do so, we estimated SNP-CNV haplotype frequencies using an expectation-maximization (EM) algorithm, and subsequently assessed LD between the CNV and rs183211 (Supplementary Table S2) and the CNV and the rs183211-rs17698176 risk haplotype (Table 2). We found that the rs183211G risk allele was associated with low number of copies at the CNV ($P=6e-12$) as it was in moderate LD with one copy ($r^2=0.30$). Furthermore, similar results were obtained for the risk haplotype: the rs183211G-rs17698176T haplotype allele was associated with low copy number of the CNV ($P<2.2e-16$) as this previously reported risk haplotype was in LD with one copy ($r^2=0.61$).

The two intronic SNPs previously reported to be associated with cocaine dependence, rs183211 and rs17698176, had no predicted functional effects according to the software SNP Function Prediction (snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.htm). As we found association between the risk haplotype rs183211G-rs17698176T and low number of CNV copies, we subsequently explored the potential impact of the CNV on the expression of the NSF gene. Expression levels for NSF_001 (full length transcript), NSF_002 (including the first four exons) and NSF_003 (including the last five exons) could be determined in PBMCs. Moreover, NSFPI, that spans the first 13 exons of the gene and seems to be a pseudogene that results from the CNV dynamics, encodes another transcript named NSFPI_001 (Fig. 2b). We analyzed the expression levels of this last transcript with an assay that also detects one of the gene products, NSF_001 (Fig. 4a, primer pair 'a'). As shown in Fig. 4b, the expression levels of transcripts NSF_001 + NSFPI_001 and NSF_002 were significantly increased along with the number of copies of the CNV ($P=4.3e-06$ and $P=8.9e-05$,

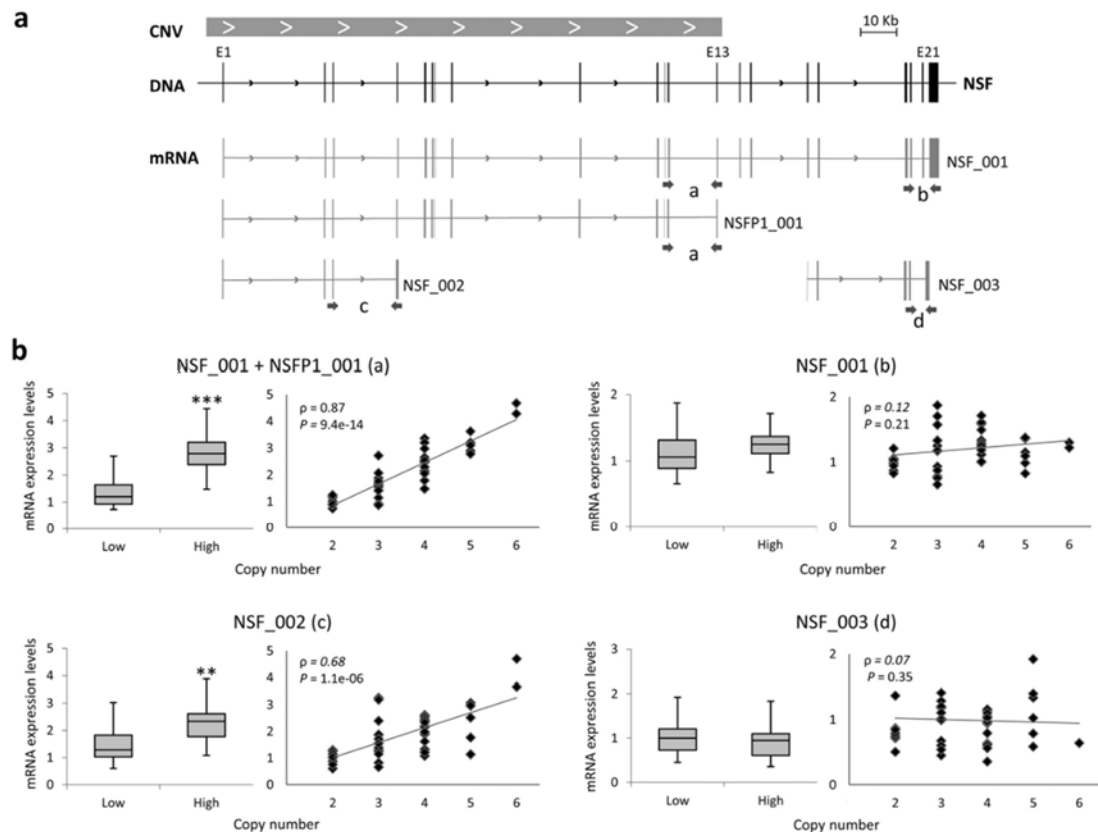


Figure 4. Correlation between the number of copies of the CNV and gene expression. (a) Structure of transcripts detected by qRT-PCR assay. CNV is indicated with a grey box, exons are indicated with boxes in black for the *NSF* gene (ENSG00000073969) and in grey for *NSF* transcripts: *NSF_001* (ENST00000398238), *NSFP1_001* (ENST00000570034), *NSF_002* (ENST00000486366) and *NSF_003* (ENST00000465370). Arrows indicate the position of qRT-PCR primers sets used to detect the different transcripts: "a" for *NSF_001* + *NSFP1_001*, "b" for *NSF_001*, "c" for *NSF_002* and "d" for *NSF_003*. (b) Box plot for mRNA expression levels of each transcript in individuals with low and high number of copies. Linear regression showing the correlation between number of copies and transcript expression levels. Spearman's rank correlation coefficients (ρ) are shown inside the graphs. (** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$).

respectively). Similar results were observed when the individuals were grouped into low and high number of copies, with transcript levels increased by 2.1-fold and 1.5-fold for *NSF_001* + *NSFP1_001* and *NSF_002*, respectively, in the group of high number of copies as compared to the group of low number of copies ($P = 8.5e-09$ and $P = 3.7e-04$, respectively). Finally, we assessed the linearity of this correlation and found a significant association between the number of copies of the CNV and the level of transcripts *NSF_001* + *NSFP1_001* ($\rho = 0.87$, $P = 9.4e-14$) and *NSF_002* ($\rho = 0.68$, $P = 1.18e-06$). As expected, no significant changes were observed for transcripts *NSF_001* and *NSF_003*, as they are encoded by genomic regions outside the CNV (Fig. 4b).

Discussion

Many studies have been performed to identify SNP variants associated with drug dependence and, even though some of them have reported significant findings, only a small fraction of the estimated heritability of this complex phenotype can be explained by them. Methodological limitations may account in part for the missing heritability, but other sources of genetic variation, like copy number variants, could also contribute to the genetic landscape of the disorder¹⁵. In this study, we identified a significant association between cocaine dependence and a CNV spanning the first 13 exons the *NSF* gene. To our knowledge, this is the first study that associates a CNV with cocaine dependence.

In a previous study, our group identified an association between a quick transition from cocaine use to dependence and a risk haplotype (rs183211G-rs17698176T) in the *NSF* gene. Furthermore, a large polymorphic CNV partially overlapping the *NSF* gene has been described¹⁶. We thus hypothesized that the *NSF* CNV could contribute to the susceptibility to cocaine dependence by altering gene expression. First, we performed a case-control association study and found a significant association between this CNV and cocaine dependence,

with an overrepresentation of individuals with low number of copies in cocaine patients. Then, we observed that a low number of CNV copies correlated with a rapid development of dependence, and that the CNV and the previously described risk haplotype were in LD. Furthermore, we observed an effect of the CNV on *NSF* expression, identifying a positive correlation between the number of copies of the CNV and the levels of two transcripts, *NSF_002* and *NSFP1_001*, both encoded by the segment of the gene that is included in the CNV. Since we had no access to brain samples, gene expression was assessed in samples obtained from PBMC, which may differ from brain *NSF* expression. Some studies, however, reveal a correlation in gene expression levels between peripheral blood and brain²⁵.

In addition, we have characterized the 3' end of the CNV, located within the *NSF* gene, and confirmed that the two disease-associated SNPs are located outside the CNV but in moderate LD with it. In consequence, the association identified previously, which was detected under the assumption of diploidy for the SNP variants, was calculated correctly and suggests that the two intronic SNPs may tag the *NSF* CNV.

CNVs play an important role in the generation of genetic diversity and so in human evolution. They have also been shown to have phenotypic effects, including susceptibility to disease, depending on whether or not dosage-sensitive genes or regulatory sequences are affected by the rearrangement^{26,27}. Many genes involved in brain development are enriched in CNVs²⁸, the biological importance as well as the evolutionary conservation of these genes suggest that they could have phenotype implications and might contribute to the susceptibility to complex neuropsychiatric disorders^{29,30}. Genome-wide studies performed in drug abuse have unraveled a number of CNVs possibly contributing to drug dependence. For example, a CNV at 11q14.2 was found associated with variations in brain volume and drinking behaviour²¹, and losses at 22q13.1 seem to increase the response to alcohol in the precuneus, a region previously associated with severity of alcohol dependence (AD)²². Furthermore, a GWAS assessing common CNVs in AD in a Korean cohort identified losses at 20q13.33 as protective factors for AD²³. Recently, a GWAS performed in opioid dependence (OD) identified many CNVs which could contribute to resistance or susceptibility to OD, three of them genome-wide significant²⁴. These findings suggest that CNVs may have an important role in drug dependence. However, to our knowledge, the present study is the first one performed in cocaine dependence considering CNVs, and obtaining significant results.

The *NSF* gene encodes the hexameric ATPase N-ethylmaleimide-sensitive factor, which plays an essential role in the synaptic vesicle turnover, modulating the kinetics of neurotransmitters and the integrative properties of synapses^{31–33}. NSF operates in the recycling of the SNARE complexes by preventing the accumulation of cis-complexes and assuring a sufficient amount of free SNARE for the maintenance of the intracellular membrane trafficking¹³. Furthermore, several studies suggest that NSF might modulate the function of several neurotransmitters in the central nervous system by interacting with their receptors, such as the glutamatergic alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor (AMPA), the beta-2 adrenergic receptor (β 2-AR), the dopamine receptors (more strongly D1 and D5), the adrenomedullin (AM) receptor, the γ -amino-butyric acid receptor (GABA_A) and the serotonin transporter (SERT)^{34–46}. Additionally, a recent study identified interactions between NSF and BLOC-1 (biogenesis of lysosome-related organelles complex 1), which participate in synaptic vesicle assembly, neurotransmission and plasticity, and this interaction modulates synaptic plasticity⁴⁷.

Interestingly, a recent study showed that withdrawal from repeated cocaine exposure increased interactions between NSF and glutamate receptor 2 (GluR2), and this complex acts as a negative regulator of the expression of behavioral sensitization in rats⁴⁸. Moreover, the *NSF* gene was found significantly down-regulated in postmortem hippocampus of cocaine addicts samples, which is consistent with our results showing an overrepresentation of low number of copies (which correlates with lower expression) in our sample of cocaine dependent patients⁴⁹. Furthermore, *NSF* decrease correlates with a robust down-regulation of *GABBR1* (Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 1), a subunit of GABAB receptor, which could be used as a predictor for increased risk for addiction⁴⁹. And in autistic patients, *NSF* expression was also found significantly reduced in lymphocytes and tended to be reduced in post-mortem brains, correlating with the severity of clinical traits⁴⁶.

The CNV spanning the *NSF* gene was previously associated with elevated peak antibody response to the AVA-Biothrax vaccine, suggesting that this CNV has an effect on the expression of the genes in this region (*NSF*, *ARL17* and *LRR37A*)⁵⁰. We have shown that a CNV spanning the *NSF* gene produces changes in the expression levels of some *NSF* transcripts, which could have an effect on the availability of neurotransmitter vesicles (loaded with e.g. dopamine, essential in the reward system) and its turnover, producing changes in the neurotransmitter release to the synaptic cleft. This would be in line with the “reward deficiency syndrome”, which hypothesizes that hypodopaminergic activity predisposes to cocaine dependence⁵¹. Although DA neurotransmission has been established as a central mediator in cocaine effects^{52–55}, other neurotransmitters systems, such as the glutamatergic, GABAergic and endocannabinoid ones, also dependent on NSF activity, are very important and both association studies and animal models support their role in cocaine dependence^{56–61}.

The present case-control association study raises several methodological issues: (i) sample heterogeneity might alter the results of association studies. To minimize the risks we considered sex-matched Caucasian patients and controls from Spain, all of them recruited in a small geographical area around Barcelona and evaluated following a common clinical assessment; (ii) cocaine dependence was not discarded in the control sample. However, this problem, which tends to balance allele frequencies in cases and controls, would increase the probability of false negative results, which is not the case in the present study; (iii) qRT-PCR assays are widely used to validate CNVs because of its specificity and reproducibility, even though in some cases the results may fall between integers (e.g. copy number measuring 1.4), making interpretation difficult. Ambiguous results were discarded from our study in order to ensure a correct assignation of the number of copies in all cases; (iv) Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) could not be tested in our samples since our genotyping strategy did not allow establishing phases. However, the effects of CNVs are usually related to genetic dose, therefore what matters is the total number of copies and not the phased genotype; (v) considering the number of CNV copies as low (2 and 3) or high (4, 5 and 6) is somehow arbitrary (Supplementary Table S1). In any case, if we consider individuals with 4 number of copies

into the 'low' group, the association remains statistically significant ($P=8.3e-04$); (vi) we assessed the effect of the CNV on gene expression in RNA from PBMC, which may differ from expression in the brain; (vi) it is important to note that other genes in addition to *NSF* lie in the CNV and could also be contributing to cocaine dependence predisposition.

To conclude, we found a significant association between cocaine dependence and a CNV spanning the *NSF* gene. Functional studies revealed that the levels of two transcripts in blood, *NSFP_001* and *NSF_002*, correlate with the number of copies of the CNV, suggesting that this CNV might have a functional impact on gene expression. These results, together with previous studies by our group¹⁴, suggest that *NSF* contributes to the genetic predisposition to cocaine dependence and, especially, to an early onset of dependence.

Materials and Methods

Delimitation of the copy number variation. The extension of the CNV spanning the *NSF* gene was ascertained in 174 individuals (89 controls and 85 cases). Detailed information about the subjects is provided in the 'Association study' section.

The number of copies at the CNV region and outside was assessed by qRT-PCR considering three regions of the *NSF* gene: exon 2, exon 13 and intron 13 (the latter located 102 bp 5' from SNP rs183211, previously associated with cocaine dependence) to narrow down the CNV extension. The albumin gene (*ALB*) was used as a diploid control. Primer sequences are available in Supplementary Table S3. QRT-PCR assays were performed as follows: 7.5 μ l of LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche Life Sciences, Branford, CT, USA), 400 nM of each primer, 10 ng of DNA and PCR-grade water up to 15 μ l. The qRT-PCR conditions were: 10 min at 95 °C, 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Specificity was ascertained after completion of the amplification in the presence of SYBR Green by the melting procedure (ramping from +65 °C to +97 °C, rising the temperature by 2.2 °C at every step with 2-seconds intervals). QRT-PCR experiments were performed using the LightCycler[®] 480 System and results were analyzed with the LightCycler[®] 480 Software, Version 1.5 (Roche Life Science, Branford, CT, USA). Standard curves for all amplicons were constructed through triplicate qRT-PCR amplifications with serial dilutions (factor of 2.5) of the DNA template and detection with SYBR Green. The final amount of template in the curve ranged from 300 ng to 3.14e-02 ng for DNA. Standard curves were used to determine the linearity (R^2) and the efficiency (E)⁶² of the qRT-PCR amplifications and all transcripts were amplified with an efficiency around 94% ($E=1.94$) and $R^2=0.9964$, without significant differences among them. Five HapMap subjects with known number of copies at the *NSF* CNV (NA18506, NA19239, NA19240, NA12156, NA18942) were used as a reference for 2, 3, 4, 5 and 6 copies, respectively¹⁶. Genomic samples of these individuals were obtained from the Coriell Institute for Medical Research (New Jersey, USA) and were included in all assays as an internal control. *NSF* gene copy number was calculated by the comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$) method and all experiments displaying ambiguous results were discarded from the study.

Association study. *Subjects.* The discovery sample consisted of 359 cocaine-dependent patients (mean age 35.5 ± 8.1 years, 81.3% males ($n=292$)) and 356 controls (52.7 ± 16.8 years, 81.5% males ($n=290$)). The replication sample consisted of 508 cocaine-dependent patients (mean age 35.7 ± 7.8 years, 79.9% males ($n=406$)) and 569 controls (52.1 ± 16.9 years, 79.8% males ($n=454$)). All patients were recruited and evaluated at the Psychiatry Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) according to DSM-IV TR criteria (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed., text revision) and the SCID (Structured Clinical Interview)⁶³. A total of 75% of patients ($n=652$) reported age at the initial consumption as well as age at dependence onset. All controls were recruited at the Blood and Tissues Bank of Barcelona. None of them had injected drugs intravenously. Patients and controls were Spanish, Caucasian and sex-matched. The study was approved by the ethics committee of our institution, the Institutional Review Board of the University of Barcelona (IRB00003099), and informed consent was obtained from all participants, in accordance with the Helsinki Declaration. Population stratification was previously discarded in our sample⁶⁴.

DNA isolation and quantification. Genomic DNA was isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using the salting-out method⁶⁵. DNA concentrations were determined using NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Termo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA).

Copy number assay. The number of copies of the CNV of each individual was assessed by qRT-PCR considering a region of exon 2 in the *NSF* gene. The albumin gene (*ALB*) was used as a diploid control. QRT-PCR conditions are described above. In all assays, samples with known number of copies at the *NSF* CNV were included, showing a concordance rate of 100%. All experiments displaying ambiguous results were not considered in the study.

Statistical analysis. The comparison of the number of copies of the CNV between cases and controls was performed using the Fisher's exact test (two-tailed), considering the five possible copy number assignments per individual (from 2 to 6) and also a dichotomization into low (2 or 3 copies) and high (4, 5 or 6 copies) copy number. Age was considered as a covariate using binary logistic regression test. To analyze the effect of the number of copies of the CNV in the lapse between initial and regular consumption of cocaine, the comparison of medians was performed using the Mann-Whitney U non-parametric test as normality was rejected using Kolmogorov-Smirnov test. In addition, the time between initial consumption and onset of cocaine dependence was dichotomized into early (<1 years) or late (≥ 1 years) dependence onset, and the comparison of the number of copies of the *NSF* CNV between these groups was performed with the Fisher's exact test (one-tailed). Statistical analysis was performed using SPSS Statistics Version 22.0 software (IBM Corp. Released 2013. Armonk, NY).

Linkage disequilibrium analysis. We estimated the allele and haplotype frequencies of the CNV and two *NSF* SNPs found previously associated with cocaine dependence (rs183211 and rs17698176)¹⁴. Genotypes for both SNPs and CNV were available for 47% of the sample used in the CNV association study ($n = 407$, 36.07 ± 9.5 years, 85.7% males). Traditional approaches to assess LD between SNPs and CNVs are insufficient for higher order CNVs as the phase of the CNV cannot be directly inferred. To address this issue, we developed an EM algorithm-based method to estimate SNP-CNV haplotype frequencies under an assumption of Hardy-Weinberg equilibrium between haplotypes. The approach is similar to an existing method⁶⁶. The algorithm begins by seeding initial SNP-CNV haplotype frequencies according to known SNP-CNV genotype counts (e.g., an individual with a homozygote AA SNP genotype and 2 copies of the CNV would likely have two copies of a haplotype which included the A SNP allele and a single copy of the CNV). In the E-step, haplotype counts are calculated based on the estimated haplotype frequencies; followed by the M-step, which recalculates haplotype frequencies based on the estimated haplotype counts. This process is repeated in an iterative fashion until the haplotype frequencies become constant from one iteration to the next. In this study, the frequency estimates were constant to five decimal places by the twentieth iteration. To estimate these haplotype frequencies, genotype data for rs183211 and rs17698176 from the 407 individuals previously described was used. From the resulting haplotype frequencies, we then assessed linkage disequilibrium (r^2) between rs183211 and low number of copies of the CNV (individuals with 2 and 3 copies). Furthermore, we likewise assessed LD between the rs183211-rs17698176 haplotype and low number of copies of the CNV.

***NSF* expression assays.** To correlate the number of copies of the CNV with *NSF* transcription levels, 45 Spanish, Caucasian, healthy volunteers (mean age 32.8 ± 11.8 years, 66.7% females ($n = 30$)) were recruited at the Genetics Department of the University of Barcelona (Barcelona, Spain). Genomic DNA was isolated as previously described. Total RNA was extracted from PBMC within 2 h after sampling using BD Vacutainer® CPT™ tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Life Science, Branford, CT, USA). RNA was retro-transcribed to cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Specific primers were designed to detect each of the eight *NSF* transcripts according to ENSEMBL, as well as *NSFP1*, a pseudogene that probably arose as a consequence of the CNV dynamics. Three transcripts could be amplified specifically: *NSF_001* (primers set 'b' in Fig. 4a), *NSF_002* (primers set 'c') and *NSF_003* (primers set 'd') (ENST00000398238, ENST00000486366 and ENST00000465370, respectively, according to Ensembl release 83). For *NSFP1_001* (ENST00000570034.1) we could not design specific primers since it overlaps with *NSF_001*; for this reason we designed a qRT-PCR assay to detect simultaneously both transcripts (primers set 'a'). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) were used to normalize the relative amounts of mRNA. QRT-PCR assays were performed as described above and all transcripts were amplified with an efficiency around 94% ($E = 1.94$) and $R^2 = 0.9963$, without significant differences among them.

Statistical analysis. Expression levels of each transcript were compared among the five groups generated according to the number of copies of the CNV per individual (from 2 to 6) or between low and high CNV copies using Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U non-parametric tests, respectively. In both cases normality was previously rejected using the Kolmogorov-Smirnov test. To estimate the relationship among the number of copies of the CNV and the expression levels of each transcript, a linear regression analysis was performed and its correlation was confirmed using the Spearman's rank correlation coefficient (ρ), threshold set at $P < 0.05$ in all tests. Statistical analysis was performed using SPSS Statistics Version 22.0 software (IBM Corp. Released 2013. Armonk, NY).

Ethics statement. This study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from all adult subjects, children, and their parents according to the Helsinki declaration.

References

- Kendler, K. S. & Prescott, C. A. Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br. J. Psychiatry* **173**, 345–350 (1998).
- Kendler, K. S., Karkowski, L. M., Neale, M. C. & Prescott, C. A. Illicit Psychoactive Substance Use, Heavy Use, Abuse, and Dependence in a US Population-Based Sample of Male Twins. *Arch. Gen. Psychiatry* **57**, 261–269 (2000).
- Wagner, F. A. & Anthony, J. C. From first drug use to drug dependence: Developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology* **26**, 479–488 (2002).
- Kuhar, M. J., Ritz, M. C. & Boja, J. W. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci.* **14**, 299–302 (1991).
- Kalivas, P. W. Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *Am. J. Addict.* **16**, 71–78 (2007).
- Cornish, J. L. & Kalivas, P. W. Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J. Neurosci.* **20**, RC89 (2000).
- Gonzalez, G. *et al.* Tiagabine increases cocaine-free urines in cocaine-dependent methadone-treated patients: results of a randomized pilot study. *Addiction* **98**, 1625–1632 (2003).
- Morgan, A. E. & Dewey, S. L. Effects of pharmacologic increases in brain GABA levels on cocaine-induced changes in extracellular dopamine. *Synapse* **28**, 60–65 (1998).
- Dewey, S. L. *et al.* GABAergic attenuation of cocaine-induced dopamine release and locomotor activity. *Synapse* **25**, 393–398 (1997).
- De Vries, T. J. & Schoffelmeer, A. N. M. Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 420–426 (2005).
- De Vries, T. J. *et al.* A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat. Med.* **7**, 1151–1154 (2001).
- Dackis, C. A. *et al.* Modafinil and cocaine: a double-blind, placebo-controlled drug interaction study. *Drug Alcohol Depend.* **70**, 29–37 (2003).
- Barszczewski, M. *et al.* A novel site of action for alpha-SNAP in the SNARE conformational cycle controlling membrane fusion. *Mol. Biol. Cell* **19**, 776–784 (2008).

14. Fernández-Castillo, N. *et al.* Candidate pathway association study in cocaine dependence: the control of neurotransmitter release. *World J. Biol. Psychiatry* **13**, 126–134 (2012).
15. Manolio, T. A. *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **461**, 747–753 (2009).
16. Sudmant, P. H. *et al.* Diversity of human copy number variation and multicopy genes. *Science* **330**, 641–646 (2010).
17. Stefansson, H. *et al.* A common inversion under selection in Europeans. *Nat. Genet.* **37**, 129–137 (2005).
18. Perry, G. H. *et al.* Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nat. Genet.* **39**, 1256–1260 (2007).
19. Henrichsen, C. N., Chaignat, E. & Reymond, A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1–8 (2009).
20. Schlattl, A., Anders, S., Waszak, S. M., Huber, W. & Korbel, J. O. Relating CNVs to transcriptome data at fine resolution: Assessment of the effect of variant size, type, and overlap with functional regions. *Genome Res.* **21**, 2004–2013 (2011).
21. Boutte, D. *et al.* Association of genetic copy number variations at 11 q14.2 with brain regional volume differences in an alcohol use disorder population. *Alcohol* **46**, 519–527 (2012).
22. Liu, J., Calhoun, V. D., Chen, J., Claus, E. D. & Hutchison, K. E. Effect of homozygous deletions at 22q13.1 on alcohol dependence severity and cue-elicited BOLD response in the precuneus. *Addict. Biol.* **18**, 548–558 (2013).
23. Bae, J. S. *et al.* The genetic effect of copy number variations on the risk of alcoholism in a Korean population. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **36**, 35–42 (2012).
24. Li, D. *et al.* Genome-Wide Association Study of Copy Number Variations (CNVs) with Opioid Dependence. *Neuropsychopharmacology* **40**, 1016–1026 (2015).
25. Sullivan, P. F., Fan, C. & Perou, C. M. Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.* **141B**, 261–268 (2006).
26. Lupski, J. R. & Stankiewicz, P. Genomic disorders: Molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* **1**, 627–633 (2005).
27. Stankiewicz, P. & Lupski, J. R. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu. Rev. Med.* **61**, 437–455 (2010).
28. de Smith, A. J. *et al.* Array CGH analysis of copy number variation identifies 1284 new genes variant in healthy white males: Implications for association studies of complex diseases. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2783–2794 (2007).
29. de Smith, A. J., Walters, R. G., Froguel, P. & Blakemore, A. I. Human genes involved in copy number variation: mechanisms of origin, functional effects and implications for disease. *Cytogenet. Genome Res.* **123**, 17–26 (2008).
30. Malhotra, D. & Sebat, J. CNVs: Harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* **148**, 1223–1241 (2012).
31. Schweizer, F. E. *et al.* Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science* **279**, 1203–1206 (1998).
32. Malsam, J., Kreye, S. & Söllner, T. H. Membrane traffic in the secretory pathway: Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2814–2832 (2008).
33. Littleton, J. T. *et al.* SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 12233–12238 (2001).
34. Bomberger, J. M., Parameswaran, N., Hall, C. S., Aiyar, N. & Spielman, W. S. Novel function for Receptor Activity-modifying Proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J. Biol. Chem.* **280**, 9297–9307 (2005).
35. Chou, W.-H. *et al.* GABAA receptor trafficking is regulated by protein kinase C(epsilon) and the N-ethylmaleimide-sensitive factor. *J. Neurosci.* **30**, 13955–13965 (2010).
36. Cong, M. *et al.* Binding of the $\beta 2$ Adrenergic Receptor to N-Ethylmaleimide-sensitive Factor Regulates Receptor Recycling. *J. Biol. Chem.* **276**, 45145–45152 (2001).
37. Evers, D. M. *et al.* Plk2 attachment to NSF induces homeostatic removal of GluA2 during chronic overexcitation. *Nat. Neurosci.* **13**, 1199–1207 (2010).
38. Hanley, J. G., Khatri, L., Hanson, P. I. & Ziff, E. B. NSF ATPase and alpha-/beta-SNAPs disassemble the AMPA receptor-PICK1 complex. *Neuron* **34**, 53–67 (2002).
39. Heydorn, A. *et al.* Distinct *in vitro* interaction pattern of dopamine receptor subtypes with adaptor proteins involved in post-endocytotic receptor targeting. *FEBS Lett.* **556**, 276–280 (2004).
40. Kittler, J. T. *et al.* The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol. Cell. Neurosci.* **18**, 13–25 (2001).
41. Leil, T. A., Chen, Z. W., Chang, C. S. S. & Olsen, R. W. GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. *J. Neurosci.* **24**, 11429–11438 (2004).
42. Nishimune, A. *et al.* NSF Binding to GluR2 Regulates Synaptic Transmission. *Neuron* **21**, 87–97 (1998).
43. Osten, P. *et al.* The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron* **21**, 99–110 (1998).
44. Pontier, S. M. *et al.* Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *EMBO J.* **25**, 2698–2709 (2006).
45. Song, I. *et al.* Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* **21**, 393–400 (1998).
46. Iwata, K. *et al.* N-ethylmaleimide-sensitive factor interacts with the serotonin transporter and modulates its trafficking: implications for pathophysiology in autism. *Mol. Autism* **5**, 33 (2014).
47. Gokhale, A. *et al.* The N-ethylmaleimide-sensitive factor and dysbindin interact to modulate synaptic plasticity. *J. Neurosci.* **35**, 7643–76453 (2015).
48. Lu, H. *et al.* Interactions between N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor and GluR2 in the Nucleus Accumbens Contribute to the Expression of Locomotor Sensitization to Cocaine. **34**, 3493–3508 (2014).
49. Enoch, M. A. *et al.* GABAergic gene expression in postmortem hippocampus from alcoholics and cocaine addicts; corresponding findings in alcohol-naïve P and NP rats. *PLoS One* **7**, 1–11 (2012).
50. Falola, M. I. *et al.* Genomic Copy Number Variants: Evidence for Association with Antibody Response to Anthrax Vaccine Adsorbed. *PLoS One* **8** (2013).
51. Comings, D. E. & Blum, K. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog. Brain Res.* **126**, 325–341 (2000).
52. Woolverton, W. L. & Johnson, K. M. Neurobiology of cocaine abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 193–200 (1992).
53. Volkow, N. D. *et al.* Relationship between psychostimulant-induced 'high' and dopamine transporter occupancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10388–10392 (1996).
54. Volkow, N. D., Fowler, J. S. & Wang, G. J. Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J. Psychopharmacol.* **13**, 337–345 (1999).
55. Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J. & Goldstein, R. Z. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol. Learn. Mem.* **78**, 610–624 (2002).
56. Gass, J. T. & Olive, M. F. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 218–265 (2008).
57. Kalivas, P. W. & O'Brien, C. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* **33**, 166–180 (2008).
58. Thomas, M. J., Kalivas, P. W. & Shaham, Y. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 327–342 (2008).
59. Uys, J. D. & LaLumiere, R. T. Glutamate: the new frontier in pharmacotherapy for cocaine addiction. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **7**, 482–491 (2008).

60. Soria, G. *et al.* Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1670–1680 (2005).
61. Xi, Z.-X. & Stein, E. A. Nucleus accumbens dopamine release modulation by mesolimbic GABAA receptors—an *in vivo* electrochemical study. *Brain Res.* **798**, 156–165 (1998).
62. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
63. First, M. B., Spitzer, S. R., Gibbon, M. & Williams, J. B. M. *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID)*. (American Psychiatric Press, 1997).
64. Fernández-Castillo, N. *et al.* Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence. *Genes. Brain. Behav.* **12**, 39–46 (2013).
65. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215 (1988).
66. Wineinger, N. E., Pajewski, N. M. & Tiwar, H. K. A method to assess linkage disequilibrium between CNVs and SNPs inside copy number variable regions. *Front. Genet.* **2**, 1–7 (2011).

Acknowledgements

We are grateful to all the patients, their families and clinical collaborators who contributed with the patient recruitment (Nieves Martínez-Luna, R. Felipe Palma-Álvarez, Constanza Daigre, Nina Vela and Alejandra Herrero). We thank Mónica Cozar for her help with blood extractions and Gemma Marfany for helpful suggestions on gene expression analysis. N.F.-C., J.C.-D. and B.T. were supported by contracts of the ‘Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras’ (CIBERER), and J.C.-D. was additionally supported by ‘Generalitat de Catalunya’ (2015 FI_B 00448). B.T. was supported by AGAUR (Generalitat de Catalunya) and by H2020 (grant agreement 667302, CoCA). Major financial support for this research was received by B.C. from the Spanish ‘Ministerio de Economía y Competitividad’ (SAF2015-68341-R) and AGAUR, ‘Generalitat de Catalunya’ (2014SGR932). M.R. is a recipient of a Miguel de Servet contract from the ‘Instituto de Salud Carlos III’, Spain (CP09/00119) and received financial support from ‘Instituto de Salud Carlos III’ (PI11/00571, PI11/01629, PI12/01139, PI14/01700), and by the European Regional Development Fund (ERDF) and AGAUR, ‘Generalitat de Catalunya’ (2014SGR1357). C.R. received financial support by ‘Instituto de Salud Carlos III’ (PI13/1911) and ‘Plan Nacional Sobre Drogas’ (2013/044). N.E.W. is supported by the NIH/NCATS grant 5UL1 TR001114. We also received funding from the European Community’s Seventh Framework Program (under grant agreement number 602805, Aggressotype) and from the European Community’s H2020 Program (under grant agreement number 667302, CoCA).

Author Contributions

J.C.-D. performed the genotyping assay of the CNV in the *NSF* gene and the association study, the CNV delimitation, the expression study of *NSF* and the statistical analysis; C.R., L.G.-L., L.R.-C., C.B., C.A. and M.C. participated in the recruitment of patients and clinical assessment and coordinated the clinical research; C.A. participated in the statistical analysis; G.E. and N.E.W. performed the linkage disequilibrium analysis; J.C.-D., B.T. and N.F.-C. isolated genomic DNA from samples; J.C.-D., B.C. and N.F.-C. designed and coordinated the study; J.C.-D. prepared the first draft of the manuscript and all figures and tables; M.R., B.C. and N.F.-C. supervised the manuscript preparation. All authors contributed to and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Cabana-Domínguez, J. *et al.* A highly polymorphic copy number variant in the *NSF* gene is associated with cocaine dependence. *Sci. Rep.* **6**, 31033; doi: 10.1038/srep31033 (2016).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary information for:

A HIGHLY POLYMORPHIC COPY NUMBER VARIANT IN THE *NSF* GENE IS ASSOCIATED WITH COCAINE DEPENDENCE

Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Lara Grau-López, Laia Rodríguez-Cintas, Carmen Barral, Alfonso C. Abal, Galina Erikson, Nathan E. Wineinger, Bàrbara Torrico, Concepció Arenas, Miquel Casas, Marta Ribasés, Bru Cormand*, Noèlia Fernández-Castillo*

*Equally contributed

Table S1. Association study of CNV in the *NSF* gene in cocaine dependent Spanish patients.

Number of copies	Discovery		Replication		Pooled analysis ¹	
	Controls N (%)	Cases N (%)	Controls N (%)	Cases N (%)	Controls N (%)	Cases N (%)
2	92 (25.8)	118 (32.9)	150 (26.4)	152 (29.9)	242 (26.2)	270 (31.5)
3	134 (37.6)	141 (39.3)	199 (35.0)	201 (39.6)	333 (36.0)	342 (39.9)
4	87 (24.4)	75 (20.9)	134 (23.6)	103 (20.3)	221 (23.9)	178 (20.7)
5	33 (9.3)	22 (6.1)	62 (10.9)	37 (7.3)	95 (10.3)	59 (6.9)
6	10 (2.8)	3 (0.8)	24 (4.2)	15 (3)	34 (3.7)	18 (2.1)
SUM	356	359	569	508	925	867
p-value	0.03696		0.06021		0.00134	

In bold: significant p-values. ¹ Discovery + replication samples.

Table S2. Haplotype frequencies.

rs183211	CNV	Frequencies
A	1	0.045
A	2	0.235
A	3	0.022
G	1	0.515
G	2	0.101
G	3	0.083

Table S3. Primer sequences used in qRT-PCR assays.

Gene	Region or transcript		Nucleotide sequence (5'→3')
<i>ALB</i>	Intron 12	Fw	TTGTGGGCTGTAATCATCG
		Rv	TGCTGGTTCTCTTCACTGAC
<i>GAPDH</i>	GAPDH_001	Fw	AGCCACATCGCTCAGACAC
		Rv	GCCCAATACGACCAATCC
<i>HPRT1</i>	HPRT1_001	Fw	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA
		Rv	CAAGACATTCTTCCAGTTAAAGTTG
<i>NSF</i>	Exon 2	Fw	GGCAAGATGTCCTACAGATGAA
		Rv	CGAATGCCACTTAGCAGGTTA
	Exon 13	Fw	GCAAGTGACGAGAGGAGAC
		Rv	TGGCACTTACTTTTCGCCTG
	Intron 13	Fw	GAGGGTTTGAGTCTGGTGGA
		Rv	AGCCTGGAAAGCAAACAACCT
	NSF_001 + NSFP1_001	Fw	CCCCCAGGTTGTGGTAAGAC
		Rv	ACTGTTAGCACCAAGCCTCC
NSF_001	Fw	GCTGATCGAGATGTCCCTAC	
	Rv	CTTCAGGCAAAGAGAATACCAG	
NSF_002	Fw	ACTGAAGACACATCCATCGGT	
	Rv	TACCATAACTATTTCTTCCC	
NSF_003	Fw	GCCACAGGAGAGCAGC	
	Rv	CCTTGCTTGGTCTCTCGG	

CAPÍTOL 2: CONTRIBUCIÓ DEL GEN *PLCB1* A LA DEPENDÈNCIA DE DROGUES EN GENERAL, I A LA COCAÏNA EN PARTICULAR.

Article 2:

“Associació del gen *PLCB1* a la dependència de drogues”.

Resum:

Avui dia, els factors genètics implicats en la susceptibilitat a la dependència de drogues són encara força desconeguts. Diversos estudis donen suport al paper dels microRNAs (miRNAs) en la plasticitat neuronal induïda per les drogues que dona lloc a l'addicció. En aquest treball hem explorat el paper dels miRNAs en l'establiment de la dependència de drogues. Per això, hem seleccionat 62 variants d'un sol nucleòtid (SNPs) localitzades a la regió 3'UTR de gens diana i que potencialment podrien alterar la unió de molècules de miRNAs. Hem realitzat un estudi cas-control en una mostra espanyola de 735 casos (majoritàriament individus dependents de cocaïna que a la vegada són dependents d'altres drogues d'abús) i 739 controls, i hem identificat associació amb la variant rs1047383 del gen *PLCB1*, que s'ha replicat en una mostra independent (663 casos i 667 controls). A continuació, hem testat 9 miRNAs que potencialment s'unirien a la regió del SNP rs1047383, però no s'ha pogut demostrar que cap d'ells alteri els nivells d'expressió del gen *PLCB1*. A més, hem testat dos miRNAs que podrien unir-se a una altra regió del gen *PLCB1* que conté un SNP, rs708019, en elevat desequilibri de lligament amb la variant associada. Tot i que el miRNA miR-582 podia unir-se a aquesta regió tot disminuint l'expressió del gen *PLCB1*, no hem observat diferències entre els dos al·lels del SNP. Finalment, hem explorat la possibilitat que la cocaïna alteri l'expressió del gen *PLCB1*. Tant en nucli accumbens de subjectes que abusen de la cocaïna com en neurones dopaminèrgiques humanes en cultiu tractades amb cocaïna s'ha detectat un increment de l'expressió del gen. Aquests resultats, conjuntament amb d'altres publicats en estudis previs, suggereixen que el gen *PLCB1* podria participar en la susceptibilitat a la dependència de drogues en general, i a la cocaïna en particular.

Referència:

Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Laura Pineda-Cirera, R. Felipe Palma-Álvarez, Elena Ros-Cucurull, Lara Grau-López, Abderaman Esojo, Miquel Casas, Concepció Arenas, Josep Antoni Ramos-Quiroga, Marta Ribasés, Noèlia Fernández-Castillo, Bru Cormand. *Association of the *PLCB1* gene with drug dependence*. Scientific Reports 2017; 7:10110. doi: 10.1038/s41598-017-10207-2.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Association of the *PLCB1* gene with drug dependence

Judit Cabana-Domínguez^{1,2,3,4}, Carlos Roncero^{5,6,7,8}, Laura Pineda-Cirera^{1,2,3,4}, R. Felipe Palma-Álvarez^{6,8}, Elena Ros-Cucurull^{5,6,8}, Lara Grau-López^{5,6,7,8}, Abderaman Esojo^{6,8}, Miquel Casas^{5,7,8}, Concepció Arenas¹, Josep Antoni Ramos-Quiroga^{5,7,8,9}, Marta Ribasés^{7,8,9}, Noèlia Fernández-Castillo^{1,2,3,4} & Bru Cormand^{1,2,3,4}

1: 4 May 2017

1: 4 August 2017

1: 31 August 2017

Genetic factors involved in the susceptibility to drug addiction still remain largely unknown. miRNAs seem to play key roles in the drug-induced plasticity of the brain that likely drives the emergence of addiction. In this work we explored the role of miRNAs in drug addiction. With this aim, we selected 62 SNPs located in the 3'UTR of target genes that are predicted to alter the binding of miRNA molecules and performed a case-control association study in a Spanish sample of 735 cases (mainly cocaine-dependent subjects with multiple drug dependencies) and 739 controls. We found an association between rs1047383 in the *PLCB1* gene and drug dependence that was replicated in an independent sample (663 cases and 667 controls). Then we selected 9 miRNAs predicted to bind the rs1047383 region, but none of them showed any effect on *PLCB1* expression. We also assessed two miRNAs binding a region that contains a SNP in linkage disequilibrium with rs1047383, but although one of them, hsa-miR-582, was found to downregulate *PLCB1*, no differences were observed between alleles. Finally, we explored the possibility that *PLCB1* expression is altered by cocaine and we observed a significant upregulation of the gene in the nucleus accumbens of cocaine abusers and in human dopaminergic-like neurons after cocaine treatment. Our results, together with previous studies, suggest that *PLCB1* participates in the susceptibility to drug dependence.

Drug dependence is one of the major health problems worldwide. In Europe, about 25% of adults are estimated to have tried illicit drugs at some point in their lives¹. Usually drug consumers use more than one drug at the same time: for example, within the group of European individuals who consumed a psychoactive substance in the last 12 months, 33% had consumed two different substances and 10% had used three². This high prevalence of poly-drug abuse is due to common and drug-specific genetic and environmental factors^{3–5}. It is well known that addictions are moderately to highly heritable (from 0.39 in the case of hallucinogens to 0.72 for cocaine), although the specific genetic risk factors involved in its predisposition remain largely unknown^{6–9}. Transcriptomic studies in animal and cellular models, as well as human studies in postmortem brain samples from addicted individuals, have revealed that both acute and chronic drug exposure produce epigenetic adaptations and changes in gene expression¹⁰. Furthermore, recent studies have shown that some genes whose expression is altered by cocaine also contribute to cocaine dependence susceptibility^{11,12}.

MicroRNAs (miRNAs) are small regulatory noncoding RNA molecules (about 18–25 nucleotides in length) that control gene expression through direct binding to 3'untranslated regions (3'UTRs) of target mRNAs causing translational repression or mRNA degradation. One single miRNA can target and regulate hundreds of mRNAs

¹Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ³Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain. ⁴Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR-SJD), Esplugues de Llobregat, Catalonia, Spain. ⁵Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain. ⁶Addiction and Dual Diagnosis Unit Vall Hebron, Psychiatric Services, Hospital Universitari Vall d'Hebron-ASPB, Barcelona, Catalonia, Spain. ⁷Biomedical Network Research Centre on Mental Health (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. ⁸Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain. ⁹Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addiction, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain. Noèlia Fernández-Castillo and Bru Cormand contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.F.-C. (email: noefernandez@ub.edu) or B.C. (email: bcormand@ub.edu)

Gender N (%)	Discovery sample		Replication sample	
	Drug dependence N = 735	Control N = 739	Drug dependence N = 663	Control N = 667
Male	574 (78.1)	577 (78.1)	507 (76.5)	510 (76.5)
Female	161 (21.9)	162 (21.9)	156 (23.5)	157 (23.5)
Age (mean and SD)				
	37.3 ± 9.6	55.4 ± 15.9	37.3 ± 9.9	55.8 ± 16.3

Table 1. Descriptive characteristics of the Spanish Caucasian individuals with drug dependence and controls used in the case-control association study. SD: Standard deviation.

and, conversely, one mRNA can be regulated by several miRNAs. This is a complex and dynamic system that allows the cells to fine-tune gene expression^{13–15}.

MiRNAs are very abundant in the central nervous system and play important roles in neuronal development, differentiation and survival^{16, 17}. Many studies have shown their contribution to several psychiatric disorders such as schizophrenia, bipolar disorder, autism or drug dependence^{18–21}. In human prefrontal cortex of alcoholic patients 35 miRNA were found up-regulated as compared to controls²². Animal model studies have demonstrated that drugs of abuse induce robust alterations in the expression of a wide range of miRNAs. Cocaine administration in rats alters miR-124, miR-181 and let-7 in mesolimbic dopaminergic system^{23, 24} and miR-212 in dorsal striatum^{25, 26}. On the other hand, alcohol regulates miR-9 increasing alcohol tolerance²⁷. Also, miRNAs have been shown to play an important role in different processes related to addiction such as reward, synaptic plasticity, learning, memory, withdrawal and relapse²⁸.

Some studies suggest that single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in miRNAs or in their target sites can alter the miRNA-mediated regulation of gene expression that underlies disease and non-pathological phenotypes^{29–31}. A recent study generated a transcriptome-wide map of the miRNA binding sites in human brain. Based on the interaction between argonaute 2 protein (AGO2) and miRNAs, they identify target regions in mRNAs. These regions contain 916 common SNPs that could potentially alter miRNA:mRNA binding³².

In this study, we aimed at examining the contribution to drug dependence susceptibility of SNPs that alter the binding of miRNAs to their target mRNAs. For that purpose we selected SNPs located in the 3'UTR identified in the study mentioned above and performed a case-control association study in drug addiction in a discovery and a replication samples from Spain. The identified variants were subjected to functional testing. Finally, we assessed the impact of cocaine on the expression of those genes where the associated SNPs are located.

Material and Methods

Association study. *Subjects.* Patients were recruited and evaluated at the Addiction and Dual Diagnosis Unit of the Psychiatry Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) according to DSM-IV-TR criteria (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. Text revision). The Structured Clinical Interview (SCID)³³ was administered and volunteers with DSM-IV lifetime diagnosis for substance dependence were included in the study. About 73.5% of our patient sample consists of cocaine-dependent patients, most of which are dependent to other drugs of abuse. Controls were recruited at the Blood and Tissues Bank of Barcelona, and both patients and controls were Spanish and Caucasian, with the two last names (one from each parent) of Spanish origin. Other ethnicities such as Moroccan, Gypsies or South American individuals, among others, were discarded. Patients and controls were divided randomly into a discovery sample, which consisted of 735 patients and 739 controls, and a replication sample of 663 patients and 667 controls (Table 1 and Fig. 1). Population stratification was previously discarded in our sample³⁴. The study was approved by the ethics committee of our institution, the Institutional Review Board of the University of Barcelona (IRB00003099), and informed consent was obtained from all participants, in accordance with the Helsinki Declaration. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

DNA isolation and quantification. Genomic DNA samples were obtained from peripheral blood lymphocytes using the salting-out method³⁵ and were quantified using Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA).

SNP selection and genotyping. We selected SNPs in target genes that might alter the binding of regulator miRNAs using a previously described list of 916 SNPs located in AGO2 binding sites³². From this list we selected SNPs within the 3'UTR of genes and with a minimum allele frequency (MAF) of 0.15 in CEU individuals from HapMap project (www.hapmap.org; release 23). A total of 62 SNPs were selected under these criteria and genotyped in the discovery sample. We considered a maximum percentage of 5% of missing genotypes, and the SNPs finally evaluated had an average call rate of 99.6%. Nominally significant associated SNPs were subsequently assessed in a replication sample. Genotyping of both discovery and replication samples was performed by KASP technology (LGC, Teddington, Middlesex, UK).

Statistical analyses. The minimal statistical power for discovery (23–93%) and replication samples (18–81%) were calculated *post hoc* using the software Power Calculator for Genetic Studies (<http://sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS/>), under the multiplicative model (equivalent to log-additive) and assuming an odds ratio (OR) between 1.1 and 1.3, a significance threshold of 0.05, the lowest MAF value in our study (0.119), and a prevalence for substance dependence of 0.026³⁶. The R library *SNPassoc*³⁷ was used to assess Hardy-Weinberg equilibrium

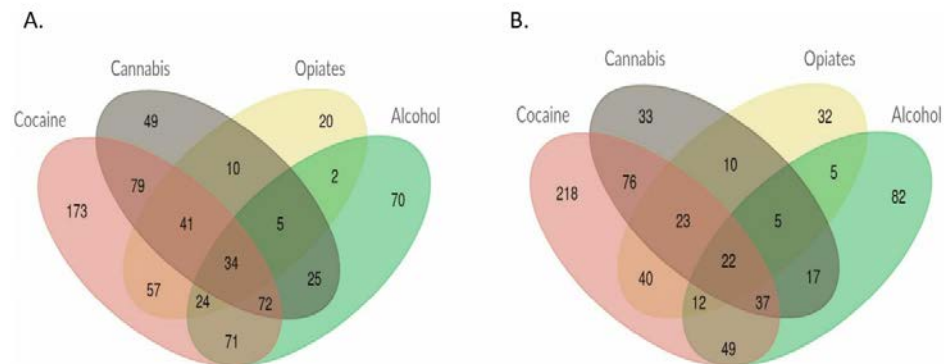


Figure 1. Distribution of the four main dependencies (cocaine, cannabis, alcohol and opiates) in the sample of patients included in the case-control association study, depicted in Venn diagrams. Other dependencies with a frequency lower than 10% are not displayed. (A) Discovery sample. (B) Replication sample.

Marker	Locus	Discovery (735 cases–739 controls)				Replication (663 cases–667 controls)				Pooled analysis (1393 cases–1406 controls)		
		Alleles	p-value ¹	Adj. p-value ²	OR [95% CI] ²	Alleles	p-value ¹	Adj. p-value ²	OR [95% CI] ²	p-value ¹	Adj. p-value ²	OR [95% CI] ²
rs6840	SCD5	C/T	0.011	0.025	1.24 [1.03–1.50]	—	—	—	—	—	—	—
rs1285	ID11	C/T	0.029	—	—	<u>C/T</u>	0.010	0.034	1.32 [1.02–1.71]	—	—	—
rs1872353	FBXO45	C/T	0.044	—	—	—	—	—	—	—	—	—
rs6855973	GRIA2	A/T	0.014	—	—	—	—	—	—	—	—	—
rs1047383	PLCB1	C/T	0.039	9.6e-03	1.27 [1.06–1.53]	<u>C/T</u>	3.8e-03	1.6e-03	1.37 [1.13–1.67]	4.8e-04	3.7e-04	1.29 [1.12–1.49]
rs1057377	SPOCK3	A/G	0.026	0.033	1.23 [1.02–1.49]*	—	—	—	—	—	—	—
rs2597775	QDPR	C/T	0.043	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Table 2. SNPs located in miRNA binding sites associated with drug dependence. ¹Log-additive model; ²Adjusted by age; Risk allele underlined. *When OR < 1 the inverted score is shown; SNP, Single Nucleotide Polymorphism.

(HWE, threshold set at $P < 0.01$) and to compare genotypic frequencies between cases and controls for each marker considering the log-additive model and a significance threshold of 0.05. As age differed significantly between cases and controls, we considered it as a covariate in all tests. All the p-values shown in the different association analyses are the ones adjusted for age, except in Table 2 and Supplementary Tables where both p-values are shown. The Bonferroni correction threshold for multiple testing was set at $P < 8.5e-04$ (0.05/59 SNPs) in the discovery sample, and at $P < 7.2e-03$ (0.05/7 SNPs) in the replication sample and in the pooled analysis.

Evaluation of functional effect of associated variants. *Linkage disequilibrium analysis.* Genotype data for the *PLCB1* gene plus 10 kb flanking sequences upstream and downstream were available for 554 individuals from our control sample³⁸. The analysis of linkage disequilibrium (LD) was performed using Haploview software³⁹ setting a maximum r^2 threshold at 0.85.

Functional evaluation of SNPs effect on microRNA regulation. We assessed the possible functional effect of rs1047383 and two other variants found in LD with it (rs708910 and rs1047381), all located in the 3'UTR of the *PLCB1* gene. To do that, we used a luciferase reporter system to test the possible impact of these SNPs on the regulation of gene expression mediated by miRNAs, as previously described¹². The prediction tools FuncPred, mirWalk, mirSNP, mrSNP, mirdSNP, miRNASNP and RNAhybrid were used to select miRNAs which binding sites in *PLCB1* is potentially affected by these SNPs. We chose the best predictions for each SNP: for rs1047383, hsa-miR-124-1, hsa-miR-139, hsa-miR-140, hsa-miR-144, hsa-miR-377, hsa-miR-506, has-miR-548h, hsa-miR-1324 and hsa-mir-3148; and for rs708910, hsa-miR-582 and hsa-miR-140. All miRNAs were cloned into a pCMV-MIR vector (OriGene, Rockville, MD, USA) and expression was confirmed after transfection into HeLa or HEK293 cells by qRT-PCR using the miScript PCR System (Qiagen, Hilden, Germany). Two regions from the 3'UTR of the *PLCB1* gene were cloned in the pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, Madison, WI, USA): one fragment of the 3'UTR of the *PLCB1* gene containing SNP rs1047383 (hg19/chr20:8,864,935–8,865,116; 182 bp) and another one containing SNPs rs708910 and rs1047381 (hg19/chr20:8,864,108–8,864,373; 267 bp). All the constructs were used to test the effect of the selected miRNAs in HeLa or in HEK293 cells. Luciferase expression was assessed using the Dual-luciferase Reporter Assay System (Promega). As our data did not follow a normal distribution (tested using Shapiro-Wilk test), differences between

the two conditions were evaluated with the nonparametric Mann-Whitney U-test using the SPSS statistics software version 22.0 (IBM, Armonk, NY, USA), and $P < 0.05$ was considered significant.

Effect of cocaine on *PLCB1* expression. To assess the possible impact of cocaine on *PLCB1* expression we used data available from previous studies. Data from nucleus accumbens samples of human cocaine abusers (10 cases and 10 controls matched by age, race, sex and brain pH) were kindly provided by the authors⁴⁰. When comparing differences between the expression levels of *PLCB1* between cases and controls, we considered the ratio between each case with its matched control. Normality of ratio was confirmed by using Shapiro-Wilk test ($P = 0.91$). Thus, the null hypothesis that the ratio is one, was tested with the parametric Student's t test, using the SPSS statistics software version 22.0 and considering $P < 0.05$ as significant. Furthermore, we also used RNA samples obtained in a previous study from our group on the effect of cocaine on gene expression¹². In this study we generated a human dopaminergic neuron-like model (differentiated SH-SY5Y cells) and RNA samples were obtained at different time points after an acute cocaine exposure (30 min). Samples were retrotranscribed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). For the present study, we assessed *PLCB1* expression by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) using LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche Life Sciences, Branford, CT, USA), and relative quantification was performed as previously described, using *GAPDH* and *ACTB* as reference genes¹². As we only have three replicates for each condition, differences between conditions were evaluated with a t-student test⁴¹ using SPSS statistics software version 22.0.

Ethics statement. This study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from all adult subjects, children and their parents according to the Helsinki declaration.

Results

In this study we evaluated the contribution to drug dependence predisposition of SNPs located in the 3'UTR of genes expressed in the brain that are predicted to alter the binding of miRNA molecules.

We performed a case-control association study in a sample of 735 drug-dependent patients and 739 sex-matched controls from Spain. A total of 59 SNPs in 56 genes were finally evaluated (from the 62 SNPs that were genotyped, one showed poor genotyping and two were not in HWE). The comparison of genotype frequencies between cases and controls under the log-additive model showed nominally significant differences before adjusting by age for seven SNPs located in the genes *SCD5*, *ID11*, *FBXO45*, *GRIA2*, *PLCB1*, *SPOCK3* and *QDPR* (Table 2 and Supplementary Table S1). These associated SNPs were subsequently evaluated in an independent Spanish sample of 663 drug-dependent patients and 667 sex-matched controls and the association remained significant for rs1285 in the *ID11* gene ($P = 0.034$; OR = 1.32, CI = [1.02–1.71]) and rs1047383 in the *PLCB1* gene ($P = 1.6e-03$; OR = 1.37, CI = [1.13–1.67]). In the first one the direction of the effect was not the same in the discovery and replication samples, but it was so for the rs1047383 association, which also survived the Bonferroni correction (Table 2 and Supplementary Table S2). In the pooled analysis of both the discovery and replication samples, only rs1047383 in the *PLCB1* gene remained associated with the disorder ($P = 3.7e-04$; OR = 1.29, CI = [1.12–1.49], Table 2 and Supplementary Table S3), with a higher frequency of subjects carrying the C allele in the group of drug-dependent subjects (39%) as compared to controls (35%). This association withstood the Bonferroni correction for multiple testing. Finally, we also explored these results in the subgroup of cocaine-dependent patients, including patients where cocaine is one of multiple drugs of abuse or the only one (about 75% of our patients' sample), and the association remained significant both in the discovery sample (551 cases; $P = 0.03$; OR = 1.25, CI = [1.02–1.53]) and in the replication sample (478 cases; $P = 0.01$; OR = 1.35, CI = [1.05–1.73]), and also in the pooled analysis (1,029 cases; $P = 5.7e-03$; OR = 1.26, CI = [1.07–1.48]).

We selected nine different miRNAs that potentially target the 3'UTR of *PLCB1*, with their binding being predicted to be affected by variation in rs1047383. No regulatory effect on *PLCB1* expression was observed for any of the assayed miRNAs using a gene reporter system in HeLa cells. We then investigated the existence of SNPs in LD with rs1047383 and found two polymorphisms, rs6056229 and rs708910 ($r^2 = 1$ and 0.88, respectively). The first one is located outside the *PLCB1* gene and we could not find any functional prediction for it. The latter is located within the 3'UTR of *PLCB1* and is predicted to alter a binding site for several miRNAs by the FuncPred software. This SNP is only 25 bp distant from another SNP, rs1047381, which is in moderate LD with the associated variant in our Spanish sample ($r^2 = 0.61$). To test this, we used a construct that includes both SNPs and assessed the possible effect of the two most frequent haplotypes (rs1047381C-rs708910G and rs1047381T-rs708910A) on the regulation mediated by hsa-miR-140 and hsa-miR-582. No differences were observed in HeLa cells, but in this cell line hsa-miR-582 could not be successfully overexpressed upon transfection. For this reason we repeated the experiment in HEK293 and observed that hsa-miR-582 decreases *PLCB1* expression (25%, $P = 3.96e-03$, Supplementary Figure 2), but without differences between the two rs1047381-rs708910 haplotypes.

Previous studies had reported that two genes (*NFAT5* and *NTNG1*) with altered expression under cocaine also bear variants that confer susceptibility to cocaine dependence as shown by association studies^{11,12}. Since we have shown that *PLCB1* is involved in the vulnerability to cocaine dependence, we explored the possibility that its expression is altered by the action of cocaine. For that purpose we used data from a previous study using samples from nucleus accumbens of human cocaine abusers⁴⁰. The sample's mean expression levels of *PLCB1* gene were increased by 1.19-fold ($P = 0.012$) when we compared each case with its matched control. Furthermore, we investigated the effect of cocaine on the regulation of *PLCB1* in a human neuron-like dopaminergic model (differentiated SH-SY5Y cells) using samples previously produced in our lab¹². We have now performed qRT-PCR experiments in this model and, interestingly, a significant upregulation of *PLCB1* after cocaine treatment was observed, showing a maximum of 1.65-fold increase ($P = 5.8e-03$) as compared to untreated cells (Fig. 2).

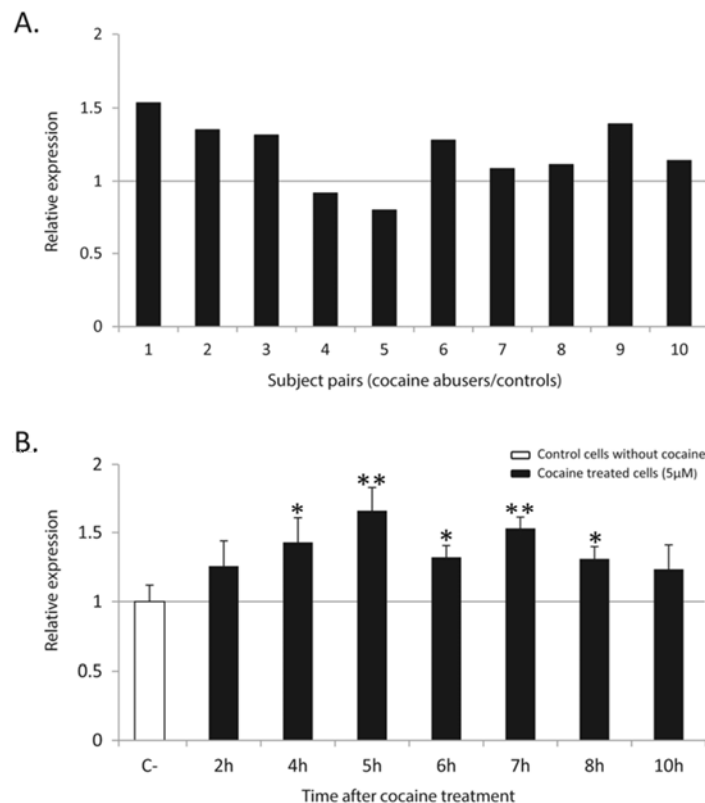


Figure 2. Expression of the *PLCB1* gene after treatment with cocaine. **(A)** Expression levels in the nucleus accumbens of cocaine abusers compared with their matched controls. **(B)** Transcription levels in human dopaminergic neuron-like cells (differentiated SH-SY5Y) at different time points after a 30-min exposure to 5 μM cocaine. Significant differences compared to control cells (not exposed to cocaine) normalized to *GAPDH* are indicated. Error bars indicate s.d. **p*-value < 0.05, ***p*-value < 0.01.

Discussion

In this study we explored, for the first time, the possible role in drug dependence of SNPs located in the 3'UTR of genes potentially altering the binding of the corresponding mRNA to miRNA molecules. These SNPs were selected on the basis of a previous study³² which listed variants located in binding sites for the AGO2 protein, one of the molecules of the RNA-induced silencing complex (RISC) that interacts with both the miRNA and the mRNA. We found that the rs1047383 variant in the *PLCB1* gene is associated with drug dependence in two independent samples. Then we investigated a possible effect of this SNP and rs1047381-rs708910 (in LD with rs1047383) on miRNA binding, with negative results for all the tested miRNAs (a total of 10 out of 35 predictions identified in the databases we used). The only exception was hsa-miR-582, which reduced gene expression but with no differences between the two rs1047381-rs708910 haploalleles. It is important to note that, although many prediction tools are available, the degree of overlap of the different outputs is often limited¹⁴, so ranking the predictions is not straightforward.

The *PLCB1* gene encodes the Phospholipase C beta 1 protein expressed in the brain, mainly in cortex, hippocampus and amygdala. It is considered a molecular mediator of synaptic plasticity and it plays an important role in modulating cognitive behavior and emotions^{42, 43}. Many neurotransmitters such as dopamine, serotonin and glutamate activate PLCβ1 by a G-protein-coupled receptor that signals through G_{q/11}⁴⁴⁻⁴⁷. Furthermore, *PLCB1* has previously been related to other psychiatric and neurological disorders such as schizophrenia, autism and epilepsy⁴⁸⁻⁵².

Several lines of evidence support a role for *PLCB1* in drug dependence. A region of overlapping clusters of SNPs in the *PLCB1* gene were identified in a previous study that assessed common genomic regions in two GWAS of illegal substance dependence and cocaine dependence⁵³. However, in another GWAS reported by Gelernter *et al.* in 2014⁵⁴ none of the *PLCB1* SNPs showed a suggestive association ($P < 1e-05$) with cocaine dependence. These discordant results might be explained by differences in the case-control designs, as the controls used in their study⁵⁴ were individuals not dependent to cocaine who had taken this drug at least once in their lives and, in our study, the controls were individuals from the general population. Also, increased *Plcb1* expression was

previously described in the nucleus accumbens of mice after administration of cocaine during 7 days and also during withdrawal⁵⁵. This is consistent with our results, in which we identified increased expression in both the nucleus accumbens of human cocaine abusers and in cultured dopaminergic-like human neurons treated with cocaine. Furthermore, a previous study of our group identified changes in the expression of *PLCB1* in a mouse model of frustrated expected reward⁵⁶.

In conclusion, although we could not prove that the SNP found associated with the phenotype alters miRNA-mediated regulation of gene expression, our data provide evidence for the contribution of the *PLCB1* gene to cocaine dependence, identifying an associated variant that was replicated in a second sample, as well as alterations in the expression of *PLCB1* induced by cocaine.

Several strengths and limitations of the present study should be discussed. Strengths: i) To minimize sample heterogeneity, both patients and controls in the discovery and replication samples were recruited in the same small geographical area around Barcelona (Spain); cases and controls were Spanish, Caucasian and sex-matched; ii) cases were evaluated by following a unique clinical assessment; iii) the associated variant was replicated in a second independent sample; iv) altered expression of *PLCB1* induced by cocaine was seen in human brain post-mortem samples and also in a human neuron-like model, with the same direction; v) previous studies are in agreement with our findings at *PLCB1* both in the association and expression studies. Limitations: i) The disease phenotype was not excluded in the control samples, which may have potentially diluted positive findings in the association study; ii) the sample size, 1398 cases and 1406 controls, is relatively small and may have led to false negative results; iii) the associated variant could not be proven to have a functional effect on the binding of any of the tested miRNAs, although it could have an effect on other non-investigated miRNAs; iv) changes in *PLCB1* expression levels could be proven at mRNA level but we could not test the protein as samples were not available for this type of analysis.

In conclusion, a variant in the *PLCB1* gene was found associated with drug dependence in two independent samples. Although the sample size is altogether relatively small, the results obtained in the discovery sample have been replicated. Also, the expression of *PLCB1* was found to be altered by cocaine. Together with previous results, this study highlights *PLCB1* as a gene that may contribute to drug dependence. Finally, these findings and previous results from our and other groups on *NFAT5* and *NTNG1*^{11,12} suggest that genes which expression is altered by the effect of drugs of abuse may play an important role in the susceptibility to drug dependence.

References

1. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction(EMCDDA). *European Drug Report. Trends and Developments* (2016).
2. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction(EMCDDA). *National report to the EMCDDA by the Reitox National Focal Point 2014. Health (San Francisco)* (2014).
3. Palmer, R. H. C. *et al.* Genetic Etiology of the Common Liability to Drug Dependence: Evidence of Common and Specific Mechanisms for DSM-IV Dependence Symptoms. *Drug Alcohol Depend* **123**, S24–S32 (2012).
4. Xian, H. *et al.* Genetic and environmental contributions to nicotine, alcohol and cannabis dependence in male twins. *Addiction* **103**, 1391–1398 (2008).
5. Ozburn, A. R., Janowsky, A. J. & Crabbe, J. C. Commonalities and Distinctions Among Mechanisms of Addiction to Alcohol and Other Drugs. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **39**, 1863–1877 (2015).
6. Bevilacqua, L. & Goldman, D. Genes and addictions. *Clin. Pharmacol. Ther.* **85**, 359–361 (2009).
7. Bühler, K. M. *et al.* Common single nucleotide variants underlying drug addiction: More than a decade of research. *Addict. Biol.* **20**, 845–871 (2015).
8. Goldman, D., Oroszi, G. & Ducci, F. The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 521–32 (2005).
9. Hall, F. S., Drgonova, J., Jain, S. & Uhl, G. R. Implications of genome wide association studies for addiction: Are our a priori assumptions all wrong? *Pharmacol. Ther.* **140**, 267–279 (2013).
10. Zhou, Z., Enoch, M. A. & Goldman, D. Gene Expression in the Addicted Brain. *Int Rev Neurobiol* **116**, 251–273 (2014).
11. Kelai, S. *et al.* Netrin g1: Its downregulation in the nucleus accumbens of cocaine-conditioned mice and genetic association in human cocaine dependence. *Addict. Biol.* 1–13, doi:10.1111/adb.12485 (2017).
12. Fernández-Castillo, N. *et al.* Transcriptomic and genetic studies identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence. *Transl. Psychiatry* **5**, e667 (2015).
13. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–39 (2009).
14. Afonso-Grunz, F. & Müller, S. Principles of miRNA–mRNA interactions: beyond sequence complementarity. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 3127–3141 (2015).
15. Gulyaeva, L. F. & Kushlinskiy, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J. Transl. Med.* **14**, 143 (2016).
16. Nampoothiri, S. S. & Rajanikant, G. K. Decoding the ubiquitous role of microRNAs in neurogenesis. *Mol. Neurobiol.* doi:10.1007/s12035-016-9797-2 (2016).
17. Stappert, L., Roese-Koerner, B. & Brüstle, O. The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification. *Cell Tissue Res* **359**, 47–64 (2015).
18. Kolshus, E., Dalton, V. S., Ryan, K. M. & McLoughlin, D. M. When less is more—microRNAs and psychiatric disorders. *Acta Psychiatr. Scand.* **129**, 241–56 (2014).
19. Im, H.-I. & Kenny, P. J. MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. *Trends Neurosci.* **35**, 325–34 (2012).
20. Luoni, A. & Riva, M. A. MicroRNAs and psychiatric disorders: From aetiology to treatment. *Pharmacol. Ther.* **167**, 13–27 (2016).
21. Hollins, S. L. & Cairns, M. J. MicroRNA: Small RNA mediators of the brains genomic response to environmental stress. *Prog. Neurobiol.* **143**, 61–81 (2016).
22. Lewohl, J. M. *et al.* Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res* **35**, 1928–1937 (2011).
23. Chandrasekar, V. & Dreyer, J.-L. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate Cocaine-induced Plasticity. *Mol. Cell. Neurosci.* **42**, 350–362 (2009).
24. Chandrasekar, V. & Dreyer, J.-L. Regulation of MiR-124, Let-7d, and MiR-181a in the Accumbens Affects the Expression, Extinction, and Reinstatement of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference. *Neuropsychopharmacology* **36**, 1149–1164 (2011).
25. Hollander, J. A. *et al.* Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature* **466**, 197–202 (2010).
26. Im, H.-I., Hollander, J. A., Bali, P. & Kenny, P. J. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat. Neurosci.* **13**, 1120–1127 (2010).
27. Pietrzykowski, A. Z. *et al.* Posttranscriptional Regulation of BK Channel Splice Variant Stability by miR-9 Underlies Neuroadaptation to Alcohol. *Neuron* **59**, 274–287 (2008).

28. Doura, M. B. & Unterwald, E. M. MicroRNAs Modulate Interactions between Stress and Risk for Cocaine Addiction. *Front. Cell. Neurosci* **10**, 125 (2016).
29. Vosa, U., Esko, T., Kasela, S. & Annilo, T. Altered gene expression associated with microRNA binding site polymorphisms. *PLoS One* **10**, 1–24 (2015).
30. Saunders, M. A., Liang, H. & Li, W.-H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc. Natl. Acad. Sci* **104**, 3300–3305 (2007).
31. Borel, C. & Antonarakis, S. E. Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. *Mamm. Genome* **19**, 503–509 (2008).
32. Boudreau, R. L. *et al.* Transcriptome-wide discovery of microRNA binding sites in human brain. *Neuron* **81**, 294–305 (2014).
33. First, M. B., Spitzer, S. R., Gibbon, M. & Williams, J. B. M. *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID)*. (American Psychiatric Press, 1997).
34. Fernández-Castillo, N. *et al.* Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence. *Genes. Brain. Behav* **12**, 39–46 (2013).
35. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1215 (1988).
36. Compton, W. M., Thomas, Y. F., Stinson, F. S. & Grant, B. F. Prevalence, Correlates, Disability, and Comorbidity of DSM-IV Drug Abuse and Dependence in the United States. *Arch. Gen. Psychiatry* **64**, 566 (2007).
37. Gonzalez, J. R. *et al.* SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* **23**, 654–655 (2007).
38. Sánchez-Mora, C. *et al.* Case–Control Genome-Wide Association Study of Persistent Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Identifies FBXO33 as a Novel Susceptibility Gene for the Disorder. *Neuropsychopharmacology* **40**, 915–926 (2015).
39. Barrett, J. C. Haploview: Visualization and analysis of SNP genotype data. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2009**, pdb.ip71 (2009).
40. Albertson, D. N. *et al.* Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: Evidence for dysregulation of myelin. *J. Neurochem* **88**, 1211–1219 (2004).
41. Winter, J. Using the Student's *t*-test with extremely small sample sizes. *Pr. Assessment, Res. Evaluation* **18**, 1–12 (2013).
42. McOmish, C. E., Burrows, E. L., Howard, M. & Hannan, A. J. PLC- β 1 knockout mice as a model of disrupted cortical development and plasticity: Behavioral endophenotypes and dysregulation of RGS4 gene expression. *Hippocampus* **18**, 824–834 (2008).
43. Caricasole, A., Sala, C., Roncarati, R., Terstappen, G. C. & Formenti, E. Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 (PLC β 1). *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res* **1517**, 63–72 (2000).
44. Choi, S.-Y. *et al.* Multiple Receptors Coupled to Phospholipase C Gate Long-Term Depression in Visual Cortex. *J. Neurosci.* **25**, (2005).
45. Wallace, M. A. & Claro, E. Comparison of serotonergic to muscarinic cholinergic stimulation of phosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain cortical membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255** (1990).
46. Wallace, M. A. & Claro, E. A novel role for dopamine: inhibition of muscarinic cholinergic-stimulated phosphoinositide hydrolysis in rat brain cortical membranes. *Neurosci. Lett.* **110**, 155–161 (1990).
47. Kim, D. *et al.* Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* **389**, 290–293 (1997).
48. St Pourcain, B. *et al.* Variability in the common genetic architecture of social-communication spectrum phenotypes during childhood and adolescence. *Mol. Autism* **5**, 18 (2014).
49. Girirajan, S. *et al.* Refinement and discovery of new hotspots of copy-number variation associated with autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.* **92**, 221–37 (2013).
50. Schoonjans, A.-S. *et al.* PLCB1 epileptic encephalopathies; Review and expansion of the phenotypic spectrum. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **20**, 474–9 (2016).
51. Udawela, M., Scarr, E., Hannan, A. J., Thomas, E. A. & Dean, B. Phospholipase C beta 1 expression in the dorsolateral prefrontal cortex from patients with schizophrenia at different stages of illness. *Aust. N. Z. J. Psychiatry* **45**, 140–147 (2011).
52. Lo Vasco, V. R., Cardinale, G. & Polonia, P. Deletion of PLCB1 gene in schizophrenia-affected patients. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 844–51 (2012).
53. Drgon, T. *et al.* 'Replicated' genome wide association for dependence on illegal substances: genomic regions identified by overlapping clusters of nominally positive SNPs. **156** (2), 125–138 (2012).
54. Gelernter, J. *et al.* Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol. Psychiatry* **19**, 717–723 (2014).
55. Eipper-Mains, J. E. *et al.* Effects of cocaine and withdrawal on the mouse nucleus accumbens transcriptome. *Genes, Brain Behav* **12**, 21–33 (2013).
56. Martín-García, E. *et al.* Frustrated expected reward induces differential transcriptional changes in the mouse brain. *Addict. Biol.* **20**, 22–37 (2015).

Acknowledgements

We are grateful to all the patients, their families and clinical collaborators who contributed to the recruitment of patients (Drs. N. Martínez-Luna, A.C. Abad, J. Alvarós, A. Egido, and M. Robles). We are very grateful to all the healthy participants and the Blood and Tissues Bank of Barcelona who contributed to their recruitment. We thank Michael Bannon for kindly providing us with the transcriptomic data from the study in human post-mortem samples. J.C.-D. and N.F.-C. were supported by contracts from the 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras' (CIBERER) and L.P.-C. with a contract of the 'Ministerio de Educación, Cultura y Deporte' (FPU15/03867) of the Spanish Government. J.C.-D. and L.P.-C. were also supported by 'Generalitat de Catalunya' (2015 FI_B 00448 and 2016 FI_B00728, respectively) and N.F.-C. was awarded with an EMBO short-term fellowship (ASTF 573-2016). Major financial support for this research was received by B.C. from the Spanish 'Ministerio de Economía y Competitividad' (SAF2015-68341-R) and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2014SGR932). M.R. is a recipient of a Miguel de Servet contract from the 'Instituto de Salud Carlos III', Spain (CP09/00119 and CP115/00023) and received financial support from 'Instituto de Salud Carlos III' (PI12/01139, PI14/01700, PI15/01789 and PI16/01505), by the European Regional Development Fund (ERDF) and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2014SGR1357 and 2014SGR0932) and the NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation. C.R. received financial support by 'Instituto de Salud Carlos III' (PI13/1911) and 'Plan Nacional Sobre Drogas' (2013/044). We were also supported by the European Community's Seventh Framework Program (under grant agreement number 602805, Aggressotype), the European Community's H2020 Program (under grant agreement number 667302, CoCA) and the ECNP network "ADHD across the lifespan".

Author Contributions

J.C.-D. performed the association study, the miRNA functional studies, the expression study of *PLCB1* and the statistical analysis; C.R., R.F.P.-A., E.R.-C., L.G.-L., A.E. and J.A.R.-Q. and M.C. participated in the recruitment of patients and clinical assessment and coordinated the clinical research; J.C.-D., L.P.-C. and N.F.-C. isolated genomic DNA from samples; C.A. participated in the statistical analysis; J.C.-D., B.C. and N.F.-C. designed the study; J.C.-D. prepared the first draft of the manuscript and all figures and tables; B.C., N.F.-C. and M.R. coordinated the study and supervised the manuscript preparation. All authors contributed to and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-10207-2

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



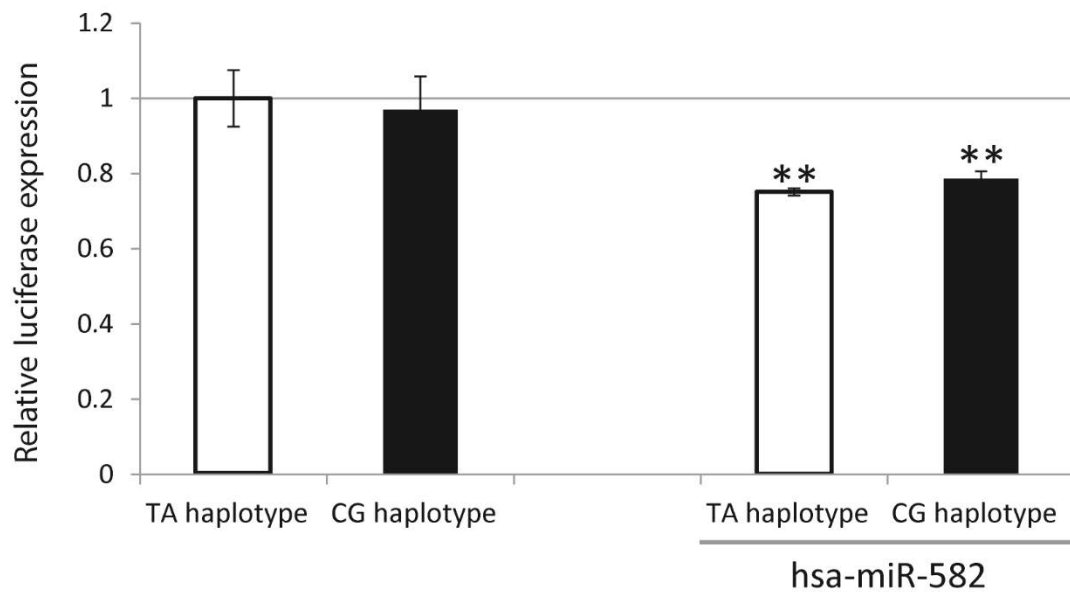
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

Supplementary data for:

ASSOCIATION OF THE *PLCB1* GENE WITH DRUG DEPENDENCE

Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Laura Pineda-Cirera, R. Felipe Palma-Álvarez, Elena Ros-Cucurull, Lara Grau-López, Abderaman Esojo, Miquel Casas, Concepció Arenas, Josep Antoni Ramos-Quiroga, Marta Ribasés, Noèlia Fernàndez-Castillo, Bru Cormand



Supplementary Figure 1. Effect of rs708910 on miRNA-based regulation of gene expression. Relative luciferase expression of the pmirGlo vector with the 3'UTR region of *PLCB1* containing the rs1047381-rs708910 T-A and C-G haplotypes in the presence and absence of hsa-miR-582. **p-value < 0.01

Table S1. SNPs associated with drug dependence in the discovery sample: 735 cases and 739 controls.

Marker	Locus	Genotypes (11-12-22)						Sum	p-value ¹	Adj p-value ²	Adj.(OR -95%CI) ²	
		Controls N (%)			Cases N (%)							
		11	12	22	11	12	22					
rs6840	SCD5	341 (46.5)	317 (43.2)	76 (10.3)	734	284 (39.2)	355 (49.0)	86 (11.8)	725	0.011	0.025	1.24 (1.03-1.50)
rs1285	ID1	491 (66.6)	231 (31.4)	15 (2.0)	737	535 (72.9)	181 (24.7)	18 (2.4)	734	0.029	0.116	1.22 (0.95-1.54)*
rs1872353	FBXO45	455 (61.8)	248 (33.7)	33 (4.5)	736	484 (66.4)	222 (30.4)	23 (3.2)	729	0.044	0.177	1.16 (0.93-1.45)*
rs6855973	GRIA2	483 (65.4)	228 (30.8)	28 (3.8)	739	514 (70.0)	208 (28.4)	12 (1.6)	734	0.014	0.114	1.20 (0.95-1.54)*
rs1047383	PLCB1	307 (41.6)	339 (45.9)	92 (12.5)	738	269 (36.6)	356 (48.5)	109 (14.9)	734	0.039	9.6e-03	1.27 (1.06-1.53)
rs1057377	SPOCK3	343 (46.5)	329 (44.6)	66 (8.9)	738	393 (53.6)	277 (37.8)	63 (8.6)	733	0.026	0.033	1.23 (1.02-1.49)*
rs2597775	QDPR	341 (46.2)	322 (43.6)	75 (10.2)	738	307 (41.9)	330 (45.1)	95 (13.0)	732	0.043	0.439	1.08 (0.89-1.30)

¹Log-additive model; ²Adjusted by age; * When OR<1 the inverted score is shown. In bold: nominally significant p-values

Table S2. SNPs associated with drug dependence in the replication sample: 663 cases and 667 controls.

Marker	Locus	Genotypes (11-12-22)						Sum	p-value ¹	Adj p-value ²	Adj.(OR -95%CI) ²	
		Controls N (%)			Cases N (%)							
		11	12	22	11	12	22					
rs6840	SCD5	295 (44.7)	291(44.1)	74 (11.2)	660	295 (44.8)	283 (42.9)	81 (12.3)	659	0.785	0.420	-
rs1285	ID1	492 (74.4)	157 (23.8)	12 (1.8)	661	453 (68.8)	182 (27.7)	23 (3.5)	658	0.010	0.034	1.32 (1.02-1.71)
rs1872353	FBXO45	407 (61.4)	229 (34.5)	27 (4.1)	663	447 (67.6)	186 (28.2)	28 (4.2)	661	0.051	3.8e-03	-
rs6855973	GRIA2	458 (69.3)	186 (28.1)	17 (2.6)	661	452 (68.5)	191 (28.9)	17 (2.6)	660	0.779	0.486	-
rs1047383	PLCB1	284 (42.7)	289 (43.5)	92 (13.8)	665	213 (32.4)	351 (53.3)	94 (14.3)	658	3.8e-03	1.5e-03	1.37 (1.13-1.67)
rs1057377	SPOCK3	349 (52.6)	253 (38.1)	62 (9.3)	664	331 (50.3)	265 (40.3)	62 (9.4)	658	0.516	0.945	-
rs2597775	QDPR	293 (44.3)	294 (44.4)	75 (11.3)	662	294 (44.8)	267 (40.6)	96 (14.6)	657	0.461	0.794	-

¹Log-additive model; ²Adjusted by age; In bold: nominally significant p-values

Table S3. SNPs associated with drug dependence in the pooled sample: 1393 cases and 1406 controls.

Marker	Locus	Genotypes (11-12-22)						Sum	p-value ¹	Adj p-value ²	Adj.(OR -95%CI) ²
		Controls N (%)			Cases N (%)						
		11	12	22	11	12	22				
rs1285	<i>ID1</i>	983 (70.3)	388 (27.8)	27 (1.9)	1398	988 (71)	363 (26.1)	41 (2.9)	1392	0.857	0.754
rs1047383	<i>PLCB1</i>	591 (42.1)	628 (44.8)	184 (13.1)	1403	482 (34.6)	707 (50.8)	203 (14.6)	1392	4.8e-04	3.7e-04

¹Log-additive model; ² Adjusted by age; in bold: nominally significant p-values.

ANNEX A L'ARTICLE 2

CONTRIBUCIÓ DEL GEN *PLCB1* A LA DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA MITJANÇANT LA UTILITZACIÓ D'UN MODEL MURÍ D'AUTOADMINISTRACIÓ DE COCAÏNA.

1. ANTECEDENTS

L'estudi d'associació cas-control en pacients dependents de cocaïna, juntament amb els estudis d'expressió gènica en mostres *post-mortem* d'individus amb abús de cocaïna i en cèl·lules dopaminèrgiques en cultiu tractades amb cocaïna (Article 2 d'aquesta Tesi) van permetre identificar el gen *PLCB1* com a possible candidat a la dependència de cocaïna. El gen *PLCB1* s'expressa, sobretot, a l'escorça cerebral i l'hipocamp, dues àrees molt importants en l'establiment de la dependència i en la generació de records associats a la droga que donen lloc a la recaiguda (Bisagno, González i Urbano, 2016; Castilla-Ortega *et al.*, 2016, 2017; Kutlu i Gould, 2016; Pitts, Taylor i Gourley, 2016).

Hi ha un model murí genoanul·lat pel gen *Plcb1*, descrit prèviament (Kim *et al.*, 1997). Els ratolins homozigots per la mutació presenten defectes en el creixement, infertilitat i baixa viabilitat, associada a atacs epilèptics recurrents que causen la mort sobtada dels animals a les poques setmanes de vida. El model heterozigot, tot i que no s'ha caracteritzat fenotípicament, semblaria ser normal i fèril.

En base als resultats obtinguts en aquest estudi vam voler avaluar la participació d'aquest gen en l'establiment de la dependència de cocaïna mitjançant l'ús d'un model animal d'autoadministració de la droga. Aquest projecte es va dur a terme en col·laboració amb el grup de Neurofarmacologia de la Universitat Pompeu Fabra (UPF) liderat pel Dr. Rafael Maldonado.

2. METODOLOGIA I RESULTATS

Tots els experiments es van realitzar amb ratolins CB6J mascles heterozigots per la mutació a *Plcb1* (HZ) i els ratolins control de la soca salvatge (WT) de la mateixa camada, donada la baixa viabilitat dels homozigots mutants. Els animals es van mantenir individualitzats en condicions d'estabulació estables: temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ i humitat del $55\pm 10\%$. Tots els protocols experimentals es van dur a terme d'acord amb les guies descrites a la *European Communities Directive 86/609/EEC* que regulen la investigació amb animals i van ser aprovats pel comitè d'ètica local (CEEA-IMAS-UPF).

2.1 Caracterització fenotípica del model heterozigot genoanul·lat pel gen *Plcb1*.

Com que el model heterozigot no s'havia caracteritzat prèviament, es va realitzar una fenotipació bàsica del model tot comparant els animals WT amb els HZ. Tots els tests descrits en aquest apartat es van realitzar amb 25 ratolins WT i 12 HZ, excepte el test de les caixes metabòliques, que es va realitzar amb 6 animals de cada grup a causa de la limitació d'espai.

2.1.1 Valoració general de l'animal (test d'Irwin)

El test d'Irwin és un procediment observacional sistemàtic que s'utilitza per analitzar l'estat de salut general d'un ratolí: posició del cos, activitat locomotora, comportament anormal, tremolors, convulsions, alteracions en la respiració, etc. En aquest estudi no es van observar alteracions l'estat de salut general de cap ratolí.

2.1.2 Coordinació motora

El test de coordinació motora *rotaroad* consisteix en un cilindre rotatori elevat del terra que serveix per mesurar la coordinació motora, l'equilibri i la força de les extremitats. No es van observar diferències entre els animals WT i els HZ.

2.1.3 Caixes metabòliques

Aquest sistema permet monitoritzar durant les 24 hores la ingesta de menjar i aigua dels animals, així com enregistrar la seva activitat. D'aquesta manera es pot mesurar la compulsivitat, activitat i anhedònia (incapacitat d'experimentar plaer) en els animals analitzats. Prèviament a la realització del test d'anhedònia, els animals es van mantenir durant 15 dies en aquestes gàbies amb accés a dos dosificadors pel menjar i dos per a l'aigua, que contenien exactament el mateix producte, per habitudinar-se al sistema. Diàriament s'enregistrava el consum de cada compartiment i la seva activitat. Passat el període d'habitució es va realitzar el test d'anhedònia substituint un dels dosificadors d'aigua per aigua amb 2% sacarosa. Passades 24 hores es va retirar el dosificador amb sacarosa i es va substituir novament per aigua.

En condicions normals els animals prefereixen l'aigua amb sacarosa; en canvi, si l'animal presenta anhedònia, no s'observa aquesta preferència. En aquest test no es va poder observar diferències entre els animals WT i HZ (6 ratolins de cada grup). Únicament es va poder detectar un lleuger augment de l'activitat vertical dels animals HZ en relació als WT que no era estadísticament significativa.

2.1.4 Test d'activitat o actimetria

Aquest sistema permet enregistrar l'activitat locomotora horitzontal i vertical dels animals durant un període de temps determinat, dues hores en el nostre cas. En comparació amb els animals WT, els animals HZ presenten una activitat vertical més gran que és estadísticament significativa (Figura 1), com ja s'havia suggerit a les caixes metabòliques. L'activitat vertical presenta correlació amb un comportament exploratori de l'animal, i molts autors ho relacionen amb un augment de l'ansietat (Lever, Burton i O'Keefe, 2006).

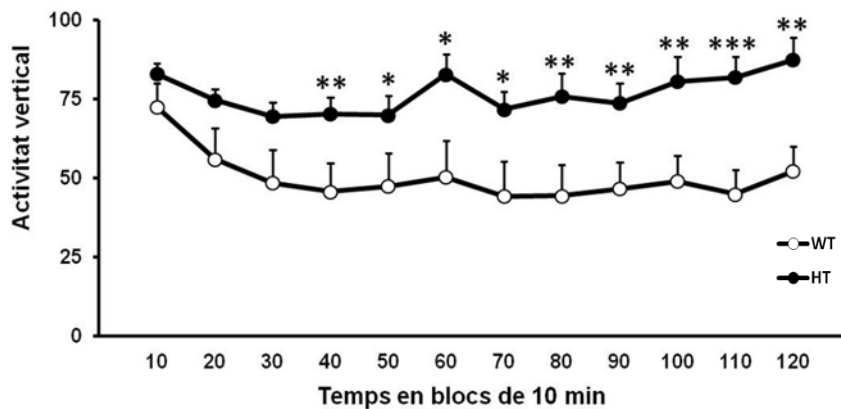


Figura 1. Resultats del test d'actimetria. Mesura de l'activitat vertical en base al nombre de vegades que els animals s'han posat drets sobre les dues potes posteriors en intervals de temps de 10 minuts. Animals WT en blanc (n = 25) i HZ en negre (n = 12). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.1.5 Test d'ansietat

Per mesurar l'ansietat dels animals es va utilitzar l'*Elevated plus maze* (EPM), un laberint alçat respecte el terra amb forma de creu, en el qual dos dels braços estan oberts i els altres dos parcialment tancats (Figura 2).

En condicions normals els ratolins prefereixen mantenir-se als braços tancats, però la seva curiositat exploratòria innata els incita a sortir cap als braços oberts. Quan els animals presenten nivells d'ansietat elevats es redueix aquesta tendència exploratòria.

En comparació amb els ratolins WT, els ratolins HZ entraven menys vegades i durant menys temps als braços oberts (Figura 3), indicant que hi ha un fenotip d'ansietat.

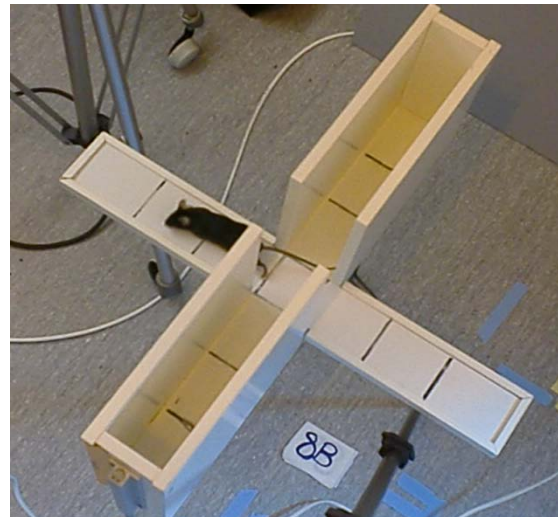


Figura 2. Imatge del test d'ansietat. L'*Elevated plus maze* (EPM) és un laberint alçat respecte el terra amb forma de creu que té dos braços oberts i dos braços parcialment tancats.

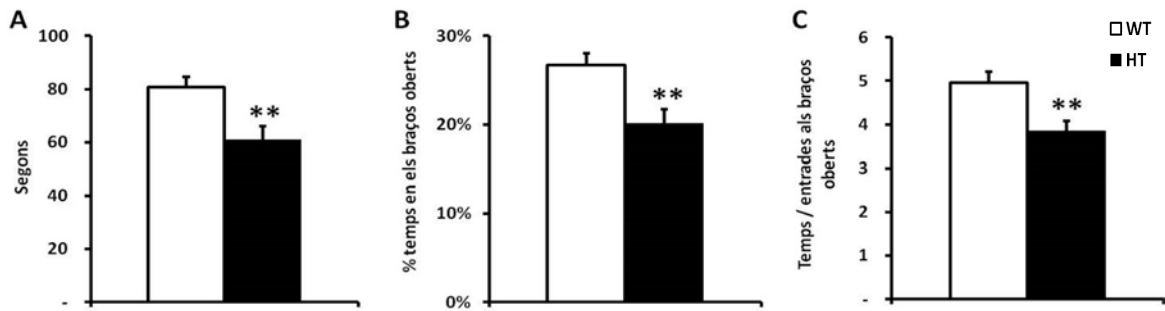


Figura 3. Resultats del test d'ansietat. A) Mitjana de temps total que els ratolins han estat als braços oberts, en segons. B) Percentatge de temps que els ratolins han estat als braços oberts en relació al temps total del test. C) Temps destinat als braços oberts en relació al nombre d'entrades als mateixos. Animals WT en blanc (n = 25) i HZ en negre (n = 12). Es representa la mitjana \pm error estàndard (SEM). ** $p < 0.01$.

2.1.6 Test de memòria a curt termini

El test de reconeixement d'un objecte nou (*Novel object recognition*, NOR) permet avaluar el funcionament de l'aprenentatge i la memòria dependent de l'hipocamp. Abans de la realització del test es realitza un entrenament en què l'animal pot examinar lliurement dos objectes idèntics durant 9 minuts. Passades 3 hores es torna a posar l'animal en contacte amb dos objectes: un idèntic al de l'entrenament i un de nou. Es considera que l'animal és capaç de recordar l'objecte antic si és capaç de discriminar-lo del nou, i per tant passar més temps examinant aquest últim. Per això s'utilitza el que es coneix com a índex de discriminació, que es calcula dividint el temps destinat a examinar l'objecte nou pel temps total d'exploració.

El test va mostrar que els ratolins HZ tenien un índex de discriminació menor que els ratolins WT, tot i que el temps total d'exploració no era significativament diferent entre els dos grups (Figura 4). Per tant es pot concloure que la capacitat d'aprenentatge i memòria hipocampal d'aquests ratolins està lleugerament afectada. Aquests resultats són consistents amb estudis previs que demostren la presència d'alteracions en la neurogènesi hipocampal en els ratolins genoanul·lats *P1cb1* homozigots (Manning *et al.*, 2012).

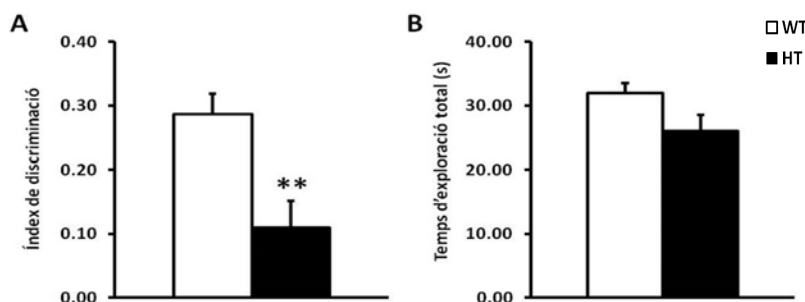


Figura 4. Resultats del test de memòria (NOR). A) Índex de discriminació = temps destinat a examinar l'objecte nou / temps total d'exploració. B) Temps d'exploració total. Animals WT en blanc (n=25) i HZ en negre (n=12). Es representa la mitjana \pm SEM. ** $p < 0.01$.

2.2 Generació d'un model d'autoadministració de cocaïna

Un cop completada la fenotipació dels ratolins es va realitzar el protocol d'autoadministració de cocaïna comparant els ratolins WT amb els HZ. A més, per a cadascun dels dos genotips es van afegir 6 animals control que s'autoadministraven una solució salina.

Tres dies abans de començar el protocol, els ratolins van ser intervinguts quirúrgicament per introduir-los un catèter intravenós a l'artèria jugular, a través del qual s'administrarà la cocaïna/salí (Soria *et al.*, 2005). L'hidroclorur de cocaïna es va obtenir del Ministeri de Sanitat i Consum (Espanya) i es va dissoldre en sèrum fisiològic 0,9%.

El protocol d'autoadministració es va realitzar en sessions diàries de 2 hores a les caixes d'autoadministració (Model ENV-307A-CT, Med Associates, Inc., Georgia, VT, USA), en les quals el ratolí pot controlar l'administració de cocaïna de forma automatitzada i controlada mitjançant l'ús de dos forats (*nose-pokes*), un actiu i un inactiu, assignats a l'atzar (Figura 5).

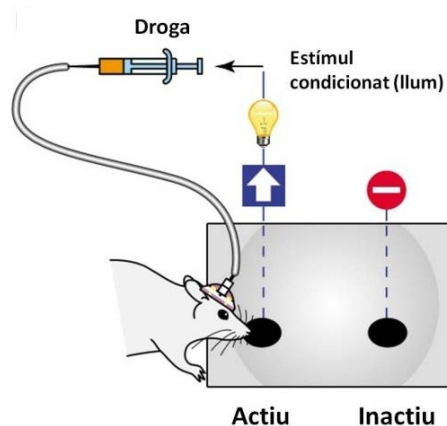


Figura 5. Esquema del mecanisme d'autoadministració. El forat actiu està associat a un estímul condicionat (llum) i a un sistema automatitzat que administra la droga, de forma que l'animal pot controlar l'administració. Adaptada de Jacobs *et al.*, 2003.

El protocol que es va emprar en aquest estudi consisteix en dues etapes d'adquisició de l'addicció (Figura 6). Inicialment 5 sessions de raó fixa 1 (FR1), en què cada cop que el ratolí posa el musell al forat actiu rep una dosi de cocaïna (0,5 mg/kg) o salí juntament amb un estímul lumínic, el qual s'associa a l'efecte de la droga (estímul condicionat). A continuació es fan 5 sessions més de raó fixa 3 (FR3) en què el ratolí ha de posar el musell al forat actiu 3 vegades per obtenir una sola dosi de cocaïna i un estímul lumínic.

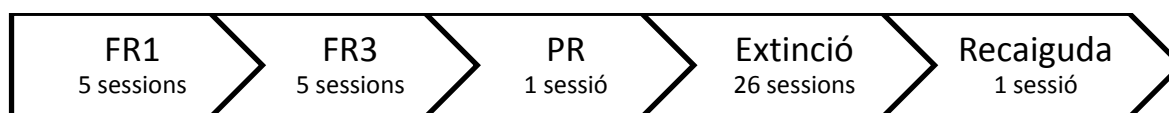


Figura 6. Esquema de les sessions d'autoadministració de cocaïna. FR: Raó fixa. PR: Raó progressiva.

Un cop acabada l'etapa d'adquisició es va testar la motivació del ratolí per la cocaïna amb un test de raó progressiva (PR; 1 sessió de 4 hores), en el qual es produeix un augment progressiu del nombre de vegades que s'ha de posar el musell al forat actiu (1, 3, 5, 7, 9, 15, 20, 25, 33, 43, 55, 70, 80, 90, 100) per obtenir una dosi de cocaïna. Un cop acabat aquest test es va determinar la viabilitat del catèter intravenós mitjançant l'administració de 0,1 ml de l'anestèsic tiopental sòdic (5mg/ml). Els animals que

no presenten símptomes d'anestèsia als 3 segons posteriors a la infusió, es considera que són tiopental negatius i es descarten de l'estudi.

A continuació es va realitzar l'extinció de l'adquisició. Aquestes sessions es duen a terme en les mateixes condicions que l'adquisició però no hi ha recompensa ni estímul lumínic associat, i es mantenen fins que els ratolins cessen en el comportament de cerca de la droga. Per últim, es va testar la possibilitat de recaiguda mitjançant una sessió en què s'estimula l'animal amb l'estímul lumínic associat a la recompensa sense administració de cocaïna, i s'observa el seu comportament (Figura 6).

En els nostres experiments vam partir de 52 animals WT i 36 animals HZ, dels quals només 37 WT i 28 HZ van sobreviure a la cirurgia i van donar positiu al test de tiopental. Totes les anàlisis s'han dut a terme considerant únicament els animals tiopental positius, ja que els resultats obtinguts en l'autoadministració en els tiopental negatius poden estar esbiaixats per la falta de viabilitat del catèter.

A l'inici del protocol (FR1), els animals HZ semblaven tenir una preferència més gran pel consum de cocaïna (Figura 7A). No obstant això, aquestes diferències no s'observaven durant FR3 o PR (Figura 7B), quan els animals havien de fer un esforç més gran per obtenir la recompensa. Aquests resultats suggereixen que els animals HZ són capaços d'aprendre el funcionament del sistema d'autoadministració i que la seva motivació per la cocaïna és comparable a la dels ratolins WT.

Un cop acabada l'adquisició es produeix la fase d'extinció, en la qual els animals se sotmeten a un període d'abstinència simulat. Arribat a aquest punt, els animals són estimulats amb l'estímul lumínic condicionat a la recompensa sense administració de cocaïna, per simular una recaiguda del consum per restabliment de la cerca de la droga. Es considera que l'animal restableix el comportament de cerca de la cocaïna si aquest estímul fa que l'animal torni a posar el musell de forma selectiva i reiterada al forat actiu, tot i que no hi hagi recompensa associada. En aquest test vam poder veure que tots els animals (WT i HZ) tractats amb cocaïna havien associat l'estímul lumínic al reforç de la cocaïna i recordaven quin era el forat actiu, ja que l'accionaven de forma reiterada, comparat amb el grup d'animals salins. Però el grup d'HZ tractats amb cocaïna cessava en aquest comportament abans que el WT, de manera que es podria considerar que aquest ratolins restableixen la cerca de cocaïna menys que els ratolins WT (Figura 7C).

Tots els resultats que es mostren en aquest estudi es van analitzar estadísticament mitjançant ANOVA, comparant els animals WT i HZ tractats amb cocaïna amb el programa SPSS 19.0, amb un llindar de significació de $p < 0.05$.

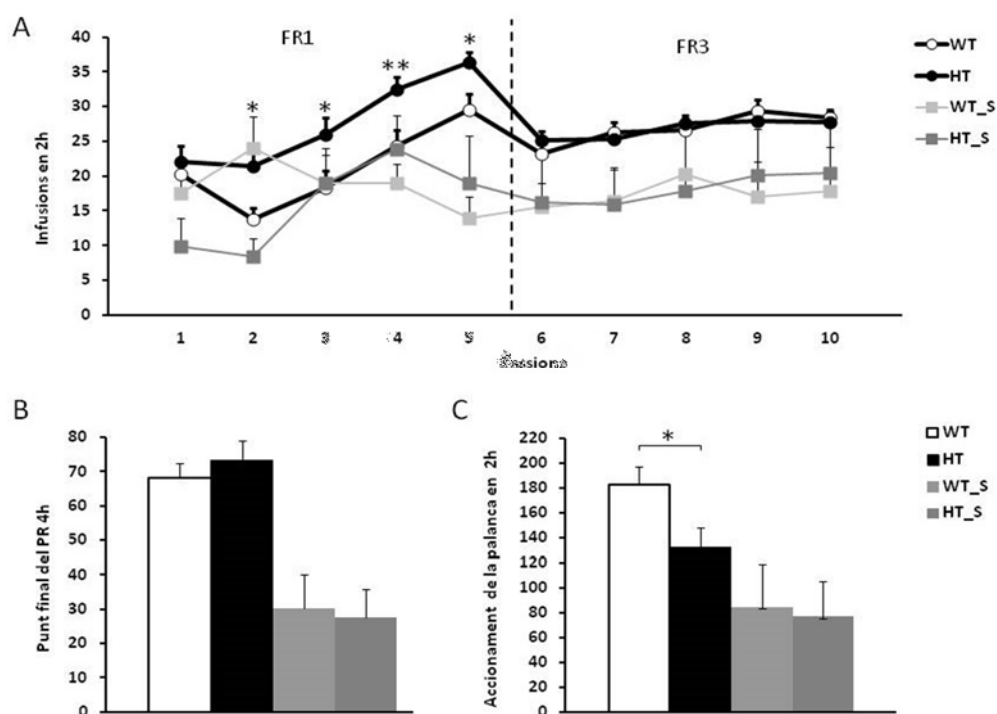


Figura 7. Resultats del test d'autoadministració de cocaïna. A) Mitjana del nombre d'infusions de cocaïna durant l'adquisició de l'addicció amb raó fixa 1 (FR1) i raó fixa 3 (FR3). B) Els gràfics mostren els resultats del test de raó progressiva (PR) i C) de la recaiguda induïda. Es representa la mitjana±SEM del nombre de vegades que s'ha activat el forat actiu durant el test. WT: animals de la soca salvatge (n=37); HZ: animals heterozigots per la mutació en *P1cb1* (n=28); WT_S i HZ_S: animals controls que s'autoadministren salí (n= 6 per genotip). Tots els tests mostren els resultats de la comparació entre WT i HZ que s'administren cocaïna. *p<0.05 **p<0.01.

2.3 Canvis d'expressió gènica induïts per la cocaïna

Immediatament després de la sessió de recaiguda, els animals van ser sacrificats. Es van seleccionar 12 animals WT i 12 HZ exposats a cocaïna per extreure mostres de 5 àrees cerebrals per estudis posteriors: escorça prefrontal medial (mPFC), hipocamp (HPC), nucli accumbens (NAc), nucli estriat dorsal (DS) i hipotàlem (HT). Les mostres de RNA de cada àrea dels 12 animals de cada genotip es van agrupar en 4 pools de 3 animals per analitzar-les mitjançant RNA-seq del mPFC i HPC. La construcció de la llibreria i seqüenciació (Illumina HiSeq 3000 amb lectures de 75 pb paired-end) es va fer al servei de genòmica del Centre de Regulació Genòmica (CRG, Barcelona, Espanya).

Aquestes dades van ser analitzades pel servei de Bioinformàtica del CRG. Breument, la qualitat de les seqüències es va testar amb l'eina FastQC v0.11.5, es van alinear amb el genoma de referència (GRCm38/mm10) fent servir STAR_2.5.3a (Dobin *et al.*, 2013) i es van determinar les diferències entre casos i controls fent servir el paquet DESeq2 de R (Love, Huber i Anders, 2014).

Es van comparar els perfils transcriptòmics dels ratolins WT i HZ que prèviament s'havien autoadministrat cocaïna, exposat al període d'abstinència i avaluat el restabliment de la cerca de la

droga. Els resultats obtinguts mostren 12 gens diferencialment expressats (DE) a HPC i 2,218 gens a mPFC. A causa del baix nombre de gens DE al HPC, les anàlisis posteriors es van realitzar únicament amb els resultats de mPFC. En primer lloc, es van classificar funcionalment tots els gens DE analitzant el seu enriquiment en les categories biològiques de GO (*Gene Ontology*) i les vies KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) fent servir el programa DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>).

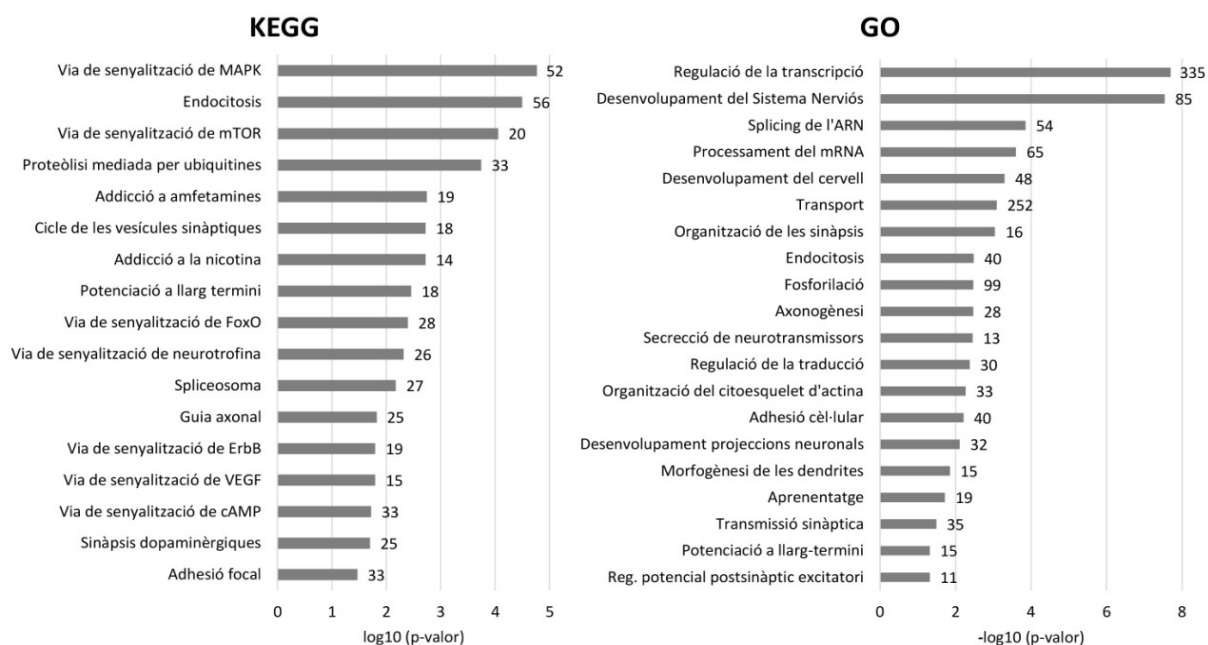


Figura 8. Categories i vies sobre-representades. Resultats més rellevants de l'enriquiment en les categories biològiques de GO i vies KEGG de tots els gens diferencialment expressats (DE) del mPFC. El nombre de gens DE per categoria està indicat al costat dret de la barra. p-valor ajustat segons Benjamin i Hochberg.

Es va detectar enriquiment en gens que participen en vies potencialment rellevants per a l'addició a cocaïna, com ara adhesió cel·lular, desenvolupament del cervell, guiatge axonal, organització de les sinapsis, transmissió sinàptica i potenciació a llarg termini, així com vies de senyalització importants com les MAPK, FoxO, mTOR o neurotrofines (Figura 8).

A continuació es van filtrar els gens DE del mPFC segons el seu canvi d'expressió (*fold-change* >1.2 o <-1.2), obtenint una llista de 238 gens amb la qual es van construir xarxes gèniques mitjançant IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*, QIAGEN Inc., Krämer *et al.*, 2014, <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis>). La xarxa amb una puntuació més elevada (62) inclou 31 gens DE i està implicada en "Desenvolupament i creixement cel·lular, proliferació i desenvolupament i funcionament del sistema nerviós central" (Figura 9), tot remarcant la importància dels gens DE en el desenvolupament i funcionament del sistema nerviós central.

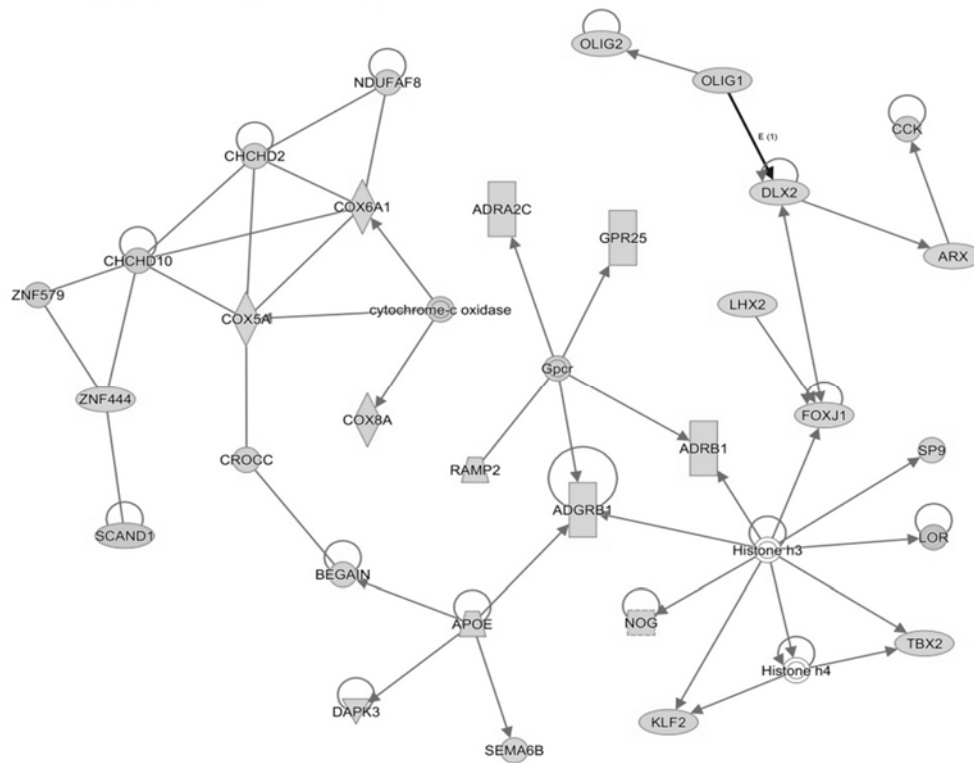


Figura 9. Xarxa dels gens del mPFC diferencialment expressats en ratolins *Pb1c1 +/-*. Xarxa implicada en desenvolupament i creixement cel·lular, proliferació i desenvolupament i funcionament del sistema nerviós central (puntuació = 62). Els nodes en gris representen gens que estan regulats a la baixa en els animals HZ en comparació amb els WT.

3. CONCLUSIONS

L'ús d'animals genoanul·lats ens ha permès aprofundir en la contribució d'un gen concret a la dependència de cocaïna. En aquest estudi hem observat que els ratolins HZ mostren un patró d'autoadministració de la cocaïna similar al dels ratolins WT, però presenten una disminució en el restabliment de la cerca de la droga després d'un període d'abstinència respecte els ratolins WT. Això relacionaria el gen *PLCB1* amb una menor possibilitat de recaiguda en el consum, la qual cosa l'assenyalaria com una diana terapèutica prometedora.

CAPÍTOL 3: ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ A ESCALA GENÒMICA (GWAS) AMB LA DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA.

Article 3:

“Avaluació de variants prèviament associades a escala genòmica a la dependència de drogues en una mostra espanyola”.

Resum:

La dependència de drogues és un trastorn crònic i amb recaigudes produït per la interacció de factors de risc genètics i ambientals. L'objectiu d'aquest treball és replicar a la nostra mostra espanyola diverses associacions a escala genòmica prèviament identificades en estudis GWAS de dependència de drogues o cocaïna. Per això hem realitzat un estudi d'associació cas-control en una mostra de 1.711 individus dependents de drogues (dels quals 1.011 són dependent de cocaïna) i 1.719 controls. Hem avaluat tres SNPs que presentaven associació significativa a escala genòmica en tres estudis previs: rs1868152 i rs2952621 (localitzats prop dels gens *LOC253573* i *LOC151121*, respectivament) associats a la dependència de drogues, i rs2629540 (al primer intró del gen *FAM53B*) associat a la dependència de cocaïna. Hem pogut replicar l'associació entre la variant rs2952621 i la dependència de drogues ($P = 0,02$) sota el model dominant, en què l'al·lel de risc (T) és el mateix que s'havia descrit en l'estudi previ. A continuació hem realitzat una metanàlisi per analitzar aquesta variant conjuntament a les dues mostres de l'estudi original (*Collaborative Studies on Genetics of Alcoholism (COGA)* i *Study of Addiction: Genetics and Environment (SAGE)*) i la nostra mostra. La metanàlisi inclou en total 3.747 casos i 4.043 controls, i confirma l'associació d'aquesta variant amb la patologia (OR = 1,26, 95%; CI = 1,15 - 1,39). En conclusió, s'ha pogut replicar a la nostra mostra l'associació entre la variant rs2952621, localitzada prop del gen *LOC151121*, encara no caracteritzat, i la dependència de drogues. Serà necessari realitzar més estudis per poder determinar la contribució d'aquesta variant a la predisposició a la dependència de drogues.

Referència:

Laura Pineda-Cirera, Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Monica Cozar, Lara Grau-Lopez, Alfons C. Abad, Nieves Martínez-Luna, María Robles-Martínez, Cristina Sánchez-Mora, Josep Antoni Ramos-Quiroga, Miquel Casas, Marta Ribasés, Noèlia Fernández-Castillo, Bru Cormand. *Evaluation of previous substance dependence GWAS findings in a Spanish sample*. Drug and Alcohol Dependence 2018; (187) 358-362. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2018.03.013.



Contents lists available at ScienceDirect

Drug and Alcohol Dependence

journal homepage: www.elsevier.com/locate/drugalcdp

Short communication

Evaluation of previous substance dependence genome-wide significant findings in a Spanish sample



Laura Pineda-Cirera^{a,b,c,d}, Judit Cabana-Domínguez^{a,b,c,d}, Carlos Roncero^{e,f,g,h,i},
Mònica Cozar^{a,b,c,d}, Lara Grau-López^{e,f,g,h}, Alfonso C. Abad^{f,h}, Nieves Martínez-Luna^{e,f,h},
María Robles-Martínez^{f,h}, Cristina Sánchez-Mora^{g,h,j}, Josep Antoni Ramos-Quiroga^{g,h,j,k},
Miquel Casas^{e,g,h}, Marta Ribasés^{g,h,j}, Noèlia Fernández-Castillo^{a,b,c,d,*}, Bru Cormand^{a,b,c,d,*}

^a Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Av. Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11, 280029, Madrid, Spain

^c Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain

^d Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR-SJD), Passeig de Sant Joan de Déu 2, 08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, Catalonia, Spain

^e Psychiatry Department, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

^f Addiction and Dual Diagnosis Unit, Psychiatric Services, Hospital Universitari Vall d'Hebron-ASPB, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Edifici Mediterrània, 08035 Barcelona, Catalonia, Spain

^g Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Instituto de Salud Carlos III, Av. Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11, 280029 Madrid, Spain

^h Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Edifici Mediterrània, 08035 Barcelona, Catalonia, Spain

ⁱ Psychiatric Service, University of Salamanca Health Care Complex and Institute of Biomedicine of Salamanca, University of Salamanca, Castile and Leon, Spain

^j Psychiatric Genetics Unit, Group of Psychiatry, Mental Health and Addiction, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

^k Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Replication study
Genome-wide association study (GWAS)
Substance dependence
Cocaine dependence
rs2952621
Meta-analysis

ABSTRACT

Background: Substance dependence is a chronic and relapsing disorder explained by genetic and environmental risk factors. The aim of our study is to replicate previous genome-wide significant (GWS) hits identified in substance dependence in general or in cocaine dependence in particular using an independent sample from Spain.

Methods: We evaluated, in a Spanish sample of 1711 subjects with substance dependence (1011 of them cocaine dependent) and 1719 control individuals, three SNPs identified as GWS in previous studies: rs1868152 and rs2952621 (located near *LINC02052* and *LINC01854*, respectively), associated with substance dependence, and rs2629540 (in the first intron of *FAM53B*), associated with cocaine dependence.

Results: We replicated the association between rs2952621 and substance dependence under the dominant model ($P = 0.020$), with the risk allele (T) being the same in our sample and in those two reported previously. We then performed a meta-analysis of the two samples used in the original study that reported the association of rs2952621 with substance dependence (Collaborative Studies on Genetics of Alcoholism (COGA) and Study of Addiction: Genetics and Environment (SAGE)) together with our Spanish sample. The meta-analysis of 3747 cases and 4043 controls confirmed the association (OR = 1.26, 95% CI = 1.15–1.39).

Conclusions: The rs2952621 variant, located downstream from the yet uncharacterized gene *LINC01854*, is associated with substance dependence in our Spanish sample. Further research is needed to understand its contribution to the susceptibility to substance dependence.

1. Introduction

Substance dependence is a complex psychiatric disorder characterized

by loss of control in drug intake, craving, and withdrawal (Koob and Volkow, 2010). The heritability estimates of substance dependence range from 39% to 72% depending on the drug of abuse (Goldman et al., 2005),

* Corresponding authors at: Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, edifici annex, 3ª planta, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain.

E-mail addresses: noefernandez@ub.edu (N. Fernández-Castillo), bcormand@ub.edu (B. Cormand).

<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdp.2018.03.013>

Received 5 November 2017; Received in revised form 2 March 2018; Accepted 8 March 2018

Available online 16 April 2018

0376-8716/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

although other factors such as clinical assessment, ethnicity, or age may also have an impact on these scores. Despite the fact that the genetic contribution to the disorder is substantial, the specific underlying genetic risk factors remain largely unknown. Candidate gene association studies assessing susceptibility to dependence to drugs of abuse have focused mainly on genes involved in the neurotransmitter systems of the brain, but only a few consistent associations have been found. These include the genes *CNRI*, *CHRNA5* and *DRD2* (reviewed by Bühler et al., 2015). On the other hand, Genome-Wide Association Studies (GWAS) have highlighted new candidate genes such as *LINC01854*, *ARHGAP28* (Wetherill et al., 2014), or *KAT2B* (Johnson et al., 2015) for substance dependence and *FAM53B* (Gelernter et al., 2014) for cocaine dependence. However, most GWAS have been performed for alcohol dependence (Tawa et al., 2016). These GWAS have highlighted some risk genes that had already emerged through candidate gene studies, like some members of the *ADH* family and *ALDH2*, encoding alcohol and aldehyde dehydrogenases, respectively (Samochowiec et al., 2014). Others have emerged that were not *a priori* candidates for the disorder, pointing at new functions that may be related to its etiology.

Replication of previous GWS findings in independent samples is key to validating association signals, especially when they have been identified in studies with limited sample sizes, as is the case for most studies performed in substance dependence so far. The aim of the present study is to replicate, in a Spanish sample, several GWS findings reported in previous GWAS of substance dependence in general and dependence to cocaine performed in samples with European ancestry (Gelernter et al., 2014; McGue et al., 2013; Wetherill et al., 2014). Our analyses include meta-analytical approaches and functional annotation of replicated findings.

2. Materials and methods

2.1. Samples and DNA isolation

The case sample consists of 1711 substance dependent patients, including 1011 cocaine-dependent subjects (Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. 1). All patients were diagnosed under DSM-IV-TR criteria (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed. Text revision) and the SCID (Structured Clinical Interview) (First et al., 1997) at the Addiction and Dual Diagnosis Unit of the Psychiatry Department of Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain). They were included in the study if they met the criteria for dependence for at least one drug of abuse (Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. 1). The control sample consisted of 1719 individuals (Supplementary Table S1) recruited at the Blood and Tissues Bank of Barcelona. All cases and controls were unrelated, Spanish, Caucasian, and sex-matched. The study was approved by the ethics committee of our institution according to the Helsinki Declaration. Population stratification of our sample was discarded in a previous study of our group (Fernández-Castillo et al., 2013) by genotyping 48 unlinked anonymous SNPs located at least 100 kb from any known gene and analyzing the results using the STRUCTURE software (Pritchard et al., 2000), the Fst coefficient (Goudet, 1995), and the Pritchard and Rosenberg method (Pritchard and Rosenberg, 1999).

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using the salting-out method (Miller et al., 1988). DNA concentration of all samples was measured on a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA).

2.2. SNP selection and genotyping

We selected SNPs that showed a GWS association ($P < 5e-08$) with substance dependence (dependence to at least one drug of abuse) in samples with European ancestry (see Supplementary Table S2 for details). Two SNPs were identified under these criteria and were selected for genotyping: rs1868152, located 5' from *LINC02052* (McGue et al.,

2013), and rs2952621, located 3' from *LINC01854* (Wetherill et al., 2014). Both were associated with substance dependence. We also considered a third SNP that was GWS for cocaine dependence in a meta-analysis of samples of African- and European-American individuals: rs2629540, within the first intron of the *FAM53B* gene (Gelernter et al., 2014). This previous study included two additional SNPs, rs2000085570 and rs2456778, showing GWS associations in some of the individual samples but not in the meta-analysis, and they were not considered in our replication study. Genotyping of all SNPs was performed using KASP technology (LGC genomics, UK). Replicates of some samples and negative controls were included.

2.3. Statistical analyses

The statistical power of our samples was calculated *post hoc* using the Genetic Power Calculator software (<http://csg.sph.umich.edu/abecasis/cats/>) (Purcell et al., 2003). We calculated the power under the additive, dominant, and recessive models using a level of significance of 0.05, odds ratio of 1.2, a disease prevalence of 0.026 (Compton et al., 2007), and the minor allele frequency (MAF) calculated in our control sample (MAF = 0.1 for rs1868152, MAF = 0.42 for rs2952621 and MAF = 0.27 for rs2629540).

Departure from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P < 0.05$) was tested for all the SNPs separately in controls and cases using the SNPAssoc package of the R library (González et al., 2007). The case-control association test was carried out using the same package under four different genetic models: additive, dominant, recessive and codominant. All results were adjusted by age, as significant differences in age were detected between cases and controls using the non-parametric test U Mann-Whitney with SPSS22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Bonferroni correction threshold for multiple testing was set at $P < 4.16e-03$ (0.05/(3 SNPs*4 genetic models)).

Finally, for rs2629540, we also performed a symptom count analysis similar to the one reported in the original study (Gelernter et al., 2014) by including the severity of the consumption of opioid, alcohol, and nicotine as covariates.

2.4. Meta-analysis

Meta-analysis for rs2952621 (3747 cases and 4043 controls) was performed with the meta R package (www.cran.r-project.org/web/packages/rmeta/index.html) for three different substance dependence samples: the Collaborative Studies on Genetics of Alcoholism (COGA) (genotype data from Wetherill et al., 2014), the Study of Addiction: Genetics and Environment (SAGE) (data obtained through dbGAP application, accessions phs000092.v1.p1.c1 and c2, under project 15342), and our Spanish sample. The samples gathered by COGA and SAGE have been widely used in substance dependence GWAS either as discovery or as replication samples. The COGA sample included 824 cases and 935 controls. For the SAGE sample, which consisted of 1224 cases and 1390 controls, we used European-American individuals and excluded related individuals and subjects also present in the COGA sample from the analysis. We considered the dominant model, which displayed the best *p*-value in the Spanish sample. The Mantel-Haenszel test (fixed effects model) was applied, as the samples did not show heterogeneity.

2.5. Functional annotation

We searched for other variants in linkage disequilibrium (LD) with rs2952621 using the SNAP tool (<http://archive.broadinstitute.org/mpg/snap/ldsearch.php>) (Johnson et al., 2008), considering $r^2 \geq 0.8$ and the genotype data from the Utah Residents (CEPH) with Northern and Western European Ancestry (CEU) population of 1000 Genomes Pilot 1. The predicted functional effect of all these variants (38 in total) was evaluated using the SNP Function Prediction software (<https://>

Table 1
Replication study of three genome-wide significant associations in a sample of Caucasian Spanish subjects with substance dependence and controls.

SNP	Phenotype	N		Alleles	MAF	Genotypes						p-value			
		Cases	Controls			Cases (%)			Controls (%)			Codominant	Dominant	Recessive	Additive
						11	12	22	11	12	22				
rs1868152	SD	1698	1707	C > T	0.1	79.6	19.3	1.1	79.6	19.4	1.0	0.8039	0.7338	0.6270	0.8401
rs2952621	SD	1699	1718	C > T	0.42	31.3	50.7	18.0	35.0	46.7	18.3	0.0488	0.0196	0.9675	0.1109
rs2629540	CD	1011	1144	C > G	0.27	53.7	38.7	7.6	53.9	38.4	7.7	0.6347	0.4154	0.8258	0.5837

Bold values: significant p-values; MAF: Minor Allele Frequency; SD: Substance Dependence; CD: Cocaine Dependence.

snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snfunc.html) in the CEU population. These SNPs were tested as potential quantitative trait loci (eQTLs) using GTEx Analysis, Release V6p (GTEx Consortium et al., 2013). Histone modification data for H3K27ac, H3K9ac, H3K9me1 or H3K9me3 of 10 different brain regions (hippocampus middle, substantia nigra, anterior caudate, cingulate gyrus, inferior temporal lobe, angular gyrus, dorso-lateral prefrontal cortex, germinal matrix, and male and female fetal brain) related to enhancer or promoter regions were explored using the Haploreg v4.1 tool (Ward and Kellis, 2016).

3. Results

We assessed three previous genome-wide significant findings identified in GWAS of substance dependence in general or cocaine dependence in particular (rs1868152, rs2952621, and rs2629540, see Supplementary Table S2) in a Spanish Caucasian sample of substance dependence (59% of the subjects being cocaine-dependent) and the corresponding controls (Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. 1).

The statistical power of our sample, assuming an OR of 1.2, was 6–68% (rs1868152), 40–97% (rs2952621), and 12–79% (rs2629540), depending on the model of inheritance considered. All three SNPs were in Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) in controls and cases.

We identified an association between rs2952621 and substance dependence under the dominant model (best p-value, P = 0.020) and the codominant model (P = 0.049), neither of which overcame the Bonferroni correction for multiple testing (Table 1). These nominal associations showed the same direction as in the original study (Wetherill et al., 2014), with the T allele as the risk variant. As the association was described under the additive model in the original study, we inspected the genotypes of COGA (discovery) and SAGE (replication) samples and observed that the associations were also positive for the dominant model (P = 3.3e-04 and P = 9.9e-03, respectively) and the codominant model (P = 1.0e-05 and P = 0.035,

respectively). Then, we performed the meta-analysis of the COGA, SAGE, and Spanish samples (3747 cases and 4043 controls in total) under the dominant model, which yielded the best association results in most samples. The association was confirmed in the meta-analysis (OR = 1.26, 95% CI = 1.15–1.39). All three datasets showed the same direction of the effect, and T was the risk allele (Fig. 1). We did not observe significant associations for rs1868152 or rs2629540 under any of the tested genetic models (Table 1).

We then assessed the possible functional effect of the rs2952621 variant using bioinformatics tools. This SNP is in high LD (r² ≥ 0.8) with 37 SNPs (Supplementary Table S3). Our SNP of interest, and those located closest to it, overlap with multiple histone marks classically related with enhancer regions in different brain areas (Supplementary Table S3). On the other side, although rs2952621 is not an eQTL and is not predicted to have any functional effect, eight SNPs out of those 37 that are in LD with it are located in predicted binding sites for transcription factors, and two of them overlap with splice sites within the *LINC01854* gene. Finally, 11 out of these 37 SNPs are eQTLs for the pseudogene *FAR2P1* (located 790 kb distal from rs1251179) in the nerve-tibial tissue.

4. Discussion

The aim of this study is to follow-up previous GWAS results on substance dependence in general or on cocaine dependence through a replication study in a Spanish sample. One of the three GWS signals, the rs2952621 SNP associated with substance dependence (Wetherill et al., 2014), was replicated in our study. We did not replicate the associations reported for rs1868152 with substance dependence or rs2629540 with cocaine dependence.

The original study (Wetherill et al., 2014) identified an association between rs2952621 and substance dependence (P = 1.77e-08) in a discovery sample (COGA, Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism) of around 800 cases and 900 controls. The authors replicated these findings in a second sample of 2647 individuals (SAGE, Study of Addiction: Genetics and Environment) with the T allele as the risk variant in both groups (Wetherill et al., 2014). Our study replicates this finding in the same direction in a Spanish Caucasian sample (P = 0.020, dominant model). Finally, the meta-analysis of the three samples showed an effect for the risk allele T with an OR = 1.26 (95% CI = 1.15–1.39) (Fig. 1).

The rs2952621 SNP is located 1.3 Kb downstream from a yet uncharacterized gene, *LINC01854*, identified in two previous studies (Ota et al., 2004; Strausberg et al., 2002). It is expressed in most tissues, including the brain. Unfortunately, no further information is available about the function of this gene to understand its possible role in substance dependence. Rs2952621 seems to be located in an enhancer region, but it is not described as an eQTL and does not have a predicted functional impact. Several SNPs are in high LD with it and were explored for potential functional involvement. Among them, rs1251179 seems to be the most interesting one: the degree of LD with rs2952621 is high (r² = 0.97 in the CEU population), it is predicted to be located in a transcription factor binding site, and it is described as an eQTL in the

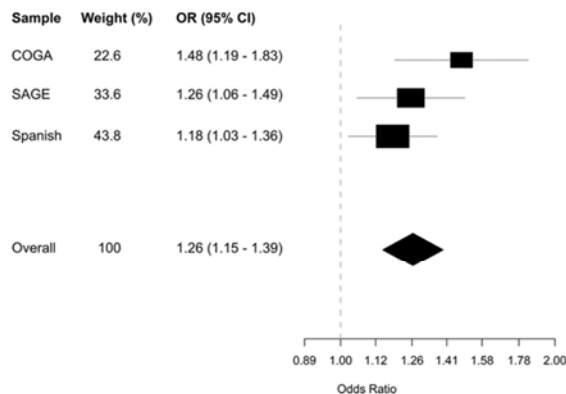


Fig. 1. Meta-analysis of rs2952621. Forest plot of the ORs (95% CI) of marker rs2952621 for our Spanish sample and the COGA and SAGE datasets.

nerve-tibial tissue for the pseudogene *AC018865.9* (located 790 kb distal from rs1251179). Further research is needed to clarify whether it could have a role in the susceptibility to substance dependence.

The lack of replication of the previously associated SNPs rs1868152 and rs2629540 could be explained by phenotypic heterogeneity of the substance dependence samples used in the different studies or by lack of statistical power due to limited sample size and/or modest effect size of the variants. In the case of rs2629540, the reported association (Gelernter et al., 2014) reached GWS in a meta-analysis of European-American and African-American individuals ($P = 4.3e-08$). However, when the two ethnic groups were analyzed separately, the association with rs2629540 was only nominal, with the African sample performing much better ($P = 1.4e-06$) than the European one ($P = 2.6e-03$) with comparable sample sizes. The lack of replication in our sample, which is also of European origin, would make sense in this context.

5. Conclusions

We replicated the reported association between substance dependence and the variant rs2952621, located close to the uncharacterized gene *LINC01854*. A meta-analysis of our sample and the discovery and replication samples of the original study confirmed the association and the direction of the effect. This risk variant for substance dependence (T allele) may contribute to the susceptibility to this chronic relapsing disorder, although further studies are required to understand the molecular basis of this contribution.

Role of funding source

Major financial support for this research was received by BC from the Spanish 'Ministerio de Economía y Competitividad' (SAF2015-68341-R) and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2017-SGR-738). CR received financial support from 'Instituto de Salud Carlos III', Spain (PI13/1911) and 'Plan Nacional Sobre Drogas', Spain (2013/044). The research leading to these results also received funding from the European Union Seventh Framework Programme [FP7/2007-2013] under grant agreement no 602805 and from the European Union H2020 Program [H2020/2014-2020] under grant agreement no 667302, from 'Instituto de Salud Carlos III', Spain (PI17/00289), the European Regional Development Fund (ERDF), AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2014SGR1461), 'Departament de Salut, Generalitat de Catalunya' and a NARSAD Young Investigator Grant from the Brain & Behavior Research Foundation to MR. LP-C and JC-D were supported by 'Generalitat de Catalunya' (2016 FI_B 00728 and 2015 FI_B 00448, respectively). LP-C was also supported by 'Ministerio de Educación, Cultura y Deporte' (FPU15/03867). NF-C was supported by a contract of the 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras' (CIBERER). MR and CS-M are recipients of a Miguel de Servet (CP09/00119) and a Sara Borrell (CD15/00199) contract, respectively, from 'Instituto de Salud Carlos III', Spain.

Contributors

LP-C performed the association study and the statistical analysis; LP-C and JC-D performed the meta-analysis; LG-L, CR, ACA, NM-L, MR-M, JAR-Q and MC participated in the recruitment of patients and clinical assessment and coordinated the clinical research; LP-C, JC-D, CS-M and NF-C isolated genomic DNA from samples; LP-C, BC and NF-C designed the study; MR contributed to the genetic analysis. LP-C prepared the first draft of the manuscript and all figures and tables; BC and NF-C coordinated the study and supervised the manuscript preparation. All authors contributed to and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest

JAR-Q was on the speakers' bureau and/or acted as a consultant for Eli-Lilly, Janssen-Cilag, Novartis, Shire, Lundbeck, Almirall, Braingaze, Sincrolab, and Rubió in the last 5 years. He also received travel awards for taking part in psychiatric meetings from Janssen-Cilag, Rubió, Shire, and Eli-Lilly. The Department of Psychiatry chaired by him received unrestricted educational and research support from the following pharmaceutical companies in the last 5 years: Eli-Lilly, Lundbeck, Janssen-Cilag, Actelion, Shire, Ferrer, and Rubió. The rest of the authors declare no conflicts of interest or relevant financial interests.

Acknowledgments

We are thankful to all the Blood and Tissues Bank of Barcelona donors, patients, families and clinical collaborators who contributed to the recruitment of patients (Dr. Elena Ros-Cucurull, Abderraman Esojo, R. Felipe Palma-Álvarez, Joan Alvarós, Àngel Egido and Laia Rodríguez-Cintas). We are also grateful to Leah Wetherill for kindly providing the genotype data of the COGA sample.

Funding support for the Study of Addiction: Genetics and Environment (SAGE) was provided through the NIH Genes, Environment and Health Initiative [GEI] (U01 HG004422). SAGE is one of the genome-wide association studies funded as part of the Gene Environment Association Studies (GENEVA) under GEI. Assistance with phenotype harmonization and genotype cleaning, as well as with general study coordination, was provided by the GENEVA Coordinating Center (U01 HG004446). Assistance with data cleaning was provided by the National Center for Biotechnology Information. Support for collection of datasets and samples was provided by the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism (COGA; U10 AA008401), the Collaborative Genetic Study of Nicotine Dependence (COGEND; P01 CA089392), and the Family Study of Cocaine Dependence (FSCD; R01 DA013423). Funding support for genotyping, which was performed at the Johns Hopkins University Center for Inherited Disease Research, was provided by the NIH GEI (U01HG004438), the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, the National Institute on Drug Abuse, and the NIH contract "High throughput genotyping for studying the genetic contributions to human disease" (HHSN268200782096C). The datasets used for the analyses described in this manuscript were obtained from dbGaP at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gap/cgi-bin/study.cgi?study_id=phs000092.v1.p1 through dbGaP accession number phs000092.v1.p.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.03.013>.

References

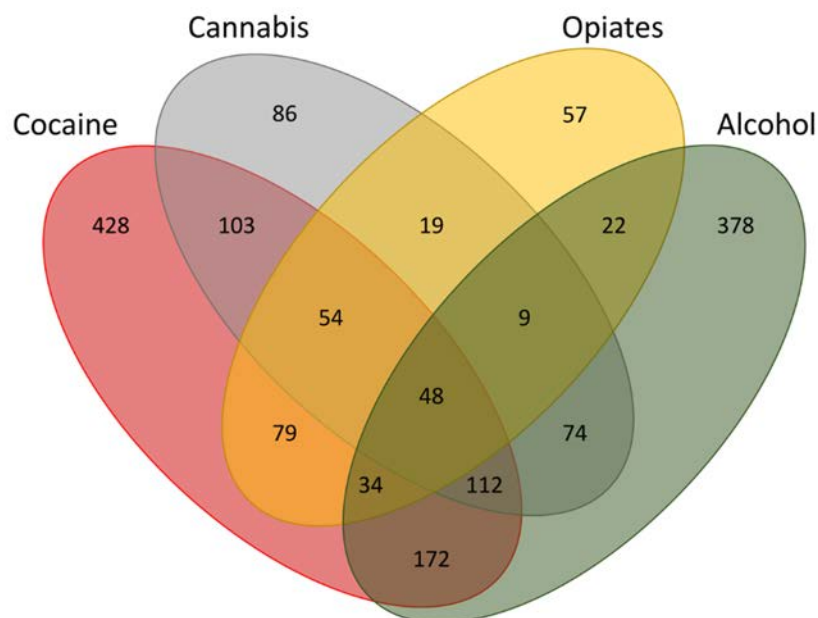
- Bühler, K.-M., Giné, E., Echeverry-Alzate, V., Calleja-Conde, J., de Fonseca, F.R., López-Moreno, J.A., 2015. Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research. *Addict. Biol.* 20, 845–871.
- Compton, W.M., Thomas, Y.F., Stinson, F.S., Grant, B.F., 2007. Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV drug abuse and dependence in the United States: results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch. Gen. Psychiatry* 64, 566–576.
- Fernández-Castillo, N., Roncero, C., Grau-Lopez, L., Barral, C., Prat, G., Rodríguez-Cintas, L., Sánchez-Mora, C., Gratacòs, M., Ramos-Quiroga, J.A., Casas, M., Ribasés, M., Cormand, B., 2013. Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence. *Genes Brain Behav.* 12, 39–46.
- First, M.B., Spitzer, S.R., Gibbon, M., Williams, J.B.M., 1997. Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders (SCID). American Psychiatric Press, Washington, D.C.
- GTE Consortium, Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., Hasz, R., Walters, G., Garcia, F., Young, N., Foster, B., Moser, M., Karasik, E., Gillard, B., Ramsey, K., Sullivan, S., Bridge, J., Magazine, H., Syron, J., Fleming, J., Siminoff, L., Traino, H., Mosavel, M., Barker, L., et al., 2013. The genotype-Tissue expression

- (GTEx) project. *Nat. Publ. Gr.* 45, 580–585.
- Gelernter, J., Sherva, R., Koesterer, R., Almasy, L., Zhao, H., Kranzler, H.R., Farrer, L., 2014. Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol. Psychiatry* 19, 717–723.
- Goldman, D., Orozci, G., Ducci, F., 2005. The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat. Rev. Genet.* 6, 521–532.
- González, J.R., Armengol, L., Solé, X., Guinó, E., Mercader, J.M., Estivill, X., Moreno, V., 2007. SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23, 644–645.
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86, 485–486.
- Johnson, A.D., Handsaker, R.E., Pulit, S.L., Nizzari, M.M., O'Donnell, C.J., de Bakker, P.I.W., 2008. SNAP: a web-based tool for identification and annotation of proxy SNPs using HapMap. *Bioinformatics* 24, 2938–2939.
- Johnson, E.O., Hancock, D.B., Levy, J.L., Gaddis, N.C., Page, G.P., Glasheen, C., Saccone, N.L., Bierut, L.J., Kral, A.H., 2015. KAT2B polymorphism identified for drug abuse in African Americans with regulatory links to drug abuse pathways in human prefrontal cortex. *Addict. Biol.* 21, 1217–1232.
- Koob, G.F., Volkow, N.D., 2010. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* 35, 217–238.
- McGue, M., Zhang, Y., Miller, M.B., Basu, S., Vrieze, S., Hicks, B., Malone, S., Oetting, W.S., Iacono, W.G., 2013. A genome-wide association study of behavioral disinhibition. *Behav. Genet.* 43, 363–373.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
- Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sato, H., Nagai, K., Kimura, K., Makita, H., Sekine, M., Obayashi, M., Nishi, T., Shibahara, T., Tanaka, T., Ishii, S., Yamamoto, J., Saito, K., Kawai, Y., Isono, Y., Nakamura, Y., Nagahari, K., Murakami, K., et al., 2004. Complete sequencing and characterization of 21, 243 full-length human cDNAs. *Nat. Genet.* 36, 40–45.
- Pritchard, J.K., Rosenberg, N.A., 1999. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 220–228.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Purcell, S., Cherny, S.S., Sham, P.C., 2003. Genetic power calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19, 149–150.
- Samochowiec, J., Samochowiec, A., Puls, I., Bienkowski, P., Schott, B.H., 2014. Genetics of alcohol dependence: a review of clinical studies. *Neuropsychobiology* 70, 77–94.
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., Zeeberg, B., Buetow, K.H., Schaefer, C.F., Bhat, N.K., Hopkins, R.F., Jordan, H., Moore, T., Max, S.I., Wang, J., Hsieh, F., Diatchenko, L., Marusina, K., Farmer, A., Rubin, G.M., Hong, L., et al., 2002. Generation and initial analysis of more than 15, 000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16899–16903.
- Tawa, E.A., Hall, S.D., Lohoff, F.W., 2016. Overview of the genetics of alcohol use disorder: alcohol Alcohol. *Natl. Inst. Health* 51, 507–514.
- Ward, L.D., Kellis, M., 2016. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res.* 44, D877–D881.
- Wetherill, L., Agrawal, A., Kapoor, M., Bertelsen, S., Bierut, L.J., Brooks, A., Dick, D., Hesselbrock, M., Hesselbrock, V., Koller, D.L., Le, N., Nurnberger, J.I., Salvatore, J.E., Schuckit, M., Tischfield, J.A., Wang, J.C., Xuei, X., Edenberg, H.J., Porjesz, B., Bucholz, K., Goate, A.M., Foroud, T., 2014. Association of substance dependence phenotypes in the COGA sample. *Addict. Biol.* 20, 617–627.

Supplementary material for:

EVALUATION OF PREVIOUS SUBSTANCE DEPENDENCE GENOME-WIDE SIGNIFICANT FINDINGS IN A SPANISH SAMPLE

Laura Pineda-Cirera, Judit Cabana-Domínguez, Carlos Roncero, Mònica Cozar, Lara Grau-López, Alfonso C. Abad, Nieves Martínez-Luna, María Robles-Martínez, Cristina Sánchez-Mora, Josep Antoni Ramos-Quiroga, Miquel Casas, Marta Ribasés, Noèlia Fernàndez-Castillo, Bru Cormand.



Supplementary Figure 1. Venn diagram of the distribution of the main four dependencies (cocaine, cannabis, alcohol and opiates) in the Spanish sample of patients used in this study. Other dependencies with a frequency lower than 10% are not displayed.

Supplementary Table S1. Descriptive characteristics of the Caucasian Spanish individuals used in the present study

	Substance dependence sample		Cocaine dependence sample	
	Cases N=1,711	Controls N =1,719	Cases N=1,011	Controls N =1,144
Gender N (%)				
Male	1,299 (75.8)	1,305 (75.8)	826 (81.7)	935 (81.7)
Female	412 (24.2)	414 (24.2)	185 (18.3)	209 (18.3)
Age (mean and SD)				
	40.7 ± 11.7	54.3 ± 16.6	36.6 ± 8.4	54.9 ± 16.7
Substance Dependence N (%)				
Cocaine	1,030 (60.2)	-	1,011 (100.0)	-
Alcohol	849 (49.6)	-	354 (35.0)	-
Cannabis	505 (29.5)	-	310 (30.6)	-
Opiates	322 (18.8)	-	204 (20.2)	-
Tobacco	621 (36.3)	-	271 (26.8)	-
Benzodiazepines	139 (8.1)	-	65 (6.4)	-
Others	49 (2.9)	-	31 (3.1)	-

Supplementary Table S2. SNPs selected for the replication study

SNP	Reference	Nearby Gene	Distance (Kb)	Alleles	MAF	Assoc. with	Sample	P-value	Replication study
rs1868152	McGue <i>et al.</i> 2013	<i>LINC02052</i>	8.6 (5')	C>T	0.12	SD	2,300 families	4.90e-08	No
rs2952621	Wetherill <i>et al.</i> 2015	<i>LINC01854</i>	1.3 (3')	C>T	0.47	SD	Ca: 832 Ct: 938	1.77e-08	Yes (P = 0.02, SAGE sample)
rs2629540	Gelernter <i>et al.</i> 2014	<i>FAM53B</i>	0 (intron1)	C>G	EA: 0.07 AA: 0.25	CD	EA→ Ca: 1,809 Ct: 570 AA→ Ca: 2,482 Ct: 836	4.28e-08	Not replicated (SAGE sample)

MAF: Minor Allele Frequency; Assoc: Association; SD: substance dependence; CD: cocaine dependence; Ca: cases; Ct: controls; EA: European-American; AA: African-American

Supplementary Table S3. Predicted functional effect of the associated variant rs2952621 and variants in linkage disequilibrium with it.

SNP	Position ^{&}	Alleles	R ²	D'	eQTL Information ^a				SNP Func. Pred. ^b		HaploReg Information ^c				
					Gene	P-Value	Effect Size	Tissue	TFBS	Splicing	H3K4me1	H3K4me3	H3K27a		H3K9ac
														c	
rs35258248	129700092	C/T	0.846	1											
rs1270481	129700134	C/T	0.84	0.964											
rs735987	129700872	A/G	0.967	1											
rs746631	129701108	T/A	0.967	1											
rs1251214	129701584	A/C	0.967	1	<i>FAR2P1</i>	5.7 e -05	0.31	Nerve - Tibial							
rs1251215	129701624	T/C	1	1											
rs1268546	129701652	T/C	0.934	0.966											
rs1251216	129701680	G/C	0.967	1											
rs2406641	129701895	A/G	0.934	0.966											
rs894109	129702012	C/G	0.967	1	<i>FAR2P1</i>	9.7 e -05	0.30	Nerve - Tibial							
rs1251205	129703990	A/T	1	1	<i>FAR2P1</i>	9.1 e -05	0.30	Nerve - Tibial							
rs4662907	129706667	A/G	0.875	1							2				
rs13033217	129707339	C/T	0.875	1							8	1	1		
rs1078826	129707482	A/G	0.818	1							8	1	1		
rs1251195	129708713	C/T	0.967	1							8				
rs1660895	129710802	A/T	0.87	0.965											
rs35878075	129711971	A/G	0.846	1											
rs879533	129713216	T/A	0.967	1							1				
rs1734330	129713458	A/T	0.967	1							4		4	1	
rs3856372	129713553	T/A	0.846	1							5		4	1	
rs894110	129714013	C/G	0.967	1							3		5	1	
rs935085	129714503	C/T	0.934	0.966							3		5	1	
rs2952621	129714913	C/T	1	1							3		3	1	
rs1251172	129715660	A/G	0.967	1							2				
rs4662640	129716266	A/C	0.846	1					Yes	Yes	2				
rs4662641	129716742	A/G	0.846	1					Yes		1				
rs10167178	129718195	C/T	0.846	1					Yes	Yes					
rs1441141	129718543	A/G	0.846	1					Yes						
rs6708498	129718656	C/T	0.84	0.964	<i>FAR2P1</i>	7.1e-05	0.32	Nerve - Tibial	Yes						
rs1441142	129719748	A/G	0.846	1					Yes						
rs1251179	129720205	A/G	0.967	1	<i>FAR2P1</i>	6.3e-05	0.31	Nerve - Tibial	Yes						
rs837827	129720621	A/G	0.967	1					Yes						
rs7591211	129722233	A/T	0.84	0.964	<i>FAR2P1</i>	7e-05	0.31	Nerve - Tibial			1				
rs6756671	129723645	A/G	0.811	0.963	<i>FAR2P1</i>	5.4e-05	0.32	Nerve - Tibial							
rs2197022	129724220	G/T	0.84	0.964	<i>FAR2P1</i>	5.7e-05	0.31	Nerve - Tibial							
rs1524190	129724516	T/C	0.84	0.964	<i>FAR2P1</i>	5.9e-05	0.31	Nerve - Tibial							
rs13034230	129724734	A/G	0.811	0.963	<i>FAR2P1</i>	6.1e-05	0.31	Nerve - Tibial							
rs13017147	129724741	C/T	0.84	0.964	<i>FAR2P1</i>	8.6e-05	0.32	Nerve - Tibial							

[&]NCBI36/h18 assembly

^aGTEX Analysis, Release V6p. <http://www.gtportal.org/home/>

^bSNP Function Prediction. <https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.html>

^cHaploReg 4.1 tool. <http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>. We list the total number of marks considering 10 different brain areas.

SNP in bold: SNP associated with substance dependence

Article 4:

“Metanàlisi de GWAS de dependència de cocaïna: base genètica compartida amb condicions comòrbides”.

Resum:

La dependència de cocaïna és un trastorn neuropsiquiàtric complex que presenta un elevat grau de comorbiditat amb altres trets psiquiàtrics. Els resultats obtinguts en estudis d'associació suggereixen que les variants genètiques comunes podrien tenir un paper rellevant en la susceptibilitat a la dependència de cocaïna. D'altra banda, cada vegada hi ha més evidències de l'existència de variants genètiques de risc comunes entre trastorns psiquiàtrics. En aquest estudi hem realitzat una metanàlisi de dependència de cocaïna emprant dades GWAS de quatre estudis previs disponibles al repositori dbGaP (2.085 casos i 4.293 controls, tots ells d'ascendència europea). Tot i que no s'ha identificat cap variant que superi el llindar de significació a escala genòmica, en l'anàlisi basada en gens (*gene-based analysis*) s'ha identificat associació significativa entre el gen *HISTH2BD* i la dependència de cocaïna, que supera correccions per tests múltiples *False Discovery Rate* del 10%. Aquest gen està al cromosoma 6, en una regió enriquida en gens d'histones que s'ha associat prèviament a l'esquizofrènia. Els SNPs de la regió que presenten un p-valor més baix, rs806973 i rs56401801 ($P = 3,14 \times 10^{-6}$ i $3,44 \times 10^{-6}$, respectivament), són eQTL (*expression Quantitative Trait Loci*) per diferents gens de la regió en diverses àrees cerebrals. D'altra banda, s'ha identificat correlació genètica entre la dependència de cocaïna i el trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat (TDAH), esquizofrènia, trastorn depressiu major (TDM) i personalitat amb tendència a assolir riscos, emprant l'aproximació LDSC (*Linkage Disequilibrium Score regression*). A més, hem observat que tots els fenotips testats permeten predir, en part, si un individu és cas o control per la dependència de cocaïna mitjançant una anàlisi PRS (*Poligenic Risk Score*): esquizofrènia ($R^2 = 2,28\%$; $P = 1,21 \times 10^{-26}$), TDAH ($R^2 = 1,39\%$; $P = 4,5 \times 10^{-17}$), personalitat amb tendència a assolir riscos ($R^2 = 0,60\%$; $P = 2,7 \times 10^{-08}$), TDM ($R^2 = 1,21\%$; $P = 4,35 \times 10^{-15}$), comportament agressiu en nens ($R^2 = 0,3\%$; $P = 8,8 \times 10^{-05}$) i personalitat antisocial ($R^2 = 1,33\%$; $P = 2,2 \times 10^{-16}$). Aquesta és la metanàlisi de GWAS de dependència de cocaïna més gran publicada fins ara. Tot i les limitacions de l'estudi derivades de la reduïda mida mostral, s'han identificat regions potencialment implicades en la dependència de cocaïna i hem trobat evidències que hi ha factors genètics de risc comuns entre aquesta patologia i les condicions comòrbides testades.

Referència:

Judit Cabana-Domínguez, Anu Shivalikanjli, Noèlia Fernández-Castillo, Bru Cormand. *Genome-wide association meta-analysis of cocaine dependence: shared genetics with comorbid conditions*. *Neuropsychopharmacology* (sotmès).

Genome-wide association meta-analysis of cocaine dependence: shared genetics with comorbid conditions.

Judit Cabana-Domínguez^{1,2,3,4}, Anu Shivalikanjli^{1,2,3,4}, Noèlia Fernàndez-Castillo^{1,2,3,4*}, Bru Cormand^{1,2,3,4*}

¹Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Spain

³Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain

⁴Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR-SJD), Esplugues de Llobregat, Catalonia, Spain

*Equally contributed

CORRESPONDING AUTHORS:

Bru Cormand. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, edifici Prevosti, 3^a planta, 08028, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: (+34) 93 4021013. Fax: (+34) 93 4034420; Email: bcormand@ub.edu

Noèlia Fernàndez Castillo. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, edifici Prevosti, 3^a planta, 08028, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: (+34) 93 4037082. Fax: (+34) 93 4034420; Email: noefernandez@ub.edu

Running title: GWAS meta-analysis of cocaine dependence

Abstract

Cocaine dependence is a complex neuropsychiatric disorder that is highly comorbid with other psychiatric traits. Association studies suggest that common genetic variants contribute substantially to cocaine dependence susceptibility. On the other hand, increasing evidence supports the role of shared genetic risk factors in the lifetime co-occurrence of psychiatric traits and cocaine dependence. Here we performed a genome-wide association study (GWAS) meta-analysis of cocaine dependence using four different datasets from dbGaP (2,085 cases and 4,293 controls, all of them with European ancestry). Although no genome-wide significant hits were found in the SNP-based analysis, the gene-based analysis identified *HIST1H2BD* as significantly associated with cocaine-dependence (10% FDR). This gene is located in a region on chromosome 6 that is enriched in histone-related genes, previously associated with schizophrenia. The top SNPs of this region, rs806973 and rs56401801 ($P=3.14e-06$ and $3.44e-06$, respectively), are eQTLs for different genes in multiple brain areas. Furthermore, we performed LD Score regression (LDSC) analysis with other comorbid conditions and found significant genetic correlations between cocaine dependence and ADHD, SCZ, MDD and risk-taking behavior. We also found that all tested phenotypes can significantly predict cocaine dependence status performing a PRS analysis: SCZ ($R^2=2.28\%$; $P=1.21e-26$), ADHD ($R^2=1.39\%$; $P=4.5e-17$), risk-taking behavior ($R^2=0.60\%$; $P=2.7e-08$), MDD ($R^2=1.21\%$; $P=4.35e-15$), children's aggressive behavior ($R^2=0.3\%$; $P=8.8e-05$) and antisocial behavior ($R^2=1.33\%$; $P=2.2e-16$). To our knowledge, this is the largest reported

cocaine dependence GWAS meta-analysis on European ancestry individuals. Despite the small sample size, we identified suggestive associations in regions that may be related to cocaine dependence. Furthermore, we found evidence for shared genetic risk factors between cocaine dependence and several comorbid psychiatric traits.

Introduction

Cocaine is one of the most used illicit drugs worldwide and its use produces serious health problems. In Europe, around 5.2% of adults (from 15 to 64 years old) have tried cocaine (EMCDDA, 2017), but at most 20% will develop addiction (Wagner and Anthony, 2002). Cocaine dependence prevalence in European population can be estimated around 1.1%, similar to the prevalence observed in American populations (Compton *et al*, 2007).

Cocaine dependence is a complex psychiatric disorder that results from the interaction of environmental and genetic risk factors. Because it is one of the most heritable psychiatric disorders, with an estimated heritability around 65-79% (Ducci and Goldman, 2012), many case-control association studies in candidate genes have been performed. However, only a few genetic risk variants have been identified and replicated so far, such as rs16969968 in the *CHRNA5* gene and rs806368 in *CNR1* (Bühler *et al*, 2015). Right now, only one genome-wide association study (GWAS) on cocaine dependence has been performed, which combines European- and African- American individuals (Gelernter *et al*, 2014). In the combined sample, using the symptom count strategy, one hit in the *FAM53B* gene was identified.

Several studies have shown that substance use disorders (SUD), and especially cocaine dependence, is highly comorbid with other psychiatric disorders and related phenotypes like aggressive, antisocial or risk taking behaviors (Bezinović and Malatestinić, 2009; Hasin and Kilcoyne, 2012). For example, the occurrence of lifetime SUD in patients with schizophrenia (SCZ) is 70-80%, in attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is 39.2% and in major depression disorder (MDD) is 16.1% (Currie *et al*, 2005; Piñeiro-Dieguez *et al*, 2016; Westermeyer, 2006). Conversely, about 81% of substance abuse/dependence patients have at least one comorbid mental disorder: 33% MDD, 11% SCZ and 9% personality disorders (Shantna *et al*, 2009). Such comorbidity is associated with an increase of severity for all disorders, although it is unclear whether this relationship is causal or the result of shared genetic and/or environmental risk factors. Some studies have started to inspect these relationships using both genetic correlation and polygenic risk score approaches, supporting the hypothesized role of shared

genetic risk factors in the lifetime co-occurrence of several psychiatric disorders and SUD (Carey *et al*, 2016; Hartz *et al*, 2017; Reginsson *et al*, 2018; Du Rietz *et al*, 2017).

Here we performed a GWAS meta-analysis in cocaine dependence in samples with European ancestry using datasets from the dbGaP repository. Then we investigated the shared genetics between cocaine dependence and other psychiatric traits.

Materials and methods

Detailed description of the materials and methods used can be found in the Supplementary Information.

Subjects

The case-control GWAS meta-analysis was performed using four datasets from the dbGaP repository (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap>) under the project 17170 (Table 1A). All cases used met DSM-IV criteria for cocaine dependence, although most of them are also dependent to other drugs of abuse. Drug abuse or dependence were discarded only in controls of the SAGE sample, whereas in the other studies general population individuals were used as controls.

Since samples 2-4 did not have enough controls to perform the association studies, we used controls from other datasets but genotyped with the same array and built using the same genome assembly. In all cases, patients and controls were from the same geographic area. In order to reduce bias, we merged controls with cases prior to quality control (QC) and imputation (Mitchell *et al*, 2014) (see Supplementary information for detailed description of subjects used in this study).

Quality control and association analyses

Prior to analysis, stringent quality control was performed on the genotyped markers and individuals in each sample using the standardized pipeline “RicoPili” (Ripke *et al.*, 2014). European ancestry individuals were selected based on principal component analysis (PCA): PC1 and PC2 were used to define a genetic homogenous population, excluding individuals with PC values greater than three standard deviations from the reference population (European individuals from 1000 Genomes Project Phase 3 (1KGP3)). Related individuals and genetic outliers were excluded. A permutation test for between-group IBS differences with fixed 10,000 permutations was performed to discard population stratification between cases and controls.

After QC, non-genotyped markers were imputed using the European individuals from the 1KGP3 reference panel in MINIMAC3 (Das *et al*, 2016, <https://genome.sph.umich.edu/wiki/Minimac3>).

Table 1. Description of the samples used in this study.

A. Description of dbGaP samples used in the cocaine dependence GWAS meta-analysis.

Sample	N cases	%F cases	N controls	%F controls	Genotyping chip	dbGaP code
Sample 1 (SAGE)	468	39.3%	1284	69.9%	Illumina ILMN_Human-1	phs000092.v1.p1
Sample 2	609	45.9%	410	50.2%	Illumina HumanOmni1-Quad_v1-0_B	phs000952.v1.p1 (cases/controls) + phs000179.v5.p2 (controls)
Sample 3	504	44.3%	1190	62%	Illumina Human660W-Quad_v1_A	phs000277.v1.p1 (cases/controls) + phs000170.v2.p1 (controls)
Sample 4	504	36.7%	1409	41.9%	Illumina HumanOmni1-Quad_v1-0_B	phs000425.v1.p1 (cases/controls) + phs000524.v1.p1 (controls)
TOTAL	2,085		4,293			

B. Description of samples used to inspect shared genetic factors between cocaine dependence and comorbid conditions.

GWAS	Abbreviation	N individuals	Reference	Website
Schizophrenia European meta-analysis	SCZ	34,241 cases and 45,604 controls	Ripke <i>et al</i> , 2014b	
Attention deficit/hyperactivity disorder European meta-analysis	ADHD	1,235 parent affected-offspring trios 19,099 cases and 34,194 controls	Demontis <i>et al</i> , 2017	PGC: https://www.med.unc.edu/pgc/results-and-downloads
Major depression disorder meta-analysis	MDD	59,851 cases and 113,154 controls	Wray <i>et al</i> , 2018	
Children's aggressive behavior GWAS from EAGLE	Child-Aggre	18,988 individuals	Pappa <i>et al</i> , 2016	
Antisocial behavior meta-analysis	ASB	16,400 individuals	Tielbeek <i>et al</i> , 2017	BroadABC: http://broadabc.ctglab.nl/summary_statistics
Risk taking behavior dataset	RT	325,821 individuals		UK BioBank: https://sites.google.com/broadinstitute.org/ukbbgwas_results/home?authuser=0

%F= percentages of females within each sample among cases and controls

For each sample, case-control GWAS was conducted using logistic regression under the additive model in PLINK v1.9 (Purcell *et al.*, 2007, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>). The 10 firsts PCs were included as covariates to correct for population stratification, and only variants with imputation INFO score >0.8 and minor allele frequency (MAF) >0.01 were considered.

Meta-analysis

In total, 2,085 cases and 4,293 controls were meta-analyzed using an inverse-variance weighted fixed effects model in METAL (Willer *et al.*, 2010, <http://csg.sph.umich.edu//abecasis/Metal/>). Association results were considered only for variants with an effective sample size [$N=2/((1/N_{cases})+(1/N_{controls}))$] greater than 70% of the full meta-analysis. Heterogeneity across studies was tested with the Cochran's Q test and quantified with the I² heterogeneity index, implemented in METAL.

Manhattan plot and Q-Q plot from each sample and the meta-analysis results were generated with the library "qqman" implemented in R.

LD Score intercept evaluation

LD score (LDSC) regression analysis was used to calculate LDSC intercept by regressing the chi-square statistics from GWAS against LD scores for each SNP (downloaded from GitHub website, <https://github.com/bulik/ldsc>).

SNP heritability

LDSC was used to assess the proportion of phenotypic variance explained by common SNPs in the liability-scale, using a population prevalence for cocaine dependence of 1.1% (Compton *et al.*, 2007).

Partitioned heritability analysis was performed based on 24 functional overlapping annotations described previously (Finucane *et al.*, 2015). Enrichment in the heritability of a functional category was defined as the proportion of SNP heritability explained divided by the proportion of SNPs. Additionally, we performed a heritability analysis based on the cell type-specific regulatory element H3K4me3, highly associated to promoters (Howe *et al.*, 2017; Woo *et al.*, 2017), from the Roadmap Epigenomic Mapping Consortium (Ernst and Kellis, 2015; Kundaje *et al.*, 2015). The threshold for significance was calculated using the Bonferroni correction for multiple testing ($P < 2e-03$ for partitioned heritability and $P < 5.6e-04$ for cell type-specific analysis).

Functional annotation of SNPs

SNPs were functionally annotated using FUMA (Watanabe *et al*, 2017, <http://fuma.ctglab.nl/>). FUMA define lead SNPs as signals that are significantly associated with the phenotype of interest (we considered suggestive associations ($P < 1e-05$)) and independent to each other ($r^2 < 0.1$). For each lead SNP, a “Genomic risk locus” is defined, including all independent signals that are physically close or overlapping in a single locus. The variants located in a “Genomic risk locus” were explored considering the following functional annotations: eQTL (from GTEx v6/v7 and BRAINEAC), CADD v1.3, ANNOVAR, RegulomeDB v1.1, 15-core chromatin state and GWAS-catalog e91.

Gene-based and gene-set association analyses

Gene-based and gene-set association analyses were performed with MAGMA 1.05b (Willer *et al*, 2010) using the summary statistics from the cocaine dependence GWAs meta-analysis. For gene-based analysis, the SNP-wise mean model was used as the statistic test, considering p-values for SNPs located within the transcribed region. For multiple testing corrections, 10% FDR was considered.

Gene-set analysis was used to test for enrichment in association signals in genes belonging to specific biological pathways or processes. We performed a competitive test using: “All Canonical Pathways” (1,329 gene sets), “GO” (4,436 gene sets) and “BioCarta” (217 gene sets) provided by MsigDB 5.1 (<https://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/>). Multiple testing corrections were applied to each gene set separately. When gene sets are strongly overlapping, the Bonferroni correction can be quite conservative, and for that reason, we used an empirical multiple testing correction implemented in MAGMA, based on a permutation procedure.

Shared genetic factors between cocaine dependence and comorbid conditions

Subjects

We studied shared genetic factors between cocaine dependence and six previously described comorbid conditions using publicly available GWAS summary statistics of SCZ, ADHD, MDD, children’s aggressive behavior, antisocial behavior and risk-taking behavior (Table 1B). Summary statistics from the vitamin D levels GWAS of the UK BioBank was used as a negative control.

LDSC Genetic correlation

Genetic correlation between cocaine dependence and the six selected comorbid disorders/traits were calculated using LDSC 1.0.0 (Bulik-Sullivan *et al*, 2015a). Pre-computed LD scores from HapMap3_SNPs calculated on 378 phased European-ancestry individuals from 1KGP3 were used (available at <https://github.com/bulik/ldsc>) and summary statistics from all samples. After Bonferroni correction, the significance threshold was adjusted to $P < 7.1e-03$.

Furthermore, the genetic correlation of cocaine dependence with other traits available at LD Hub (Zheng *et al.*, 2017, <http://ldsc.broadinstitute.org/ldhub/>) was evaluated (Bonferroni correction threshold $P < 7.2e-05$).

Polygenic risk scores for cocaine dependence

Polygenic risk score (PRS) analysis was performed using the PRSice_2.1.0 software (Euesden, Lewis and O'Reilly, 2015, <https://github.com/choishingwan/PRSice>).

The four cocaine dependence datasets were merged using PLINK v1.9 and used as a target sample. After merging, strict QC was applied resulting in 5,957,307 SNPs in 2,083 cases and 4,287 controls. To assess population stratification PCA was performed, and the 10 first PCs and a dummy variable indicating genotyping-study was included in the PRS analysis as a covariate.

Summary statistics of the seven phenotypes described above were used as discovery samples, which were clumped ($r^2 < 0.1$ in a 250-kb window) to remove SNPs in LD. Then, PRSs were estimated for each discovery sample using a wide range of meta-analysis p-value thresholds (P_T) between $P_T = 1e-04$ and $P_T = 1$ at increments of $5e-05$. For each P_T , the proportion of variance explained (R^2) by each discovery sample was computed by comparing the full model (PRS + covariates) score to a reduced model (covariates only). The reported R^2 value is the difference between R^2 from the two models. For quantitative traits we performed linear regression analysis and for qualitative traits we used logistic regression and Nagelkerke's pseudo- R^2 values are shown.

As recommended, we used the significance threshold of $P = 0.004$ (Euesden *et al.*, 2015). Bonferroni correction was applied considering the seven tested phenotypes ($P < 5.7e-04$).

Gene-based meta-analysis with comorbid conditions

Six independent gene-based meta-analyses were performed between cocaine dependence and the six phenotypes previously described using MAGMA 1.05b. Gene-based analysis of each independent dataset was performed as previously described. Then, the weighted Stouffer's Z method was used to combine the Z-scores for each gene across cohorts, with weights set to the square root of the sample size. Significance threshold was calculated using the Bonferroni correction to control for multiple testing ($P < 2.8e-06$).

Results

GWAS results

We performed a GWAS meta-analysis of cocaine dependence using four datasets from the dbGaP repository. In total, we meta-analyzed 9,290,362 common genetic variants in 2,085 cases and 4,293 controls of European ancestry. No marker demonstrated significant heterogeneity between studies (Figure S1). The Q-Q plot (Figure 1A) displayed a λ of 1.06, comparable with other GWAS. The LDSC analyses estimated an intercept of 1.01 (SE = 0.006; $P = 0.1$), not significantly greater than 1, indicating that most of the observed inflation can be attributed to polygenicity rather than to residual population stratification or cryptic relatedness (Bulik-Sullivan *et al*, 2015b).

None of the analyzed variants reached the threshold for genome-wide significance ($P < 5e-08$; Figure 1B).

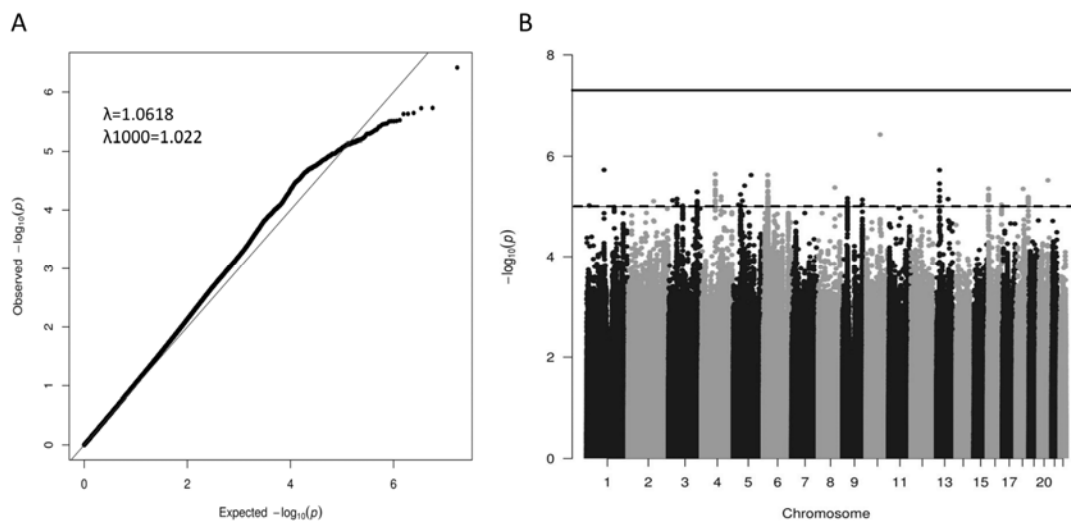


Figure 1. Results from the GWAS meta-analysis on cocaine dependence. A) Q-Q plot and B) Manhattan plot. Continuous line: threshold for genome-wide significance ($P < 5e-08$). Discontinuous line: threshold for suggestive associations ($P < 1e-05$).

Polygenic architecture of cocaine dependence

We applied LDSC analysis to assess the proportion of phenotypic variance explained by common SNPs. The estimated SNP heritability in liability-scale was $h_{2SNP} = 0.30$ (SE = 0.06; $P = 2.4e-07$). Then we performed partitioned heritability analysis based on functional genomic categories and found significant enrichment in the heritability by SNPs located in intronic regions (enrichment = 2.17; SE = 0.45; $P = 1.2e-03$), and a nominal result for conserved genomic regions (enrichment = 23.63; SE=8.57; $P = 4e-03$) (Figure S2). Furthermore, the analysis of the promoter-associated mark H3K4me3 in individual cells/tissues, revealed an enrichment in ten brain tissues and neuronal cell lines, although none of them overcame the Bonferroni correction for multiple testing (Figure S3).

SNP Functional annotation

In order to identify potentially interesting regions, we performed functional annotation analyses with FUMA considering all those SNPs showing suggestive associations ($P < 1e-05$). We identified 23 lead

SNPs which correspond to 22 genomic risk loci that include 112 genes (Table 2). The most interesting risk locus, located on chromosome 6 (chr6:26,148,326-28,301,195; GRCh37/hg19), is defined by two lead SNPs (rs806973 and rs56401801, GWAs $P = 3.1e-06$ and $3.4e-06$, respectively) and it includes 77 genes and 458 nominally associated SNPs. Most of the SNPs in this region are brain eQTLs for different genes, including *BTN3A2*, *HIST1H2AK*, *ZSCAN31*, *PRSS16* and *ZNF184*. Also, it is important to notice that many SNPs in this region have a CADD score greater than 12.37, highlighting deleterious variants, and a low RegulomeDB score, suggesting a regulatory functionality (Figure 2 and S4). Another interesting region was identified on chromosome 1 (chr1:15,916,714-16,049,893) defined by the lead SNP rs148069235 (GWAS $P = 9.5e-06$). This region includes 236 SNPs that cover 6 genes, and three of them (*PLEKHM2*, *DDI2* and *SLC25A34*) have several brain eQTLs in this region (Figure S5). Finally, another region on chromosome 13 (chr13:36,947,826-37,019,186), defined by the lead SNP rs79309473 (GWAS $P = 1.8e-06$), includes 5 genes and 26 nominally associated SNPs, many of them brain eQTLs for the *SOHLH2* gene (Figure S6).

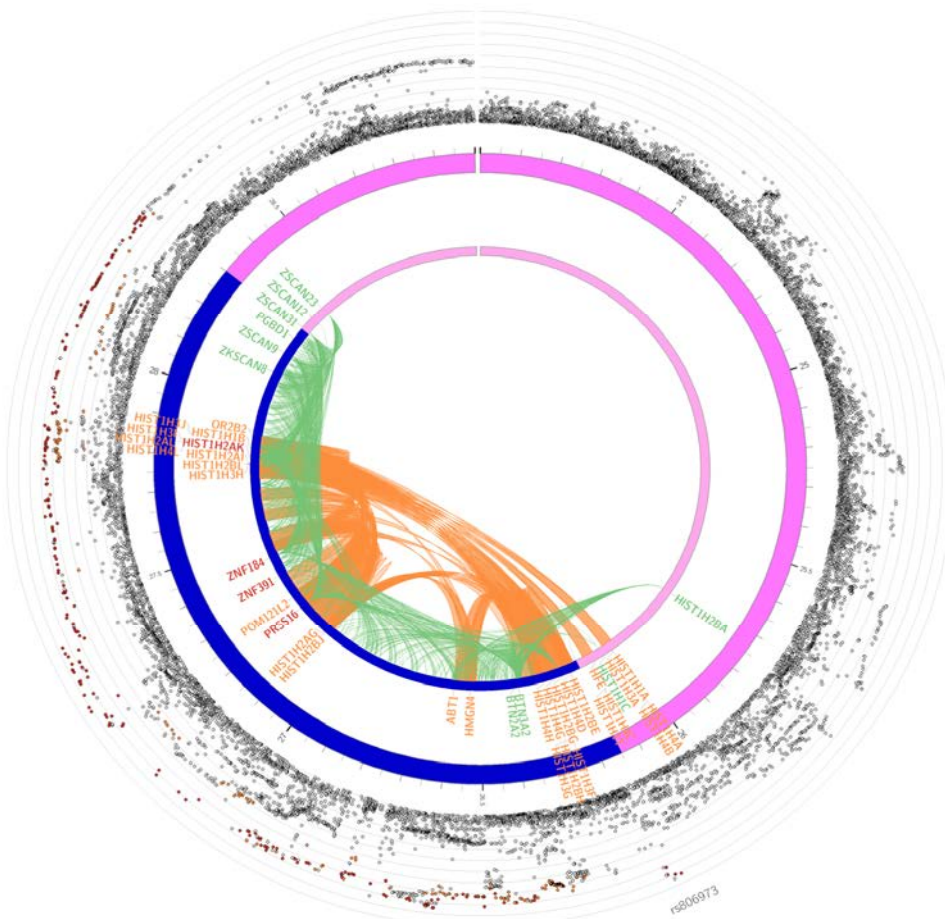


Figure 2. Circo-plot from genomic risk loci on chromosome 6 by FUMA. The most outer layer is the Manhattan plot (only SNPs with $P < 0.05$ are displayed). SNPs in genomic risk loci are color-coded as a function of their maximum r^2 to the lead SNPs in the locus, as follows: red ($r^2 > 0.8$), orange ($r^2 > 0.6$), green ($r^2 > 0.4$), blue ($r^2 > 0.2$) and grey ($r^2 \leq 0.2$). The rs ID of the top SNPs in the risk locus is displayed in the most outer layer. Y-axis is ranged between 0 to the maximum $-\log_{10}(P\text{-value})$ of the SNPs. The second layer is the chromosome ring, the genomic risk locus is highlighted in blue. Here genes are mapped by chromatin interactions (orange) or eQTLs (green). When the gene is mapped by both, it is colored in red.

Table 2. Genetic risk loci of cocaine dependence GWAS meta-analysis identified with FUMA.

Genomic Locus	Position	Lead SNPs	SNP position	GWAS P-value	nSNPs	nGenes	Genes
1	chr1:15916714-16049893	rs148069235	15950064	9.52E-06	236	6	<i>DNAJC16; AGMAT; DDI2; RSC1A1; PLEKHM2; SLC25A34</i>
2	chr1:104966872-104966872	rs72685414	104966872	1.87E-06	1	0	
3	chr3:50615472-51356217	rs148179194	50798652	7.03E-06	152	3	<i>C3orf18; HEMK1; DOCK3</i>
4	chr3:84862871-84961810	rs6767407	84955841	9.61E-06	27	0	
5	chr3:172170104-172214001	rs57361543	172212144	5.09E-06	28	2	<i>GHSR; TNFSF10</i>
6	chr4:82943149-83005137	rs7675557	82970816	2.28E-06	16	1	<i>RASGEF1B</i>
7	chr4:117560979-117607439	rs67769911	117607070	6.33E-06	18	1	<i>MIR1973</i>
8	chr5:30884915-31001774	rs62357000	30884915	9.20E-06	4	1	<i>CDH6</i>
9	chr5:44051305-44130776	rs4410642	44129423	9.42E-06	61	0	
10	chr5:54436897-54754893	rs334878	54519878	7.67E-06	90	9	<i>ESM1; CDC20B; GPX8; MCIDAS; CCNO; DHX29; SKIV2L2; PLPP1; DDX4</i>
11	chr5:106788817-106796026	rs71575441	106788817	2.37E-06	2	1	<i>EFNA5</i>
12	chr6:26148326-28301195	rs806973; rs56401801	26148326; 27301762	3.14E-06; 3.44E-06	458	77	Locus too broad
13	chr8:99193765-99226821	rs4734387	99193765	4.20E-06	35	1	<i>NIPAL2</i>
14	chr9:28890331-28993271	rs35735220	28963289	6.86E-06	113	0	
15	chr9:118176789-118273407	rs10121366	118244022	7.33E-06	54	0	
16	chr13:36947826-37019186	rs79309473	36972202	1.89E-06	26	5	<i>SOHLH2; SPG20; SPG20-AS1; CCNA1; SERTM1</i>
17	chr13:88150884-88150884	rs7332726	88150884	7.10E-06	1	0	
18	chr16:6654017-6695032	rs112252907	6675141	4.43E-06	42	1	<i>RBFOX1</i>
19	chr16:84581684-84590225	rs247831	84581893	9.17E-06	8	2	<i>TLDC1; COTL1</i>
20	chr18:43206985-43231622	rs1484873	43206985	4.45E-06	14	1	<i>SLC14A2</i>
21	chr18:73743937-73775398	rs73973283	73757906	6.46E-06	88	0	
22	chr20:54516338-54516338	rs11086525	54516338	3.01E-06	1	0	

Gene-based and gene-set analysis

The gene-based analysis mapped 3,418,270 SNPs from the GWAS meta-analysis to 18,069 protein-coding genes (Figure S7). The *HIST1H2BD* gene, located in the genomic region on chr6 showing a suggestive association in the SNP-based analysis, showed a significant gene-wise association with cocaine dependence (surpassing 10% FDR), although it did not overcome the Bonferroni correction for multiple testing. Then we performed competitive gene-set tests for all BioCarta, GO and Canonical Pathways. No gene sets remained significantly associated with cocaine dependence after correction for multiple testing (information available upon request), although the BioCarta gene set “BIOCARTA TNFR2 PATHWAY” showed a possible trend (uncorrected $P = 5.38e-04$, corrected $P = 0.09$), that was also the most significantly associated canonical pathway gene set. On the other hand, from the 10 GO gene sets with lower p-values, seven were related to synapse organization, glutamatergic neurotransmission and brain functions.

Cocaine dependence and shared genetic factors with comorbid conditions

Cocaine dependence is highly comorbid with other psychiatric disorders like SCZ, ADHD and MDD, and also with other phenotypes like aggressive behavior (Child-Aggre), antisocial behavior (ASB) or risk taking (RT). In order to investigate whether these phenotypic correlations are genetically mirrored, we performed a genetic correlation analysis using LDSC analysis and found significant genetic correlations ($P < 7.1e-03$) between cocaine dependence and SCZ ($rg = 0.2$; $SE = 0.05$; $P = 1e-04$), ADHD ($rg = 0.5$; $SE = 0.08$; $P = 1.6e-09$), MDD ($rg = 0.4$; $SE = 0.08$; $P = 6.6e-07$) and RT ($rg = 0.35$; $SE = 0.06$; $P = 9.1e-08$) (Figure 3A). However, no significant genetic correlation was found with Child-Aggre and ASB, as well as with a negative control (Vitamin D levels).

On the other hand, we tested genetic correlations between cocaine dependence and all the GWAS summary statistics publicly available in the LD Hub. From the 690 tested traits, 109 demonstrated significant correlation after Bonferroni correction, including educational achievement (e.g. intelligence and college completion), reproductive traits (e.g. age of the first birth and age starting oral contraceptive pill), familiar situation (e.g. adopted as a child, parent’s age at death and tobacco smoke exposure), as well as psychiatric traits (e.g. neuroticism, depressive symptoms and loneliness) (Figure S8; further information available upon request).

We also investigated the shared genetic etiology between cocaine dependence and comorbid phenotypes through PRS analysis, and tested whether these phenotypes can predict cocaine dependence status. For all the discovery samples tested, PRS significantly predicted cocaine dependence: SCZ (pseudo- $R^2 = 2.28\%$, $P_T = 0.4911$, $P = 1.21e-26$), ADHD (pseudo- $R^2 = 1.39\%$, $P_T =$

0.04275, $P = 4.5e-17$), ASB (pseudo- $R^2 = 1.33\%$, $P_T = 0.4055$, $P = 2.2e-16$), MDD (pseudo- $R^2 = 1.21\%$, $P_T = 0.0129$, $P = 4.35e-15$), RT ($R^2 = 0.60\%$, $P_T = 0.00135$, $P = 2.7e-08$) and Child-Aggre ($R^2 = 0.30\%$, $P_T = 0.3552$, $P = 8.8e-05$) (Figure 3B and S9). In all cases, the quantile plot shows the positive nature of this relationship as cocaine dependence increases with greater polygenic load at each discovery dataset (Figure S10). As expected, the negative control based on vitamin D levels did not predict cocaine dependence ($R^2 = 0.07\%$, $P_T = 0.03075$, $P = 0.06$).

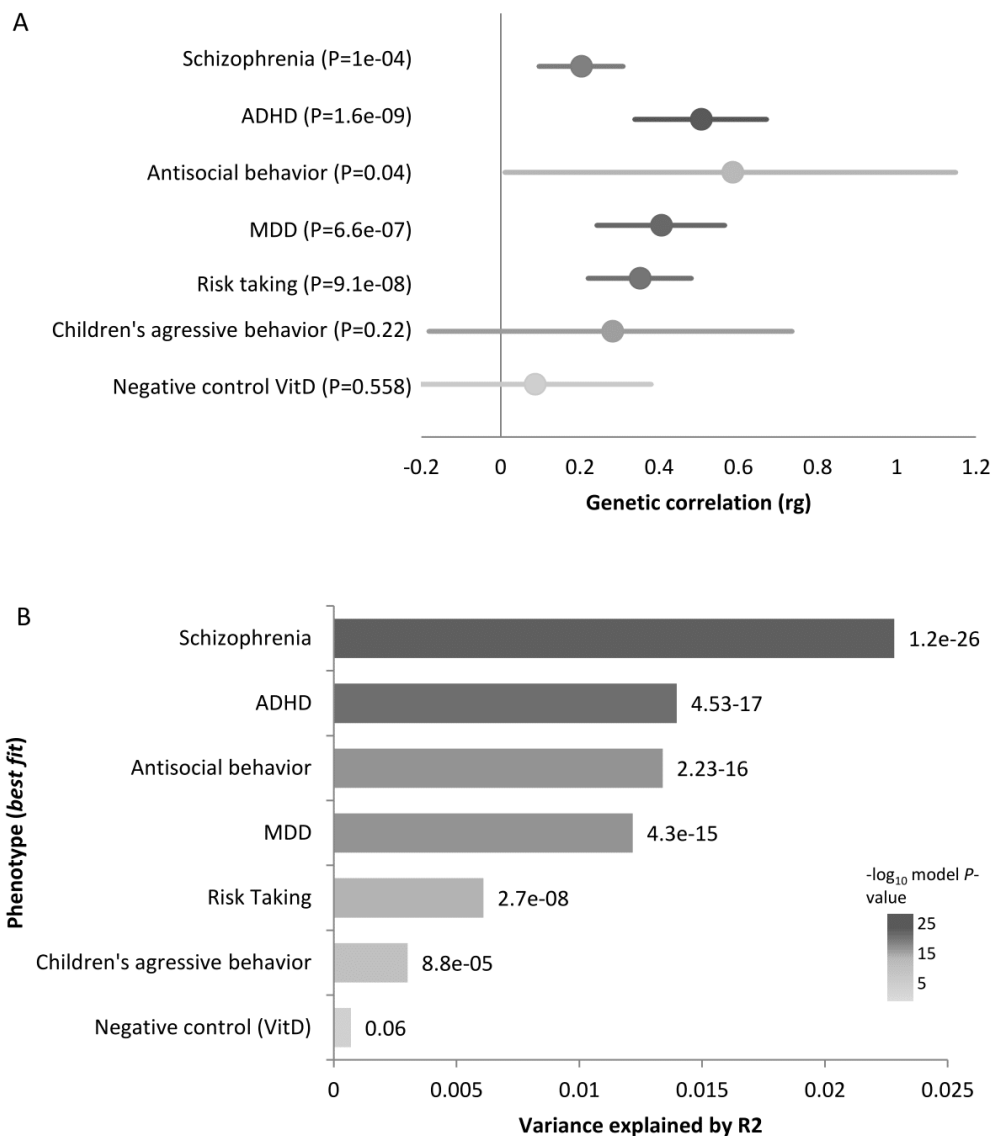


Figure 3. Shared genetic factors between cocaine dependence and comorbid conditions. A) Results from LDSC regression analysis showing genetic correlation (rg) between cocaine dependence and several traits. Error bars indicate 95% confidence limits. The significance threshold was set to $P < 7.1e-03$. B) Best fit results from PRS for each tested phenotyped. Values displayed next to each bar represent the p-value for significance for the most predictive models. The significance threshold was set to $P < 5.7e-04$.

Gene-based meta-analysis with comorbid conditions

Finally, we performed a gene-based meta-analysis between cocaine dependence and each of the six related phenotypes in order to identify new genes involved in both disorders. However, the differences

in the sample size of the different dataset pairs hampered this approach. The most interesting results were obtained when we combined cocaine dependence with ADHD. We found significant association with two new genes: *AMIGO3* and *BSN* (combined $P = 4.24e-07$ and $5.13e-07$, respectively), and also with 19 of the 20 genes already identified in the gene-based analysis performed in ADHD meta-analysis (Demontis *et al*, 2017). Four of these 19 associations increased significance by at least one order of magnitude in the combined analysis (*TIE1*, *CDH8*, *ELOVL1* and *CCDC24*) (Table S1).

The gene-based meta-analysis between cocaine dependence and SCZ revealed 360 associations: 28 new genes and 332 that were already highlighted in the SCZ study alone. However, all of the new findings were driven by the SCZ dataset. Three of the 332 genes increased the significance of the association by three orders of magnitude (*BTN3A2*, *HIST1H2BD* and *SLC17A1*), 15 genes by two orders of magnitude and 73 by one order of magnitude (further information available upon request).

No relevant results were obtained in the gene-based meta-analysis of cocaine dependence with MDD, RT, ASB or Child-Aggre.

Discussion

To our knowledge, this is the largest GWAS meta-analysis on cocaine dependence performed to date in individuals with European ancestry. Although no genome-wide significant (GWS) hits were found, gene-based analysis identified *HIST1H2BD* as significantly associated with cocaine dependence (10% FDR). This gene is located in a region of chr6 that is enriched in immune system and histone-related genes. Interestingly, immune and histone pathways have been previously associated with other psychiatric disorders like schizophrenia, major depression and bipolar disorder (O'Dushlaine *et al*, 2015). Moreover, this region overlaps with the most significant and best replicated region associated with SCZ. Indeed, we found five SNPs on this region (rs16897515, rs17693963, rs34706883, rs41266839 and rs55834529) nominally associated with cocaine dependence ($P < 1e-04$) that had previously been associated with schizophrenia or bipolar disorder. The most relevant is rs17693963, reported in three different studies (Bergen *et al*, 2012; Ruderfer *et al*, 2014) and it's a brain eQTL for *PRSS16*, *ZSCAN9*, *ZNF184* and *ZSCAN31*. Furthermore, a transcriptomic study performed in lymphoblastoid cell lines of 413 schizophrenic cases and 446 controls found that the top differentially expressed genes were encoded in this region (e.g. *HIST1H2BD*, *HIST1H2BC*, *HIST1H2BH*, *HIST1H2BG* and *HIST1H4K*) (Sanders *et al*, 2013).

Cocaine dependence is a highly heritable disorder (around 65-79% (Ducci and Goldman, 2012)). The results from LDSC analysis showed that common SNPs significantly capture almost a half of the cocaine dependence heritability ($h^2_{SNP} = 0.3$; $P = 2.4e-07$). Similar results were obtained previously in alcohol

dependence (Mbarek *et al*, 2015) and other psychiatric disorders (Lee *et al*, 2013). Furthermore, the analysis of the promoter associated mark H3K4me3 in individual cells/tissues (Howe *et al*, 2017; Woo *et al*, 2017), highlighted a nominal enrichment of SNP heritability in brain tissues and neuronal cell lines. The highest enrichment was observed in substantia nigra, which plays an important role in reward and thus it may be related to the development of the dependence (Beaudoin *et al*, 2017).

It is known that all psychiatric disorders are highly comorbid. About 73.4% of cocaine abuse/dependence patients have comorbid mental disorders: 49.7% have personality disorders (e.g. 5.3% schizoid and 17% antisocial personality) and 61.5% other mental disorders (e.g. 23.4% MDD and 20.5% anxiety) (Arias *et al*, 2013). However, the reasons for these covariations remain largely unknown. In order to investigate whether the phenotypic correlations between cocaine dependence and six comorbid psychiatric traits are mirrored genetically, we performed genetic correlation analysis using LDSC and, for the first time, we found significant genetic correlation with ADHD, SCZ, MDD and risk-taking behavior. Furthermore, we used the PRS method that, in contrast to LDSC, uses individual-level SNP data, resulting in greater statistical power and allowing for direct testing of interaction effects. All the tested comorbid conditions can predict cocaine dependence status using PRS, suggesting that cocaine dependence is more likely in individuals with many risk alleles for the tested conditions than those with few risk alleles. To our knowledge, this is the first report of a shared etiology between cocaine dependence and ADHD, antisocial behavior, risk-taking behavior and children's aggressive behavior based on genome-wide data. Previous studies have reported significant PRS associations between cocaine dependence and SCZ or MDD (Carey *et al*, 2016; Hartz *et al*, 2017; Reginsson *et al*, 2018), and also between SUD and ADHD (Du Rietz *et al*, 2017), although our study used the largest sample of cocaine dependence for this type of analysis so far. This correlation can reflect biological pleiotropy, where similar genetic mechanisms influence more than one trait, or mediated pleiotropy, where one phenotype is causally related to a second phenotype, so that the variants associated with this phenotype are indirectly associated with the second one. Further studies are needed to identify the genetic pathways and neurobiological mechanisms underlying this genetic overlap.

Gene-based meta-analysis between different disorders allows identification of new genes involved at the same time in the different disorders considered. We performed this analysis for cocaine dependence with each of the comorbid conditions where genetic correlations were detected. The most interesting results were obtained when combining cocaine dependence and ADHD, identifying two new genes: *AMIGO3* and *BSN*, both involved in brain function. *AMIGO3* inhibits maturation of oligodendrocyte precursor cells and myelin production (Foale *et al*, 2017). *BSN* is a brain specific gene

involved in the organization of the cytomatrix at the presynaptic active zone which regulates neurotransmitter release (Südhof, 2004).

An important and controversial consideration in association studies for substance dependence is the selection of the control sample. Some studies use control individuals that have been exposed to the studied drug at least once in their life (Gelernter *et al*, 2014). In this case, the association study would pick up the predisposing genetic component related to the effects of the drug on the brain, but not the one related to impulsivity or risk taking behavior, very important in this disorder, as it fosters the first contact with the drug. Our results in the PRS analysis show that risk-taking behavior can predict cocaine dependence status, supporting the presence of shared genetic risk factors. For the above reasons, we have thus used unselected controls from the general population in our study (with the only exception of the SAGE sample). Using individuals exposed to the drug as controls may potentially lead to misidentification of genetic risk variants that are related to impulsivity and risk-taking traits. It is also true that using general population individuals could eventually dilute positive findings due to the presence of some cases in the control sample. However, based on the prevalence of cocaine dependence, the probability of false negative results due to this effect is low.

This study has strengths and limitations that need some discussion. We performed a GWAS meta-analysis using all the cocaine dependence datasets available in the dbGaP repository, but we could not find any GWS association, as expected given the limited sample size. However, these data allowed us to detect genetic correlations between cocaine dependence and several co-occurring conditions. Also, we calculated polygenic risk scores that explain only a small fraction of the variance in the target phenotype. To obtain a more comprehensive picture of the etiological overlap between cocaine dependence and comorbid conditions a larger sample will be needed, and other genetic factors should be included in the analysis (e.g. CNVs and rare variants). On the other hand, some of the dbGaP datasets used included only cases but not control individuals. In consequence, we took controls from other datasets that can introduce potential biases into the experimental design. Nevertheless, we performed very strict quality controls to avoid population stratification: the paired case and control samples were genotyped with the same platform and come from the same geographical area, the merging of the different datasets was performed prior to quality control and imputation, and after that a permutation test was performed to discard population stratification (Mitchell *et al*, 2014). Finally, the disease phenotype has not been excluded in any of the control samples, which may potentially dilute positive findings in the association study (but not lead to false positive results).

In conclusion, we reported the largest cocaine dependence GWAS meta-analysis on individuals of European ancestry, even though no GWS hits could be identified. Increasing the number of individuals

of this study may increase the power to detect significant associations. Furthermore, we found evidences of a shared genetic etiology between cocaine dependence and several comorbid conditions. Further studies are needed to identify the genetic pathways and neurobiological mechanisms that underlie this genetic overlap.

Funding and disclosure

Major financial support for this research was received by BC from the Spanish 'Ministerio de Economía y Competitividad' (SAF2015-68341-R) and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2017-SGR-738). The research leading to these results has also received funding from the European Union Seventh Framework Program [FP7/2007-2013] under grant agreement n° 602805 (Aggressotype) and from the European Union H2020 Program [H2020/2014-2020] under grant agreements n° 667302 (CoCA) and 643051 (MiND). JC-D was supported by 'Generalitat de Catalunya' (2015 FI_B 00448), AS by the H2020 MiND project and NF-C by 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras' (CIBERER) and by an EMBO short-term fellowship (ASTF 573-2016).

Acknowledgments

We are really thankful to Paula Rovira, Nina Mota, Concepció Arenas and Oscar Lao for their support with GWAS analysis. Also we are very grateful to the developers of the software tools used, especially Stephan Ripke and Raymond Walters.

The authors acknowledge the contribution of data from dbGAP accessed through project number 17170: the Study of Addiction: Genetics and Environment (SAGE), one of the genome-wide association studies funded as part of the Gene Environment Association Studies (GENEVA) under GEI (supported by U01 HG004422, U01 HG004446, U01HG004438, HHSN268200782096C; and support for collection of datasets and samples was provided by the COGA; U10 AA008401, COGEND; P01 CA089392 and FSCD; R01 DA013423); GWAS of Heroin Dependence (supported by R01DA17305); GWAS of Cocaine Dependence in Two Populations (supported by RC2 DA028909, R01 DA12690, R01 DA12849, R01 DA18432, R01 AA11330, and R01 AA017535); CRIC Study (supported by U01DK060990, U01DK060984, U01DK061022, U01DK061021, U01DK061028, U01DK60980, U01DK060963 and U01DK060902); CIDR-Gelernter Study, a genome-wide association study funded as part of the Genetics of Alcohol Dependence in American Populations (supported by U01HG004438 and HHSN268200782096C); the COPDGene study (supported by U01HL089856 and U01HL089897, and the COPD Foundation through contributions made by an Industry Advisory Board comprised of Pfizer, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Novartis, and Sunovion); and Personalized Medicine Research Project (PMRP) (supported by U01HG004608, U01HG004438 and U01HG004603).

References

- Arias F, Szerman N, Vega P, Mesias B, Basurte I, Morant C, et al (2013). Abuso o dependencia a la cocaína y otros trastornos psiquiátricos. Estudio Madrid sobre la prevalencia de la patología dual. *Rev Psiquiatr Salud Ment* 6: 121–128.
- Beaudoin GMJ, Gomez JA, Perkins J, Bland JL, Petko AK, Paladini CA (2017). Cocaine selectively reorganizes excitatory inputs to Substantia Nigra pars compacta dopamine neurons. *J Neurosci* 38: 1975–17.

- Bergen SE, O'Dushlaine CT, Ripke S, Lee PH, Ruderfer DM, Akterin S, et al (2012). Genome-wide association study in a Swedish population yields support for greater CNV and MHC involvement in schizophrenia compared with bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 17: 880–886.
- Bezinović P, Malatestinić D (2009). Perceived exposure to substance use and risk-taking behavior in early adolescence: cross-sectional study. *Croat Med J* 50: 157–64.
- Bühler KM, Giné E, Echeverry-Alzate V, Calleja-Conde J, Fonseca FR De, López-Moreno JA (2015). Common single nucleotide variants underlying drug addiction: More than a decade of research. *Addict Biol* 20: 845–871.
- Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Anttila V, Gusev A, Day FR, Loh PR, et al (2015a). An atlas of genetic correlations across human diseases and traits. *Nat Genet* 47: 1236–1241.
- Bulik-Sullivan BK, Loh P-R, Finucane HK, Ripke S, Yang J, Patterson N, et al (2015b). LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies. *Nat Genet* 47: 291–295.
- Carey CE, Agrawal A, Bucholz KK, Hartz SM, Lynskey MT, Nelson EC, et al (2016). Associations between Polygenic Risk for Psychiatric Disorders and Substance Involvement. *Front Genet* 7: 149.
- Compton WM, Thomas YF, Stinson FS, Grant BF (2007). Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV drug abuse and dependence in the United States: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry* 64: 566–576.
- Currie SR, Patten SB, Williams JVA, Wang J, Beck CA, El-Guebaly N, et al (2005). Comorbidity of major depression with substance use disorders. *Can J Psychiatry* 50: 660–666.
- Das S, Forer L, Schön herr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, et al (2016). Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet* 48: 1284–1287.
- Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, et al (2017). Discovery Of The First Genome-Wide Significant Risk Loci For ADHD. *bioRxiv* 145581doi:10.1101/145581.
- Ducci F, Goldman D (2012). The Genetic Basis of Addictive Disorders. *Psychiatr Clin North Am* 35: 495–519.
- EMCDDA (2017). Informe Europeo sobre Drogas 2017: Tendencias y novedades. doi:10.2810/882.
- Ernst J, Kellis M (2015). Large-scale imputation of epigenomic datasets for systematic annotation of diverse human tissues. *Nat Biotechnol* 33: 364–376.
- Euesden J, Lewis CM, O'Reilly PF (2015). PRSice: Polygenic Risk Score software. *Bioinformatics* 31: 1466–1468.
- Finucane HK, Bulik-Sullivan B, Gusev A, Trynka G, Reshef Y, Loh P-R, et al (2015). Partitioning heritability by functional annotation using genome-wide association summary statistics. *Nat Genet* 47: 1228–1235.
- Foale S, Berry M, Logan A, Fulton D, Ahmed Z (2017). LINGO-1 and AMIGO3, potential therapeutic targets for neurological and dysmyelinating disorders? *Neural Regen Res* 12: 1247–1251.
- Gelernter J, Sherva R, Koesterer R, Almasy L, Zhao H, Kranzler HR, et al (2014). Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol Psychiatry* 19: 717–723.
- Hartz SM, Horton AC, Oehlert M, Carey CE, Agrawal A, Bogdan R, et al (2017). Association Between Substance Use Disorder and Polygenic Liability to Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 82: 709–715.
- Hasin D, Kilcoyne B (2012). Comorbidity of psychiatric and substance use disorders in the United States: current issues and findings from the NESARC. *Curr Opin Psychiatry* 25: 165–71.
- Howe FS, Fischl H, Murray SC, Mellor J (2017). Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *BioEssays* 39: 1–12.
- Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518: 317–330.
- Lee SH, Ripke S, Neale BM, Faraone S V, Purcell SM, Perlis RH, et al (2013). Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet* 45: 984–994.
- Mbarek H, Milaneschi Y, Fedko IO, Hottenga J-J, Moor MHM de, Jansen R, et al (2015). The genetics of alcohol dependence: Twin and SNP-based heritability, and genome-wide association study based on AUDIT scores. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 168: 739–748.
- Mitchell BD, Fornage M, McArdle PF, Cheng YC, Pulit SL, Wong Q, et al (2014). Using previously genotyped controls in genome-wide association studies (GWAS): Application to the Stroke Genetics Network (SiGN). *Front Genet* 5: 95.

- O'Dushlaine C, Rossin L, Lee PH, Duncan L, Parikshak NN, Newhouse S, et al (2015). Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. *Nat Neurosci* 18: 199–209.
- Piñeiro-Dieguez B, Balanzá-Martínez V, García-García P, Soler-López B, Domingo MA, Labarra JDA, et al (2016). Psychiatric Comorbidity at the Time of Diagnosis in Adults With ADHD: The CAT Study. *J Atten Disord* 20: 1066–1075.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81: 559–75.
- Reginsson GW, Ingason A, Euesden J, Bjornsdottir G, Olafsson S, Sigurdsson E, et al (2018). Polygenic risk scores for schizophrenia and bipolar disorder associate with addiction. *Addict Biol* 23: 485.
- Rietz E Du, Coleman J, Glanville K, Choi SW, O'Reilly PF, Kuntsi J (2017). Association of Polygenic Risk for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder With Co-occurring Traits and Disorders. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging* doi:10.1016/J.BPSC.2017.11.013.
- Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh KH, Holmans PA, et al (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511: 421–427.
- Ruderfer DM, Fanous AH, Ripke S, McQuillin A, Amdur RL, Gejman P V, et al (2014). Polygenic dissection of diagnosis and clinical dimensions of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 19: 1017–1024.
- Sanders AR, Göring HHH, Duan J, Drigalenko EI, Moy W, Freda J, et al (2013). Transcriptome study of differential expression in schizophrenia. *Hum Mol Genet* 22: 5001–14.
- Shantna K, Chaudhury S, Verma A, Singh A (2009). Comorbid psychiatric disorders in substance dependence patients: A control study. *Ind Psychiatry J* 18: 84–87.
- Südhof TC (2004). The synaptic vesicle cycle: Neurotransmitter release and the synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27: 509–47.
- Wagner FA, Anthony JC (2002). From first drug use to drug dependence: Developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology* 26: 479–488.
- Watanabe K, Taskesen E, Bochoven A Van, Posthuma D (2017). Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nat Commun* 8: 1826.
- Westermeyer J (2006). Comorbid schizophrenia and substance abuse: A review of epidemiology and course. *Am J Addict* 15: 345–355.
- Willer CJ, Li Y, Abecasis GR (2010). METAL: Fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics* 26: 2190–2191.
- Woo H, Ha SD, Lee SB, Buratowski S, Kim TS (2017). Modulation of gene expression dynamics by co-Transcriptional histone methylations. *Exp Mol Med* 49: e326–e326.
- Wray NR, Ripke S, Mattheisen M, Trzaskowski M, Byrne EM, Abdellaoui A, et al (2018). Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat Genet* 167577doi:10.1101/167577.
- Zheng J, Erzurumluoglu AM, Elsworth BL, Kemp JP, Howe L, Haycock PC, et al (2017). LD Hub: A centralized database and web interface to perform LD score regression that maximizes the potential of summary level GWAS data for SNP heritability and genetic correlation analysis. *Bioinformatics* 33: 272–279.

Supplementary information for:

GENOME-WIDE ASSOCIATION META-ANALYSIS OF COCAINE DEPENDENCE: SHARED GENETICS WITH COMORBID CONDITIONS.

Judit Cabana-Domínguez, Anu Shivalikanjli, Noèlia Fernández-Castillo, Bru Cormand.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

1. Detailed description of samples

A brief overview of the samples included can be found in Table 1A.

All datasets used in this work were obtained from dbGaP (database of Genotypes and Phenotypes / National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (NCBI/NLM), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap>) under the project “17170: Meta-analysis of cocaine dependence GWAS”.

All affected subjects included in this study meet DSM-IV criteria for cocaine dependence, although most of them are also dependent to other drugs of abuse. Diagnoses for schizophrenia, bipolar affective disorder or other major psychotic illnesses or gross cognitive impairment were exclusion criteria. Only for the SAGE controls, drug abuse or dependence could be discarded; for the other studies general population individuals were used as controls.

Sample 1 (SAGE)

The data presented in the current publication was downloaded from the dbGaP web site, under dbGaP accession phs000092.v1.p1. SAGE (Study of Addiction: Genetics and Environment) and it is part of the Gene Environment Association Studies initiative (GENEVA, www.genevastudy.org) funded by the National Human Genome Research Institute. Cases and controls included in this study belong to three large, complementary datasets: the Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism (COGA), the Family Study of Cocaine Dependence (FSCD), and the Collaborative Genetic Study of Nicotine Dependence (COGEND). All three studies include measures of basic socio-demographic variables (e.g: age, sex, race/ethnicity, family income...) and other important covariates and/or potential moderators of genetic effects (e.g: comorbid addictions and age at initiation of use for cigarettes, alcohol and drugs). Coding for both individual variables and indices has been standardized across studies and all subjects were assessed in person by trained research assistants. In total this dataset includes 1,897 European-American and African-American alcohol dependent subjects and 1,932 unrelated controls (Bierut *et al*, 2010). All cases met criteria for DSM-IV alcohol dependence, but some of them also met criteria for other drug dependence criteria such as cocaine, tobacco or cannabis.

Genomic DNA was extracted from whole blood samples and genotyping was performed on an Illumina ILMN_Human-1 chip (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). This dataset includes 1,130 cocaine-dependent individuals and 1,967 controls. After quality control (QC) and ancestry selection, 468 cases and 1,284 controls were selected.

The following datasets did not have controls that meet the inclusion criteria for the association study, so general population individuals with European ancestry genotyped with the same chip were obtained for each dataset of cases:

Sample 2

Cases: The data for the present analysis was downloaded from the dbGaP web site, under dbGaP accession phs000952.v1.p1 (Substance Dependence GWAS in European- and African- Americans). Samples were collected

in the course of three projects: Studies focused on alcohol dependence genetics, and studies focused on cocaine and opioid dependence genetics. This dataset includes 1,531 self-reported African-American subjects and 1,339 self-reported European-American subjects that meet DSM-IV criteria for opioid, cocaine or alcohol dependence. Genotyping was performed on an Illumina HumanOmni1-Quad_V1-0_B chip. This dataset includes 2,433 cocaine-dependent individuals and 61 controls.

Controls: The data presented in the current publication are based on the use of study data downloaded from the dbGaP web site, under dbGaP accession phs000179.v5.p2 (Genetic Epidemiology of COPD (COPDGene) Funded by the National Heart, Lung, and Blood Institute). Only control individuals genotyped with the Illumina HumanOmni1-Quad_V1-0_B chip from this dataset were used for our association study (493 controls).

Case and control samples were merged, after QC and ancestry selection, 609 cases and 410 controls were selected.

Sample 3

Cases: The data presented in the current publication are based on the use of study data downloaded from the dbGaP web site, under dbGaP accession phs000277.v1.p1 (GWAS of Heroin Dependence). This dataset is a collaboration of Australian and American researchers. Cases and controls were obtained from the several large investigations including: The Comorbidity and Trauma Study, Heroin Dependence in Western Australia, the OZ-ALC Study, a Twin Study of Mole Development in Adolescence, and ongoing genetic studies of substance dependence conducted by researchers at Yale and collaborating institutions. Cases met lifetime DSM-IV criteria for heroin dependence, but also for cocaine, alcohol or cannabis. Controls included screened individuals who did not meet DSM-IV heroin dependence criteria and unscreened general population controls. Genomic DNA was extracted from whole blood samples. Individuals used from this study were genotyped on an Illumina Human660W-Quad_v1_A chip (933 cocaine-dependent individuals and 349 controls). Although this dataset includes controls we added more individuals to increase the statistical power.

Controls: The data presented in the current publication are based on the use of study data downloaded from the dbGaP web site, under dbGaP accession phs000170.v2.p1. (eMERGE Genome-Wide Association Study on Cataract and Low HDL cholesterol). Only control individuals from this dataset were used for our association study, all of them genotyped on an Illumina Human660W-Quad_v1_A chip (1,370 controls).

Case and control samples were merged, and after QC and ancestry assessment, 504 cases and 1,190 controls were selected.

Sample 4

Cases: The data presented in the current publication are based on the use of study data downloaded from the dbGaP web site, under dbGaP accession phs000425.v1.p1 (Alcohol Dependence GWAS in European- and African Americans). The sample includes 1,889 African-American subjects (1,397 meet DSM-IV criteria for alcohol dependence and 491 are controls) and 1,020 European-American (1,010 meet the criteria for alcohol dependence and 9 are controls). All cases met criteria for DSM-IV alcohol dependence, but some of them also met criteria for cocaine, nicotine and opioid dependence. Genotyping was performed with the Illumina HumanOmni1-Quad_V1-0_B chip. This dataset includes 1,920 cocaine-dependent individuals and 500 controls.

Controls: The data presented in the current publication are based on the use of study data downloaded from the dbGaP web site, under dbGaP accession phs000524.v1.p1 (Chronic Renal Insufficiency Cohort Study (CRIC) GWAS). As this is a cohort study, all individuals were included in our analysis (3,541 controls), all of them genotyped with the Illumina HumanOmni1-Quad_V1-0_B chip.

Case and control samples were merged, and after QC and ancestry selection, 504 cases and 1,409 controls were selected.

Addictive Diseases

The data presented in the current publication are based on the use of study data downloaded from the dbGaP web site, under dbGaP accession phs001109.v1.p1 (Addictions: Genotypes, Polymorphisms, and Function/Human Genetic Correlates of Addictive Diseases). The sample includes 864 cases and 797 controls. All cases met the DSM-IV for at least one of the following drug of abuse: opioid, cocaine, nicotine, cannabis, stimulant, sedative and other drugs.

Only a few individuals of European ancestry meet criteria for cocaine dependence. Due to problems in the analysis of these data, this dataset was not included in the meta-analysis.

2. Bioinformatics pipeline for quality control and association analyses

Pre-imputation quality control and imputation were performed using the bioinformatics pipeline “RicoPili”, developed by the Psychiatric Genomics Consortium (PGC) Statistical Analysis Group (Ripke *et al.*, 2014). This pipeline generates high quality imputed data to perform association analyses and meta-analyses. To avoid potential study effects, all samples were processed separately.

2.1 Pre-imputation quality control

To reduce batch effect bias, cases and controls from samples 2-4 were merged prior to quality control and imputation using Plink v1.9 (Purcell *et al.*, 2007, <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>). In the three samples, cases and controls were genotyped with the same genotyping array and were built in the same assembly (Van Iperen *et al.*, 2017; Mitchell *et al.*, 2014; Uh *et al.*, 2012; Zuvich *et al.*, 2011).

Subjects and SNPs were included in the analyses based on the following default quality control parameters: SNP call rate > 0.95 (before sample removal), subject call rate > 0.98, autosomal heterozygosity deviation ($|F_{het}| < 0.2$), SNP call rate > 0.98 (after sample removal), difference in SNP missingness between cases and controls < 0.02, and SNP Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ($P > 1e-06$ in controls or $P > 1e-10$ in cases).

2.2 European subjects selection

In order to select European subjects from our samples, a principal component analysis (PCA) was performed using smartPCA incorporated in the software Eigensoft (Patterson *et al.*, 2006; Price *et al.*, 2006) using as a reference panel data from 1,092 individuals from the 1000 Genomes Project, phase 3 (1KGP3, high quality 3382774 variants). Only a set of high quality markers were used: autosomal SNPs found in all datasets, minor allele frequency (MAF) > 0.05, HWE $P > 1e-03$, SNP call rate > 0.98, which were pruned for linkage disequilibrium (LD) ($r^2 < 0.2$ in a 200Kb SNPs window). For this analysis AT/GC SNPs (strand ambiguous SNPs), the MHC region (6:25-35Mb) and Chr8 inversion (8:7-13Mb) were excluded. The subsample of European individuals from 1KGP3 (combined CEU, FIN, GBR, IBS, TSI) was used to define the center of an ellipsoid based on the mean values of principal component (PC) 1 and 2. Then, PC1 and PC2 for all individuals in our sample were used to define a genetic homogeneous population, excluding individuals with PC values greater than three standard deviations from the reference population.

Relatedness was tested with the same set of markers using identity-by-descent (IBD) analysis on PLINK v1.9, and one individual was excluded in pairs of subjects with $\pi_{\hat{}}$ > 0.2 (cases preferred kept over controls).

After relatedness and population stratification analysis, another quality control step was performed, using the same parameters than before.

2.3 Genotype imputation

Imputation was performed to obtain information about non-genotyped markers. We used the pre-phasing software SHAPE1 (Delaneau *et al.*, 2012) to estimate haplotypes and subsequently MINIMAC3 (Das *et al.*, 2016) for imputing genotypes. Imputing was done in chunks of 3 Mb using default parameters. The imputation reference data consisted of 2,504 phased haplotypes from the European individuals of the 1000 Genomes

Project, phase 3 data (1KGP3; October 2014, 81,706,022 variants, release 20130502) (Auton *et al*, 2015; Sudmant *et al*, 2015).

2.4 Genetic outliers and population stratification

After imputation, population stratification was reevaluated using a set of high quality markers (autosomal markers with MAF > 0.05, HWE $P > 1e-04$ and SNP call rate > 0.98), which were pruned for LD ($r^2 < 0.075$) resulting in a set of ~30,000 pruned markers. Based on genome-wide IBS information, PLINK performs some metrics to detect outliers. For a given individual, PLINK ranks all other individuals on the basis of how similar (in IBS terms) they are to this particular proband individual. Then it checks if the proband's closest neighbour is significantly more distant to the proband than all other individuals' nearest neighbour is to them. In other words, from the distribution of 'nearest neighbour' scores, one for each individual, it can calculate a sample mean and variance and transform this measure into a Z-score. If an individual has an extremely low Z-score (less than 4 standard deviation units), this would indicate that this individual is an outlier with respect to the rest of the sample and would be removed.

Second, a permutation test for between group IBS differences was performed with fixed 10,000 permutations. To test stratification effects between cases and controls, we reported the p-value of testing whether, on average, an individual was less similar to another phenotypically-discordant individual than would be expected by chance (denoted as T1 in PLINK). In samples 2 and 3, population stratification was detected (T1 p-value < 0.05). Then, for each sample, PCA was repeated following the steps described previously but, in this case, individuals with PC1 and PC2 values greater than two standard deviations from the mean obtained for European individuals were excluded. After this correction, population stratification analysis was repeated and the T1 p-value was > 0.05 in both cases.

For all samples PCA was redone after exclusion of genetic outliers. The first 20 PCs were tested for association with the phenotype using logistic regression and their impact on the genome-wide test statistics was evaluated using λ . The first 10 PCs (PC1 - PC10) were included as covariates for all samples.

3. GWAS and meta-analysis

Case-control association analyses using the imputed markers (INFO > 0.8 and MAF > 0.01) were performed for each sample by logistic regression under the additive model, with the derived 10 first PCs as covariates using PLINK v1.9. The summary statistics obtained from the different GWASs (in total 2,085 cases and 4,293 controls) were meta-analyzed using an inverse-variance weighted fixed effects model implemented in the software METAL (Willer, Li and Abecasis, 2010, <http://csg.sph.umich.edu//abecasis/Metal/>). Finally, the GWAS meta-analysis results were filtered by Neff, so only the markers which were supported by an effective sample size greater than 70% ($n \geq 1,964.76$) were included (a total of 9,290,362 markers).

$$\text{Neff} = 2 / (1/N_{\text{cases}} + 1/N_{\text{controls}})$$

Manhattan plot and quantile-quantile plot (Q-Q plot) from each sample and the meta-analysis results were performed using the library qqman implemented in R (Turner, 2014) (Figure 1).

Heterogeneity across studies was tested with the Cochran's Q test and quantified with the I2 heterogeneity index, implemented in METAL (Figure S1).

3.1 LD Score intercept evaluation

A light deviation from null was observed in the distribution of the test statistics in the Q-Q plot of the results from the GWAS meta-analysis (Figure 1). This deviation can appear because of polygenicity but also due to other confounding factors such as cryptic relatedness, population stratification or model misspecification. LD score regression (LDSC) analysis allows to differentiate between these two components (Bulik-Sullivan *et al*, 2015b). Under this model when regressing the chi-square statistics from GWAS against LD scores for each SNP (pre-computed LD-scores downloaded from the GitHub website (available on <https://github.com/bulik/ldsc>), the

intercept minus one is an estimator for the mean contribution of confounding bias to the inflation in the statistic tests. Based on regression of the test statistics from GWAS meta-analysis the estimated intercept was close to one (intercept = 1.01 (SE = 0.0068; $P = 0.1$)). Additionally, the ratio (ratio = (intercept-1)/(mean(chi²)-1)), which measures the proportion of the inflation in the mean chi-square that the LDSC intercept ascribes to causes other than polygenic heritability, was estimated to ratio = 0.24 (SE = 0.09). These results indicate that most of the inflation in the distribution of the test statistics is caused by polygenicity, but other confounding factors are also present.

3.2 SNP heritability

LDSC was used to estimate SNP heritability to evaluate how much of the variation in the phenotypic trait could be ascribed to common additive genetic variation. Only HapMap-3 SNPs from summary statistics of the GWAS meta-analyses and pre-computed LD scores (available on <https://github.com/bulik/ldsc>) were used in the analyses. The SNP heritability was calculated on the liability scale ($h_{2\text{liability}}$) using a prevalence of cocaine dependence of 1.1% in the population (Compton *et al*, 2007), and it was estimated to be $h_{2\text{liability}} = 0.30$ (SE = 0.06, $P = 2.4e-07$).

3.3 Partitioning heritability by functional annotation and cell type

Partitioning of the heritability by functional categories was done based on 53 functional overlapping annotations described in Finucane *et al.* (2015), but only 24 annotations were considered (annotations of 500bp-windows around each functional category were not considered). The pre-computed LDSC, the baseline model LD scores, regression weights and allele frequencies (based on the 1KGP3 European ancestry samples) were downloaded from <https://data.broadinstitute.org/alkesgroup/LDSCORE/>. Enrichment in the heritability of a functional category was defined as the proportion of SNP heritability explained divided by the proportion of SNPs (Finucane *et al*, 2015). Significance threshold was calculated using the Bonferroni correction to control for multiple testing ($P = 0.05/24 = 2e-03$). The analysis revealed significant enrichment in the heritability by SNPs located in intronic regions (enrichment = 2.17; SE = 0.45; $P = 1.2e-03$), and nominal association for conserved regions (enrichment = 23.63; SE = 8.57; $P = 4e-03$) (Figure S2).

Additionally, an heritability analysis based on cell-type specific regulatory elements was performed including information about H3K4me3 imputed gapped peaks generated by the Roadmap Epigenomic Mapping Consortium (Ernst and Kellis, 2015; Kundaje *et al*, 2015). This mark is highly associated with active regulatory regions, especially promoters (Howe *et al.*, 2017; Woo *et al.*, 2017), and can be used to identify specific cell types that are enriched among specific phenotypes (Roadmap Epigenomics Consortium *et al*, 2015; Trynka *et al*, 2013). In this analysis we identified enrichment in the heritability of SNPs located in specific regulatory elements of ten brain tissues, although none of them overcame Bonferroni corrections for multiple testing ($P < 5.6e-04$; Figure S3).

4. SNP Functional annotation

4.1 FUMA

Functional annotation of SNPs was performed using the FUMA web application (<http://fuma.ctglab.nl/>, Watanabe *et al.*, 2017). This tool can be used to annotate, prioritize, visualize and interpret GWAS results. FUMA defines lead SNPs as signals that are significantly associated with the disorder (we used $P < 1e-05$) and independent to each other at $r^2 < 0.1$. For each lead SNP, FUMA defines a “Genomic risk loci”, including all independent signals that are physically close or overlapping in a single locus. To evaluate the potential impact of the variants in the “Genomic risk loci”, we considered annotations of functional consequences for those variants based on external reference data. In particular, we explored:

- eQTL: evaluation of expression quantitative trait loci using gene expression data from GTEx v6/v7 (<http://www.gtexportal.org/home/>; Ardlie *et al.*, 2015; Aguet *et al.*, 2017) and BRAINEAC (<http://www.braineac.org/>; Ramasamy *et al.*, 2014).
- CADD v1.3: A deleterious score of variants computed by integrating 63 functional annotations. The higher the score, the more deleterious the variant (12.37 is the suggested threshold to be deleterious) (<http://cadd.gs.washington.edu/>; Kircher *et al.*, 2014).
- ANNOVAR: A variant annotation tool used to obtain functional consequences of SNPs on gene function (<http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>; Wang, Li and Hakonarson, 2010).
- RegulomeDB v1.1: A categorical score (from 1 to 7) representing regulatory functionality of SNPs based on eQTLs and chromatin marks. Score 1a means that those SNPs are most likely affecting regulatory elements and 7 means that those SNPs do not have any annotations (<http://regulomedb.org/index>; Boyle *et al.*, 2012).
- 15-core chromatin state: The chromatin state represents accessibility of genomic regions (every 200bp) with 15 categorical states predicted by ChromHMM based on 5 chromatin marks (H3K4me3, H3K4me1, H3K36me3, H3K27me3, H3K9me3) for 127 epigenomes. In this study we only used data for the 13 brain tissues available (http://egg2.wustl.edu/roadmap/web_portal/chr_state_learning.html; Ernst and Kellis, 2015; Kundaje *et al.*, 2015).

Finally we explored the GWAS-catalog e91 2018-02-06 (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>; MacArthur *et al.*, 2017), a database of reported SNP-trait associations, to see if the identified SNPs were previously associated to other traits (Table 2; Figure 2, S4-S6).

4.2 Gene-based association analysis

Gene-based association with cocaine dependence was estimated by MAGMA 1.05b (Willer *et al.*, 2010) using the summary statistics from the GWAs meta-analysis. The SNP-wise mean model was used, in which the test statistic used was the sum of $-\log(\text{SNP P-value})$ for SNPs located within the transcribed region (defined using NCBI 37.3 gene definitions). The gene P-value was calculated using a known approximation of the sampling distribution (Hou, 2005). MAGMA accounts for gene size, number of SNPs in a gene and LD between markers. When using summary statistics in estimating gene-based P-values, MAGMA corrects for LD based on estimates from reference data with similar ancestry; for this we used the 1KGP3, European ancestry samples, as the reference (Auton *et al.*, 2015). We applied no padding around genes.

A total of 18,069 genes were analysed, and HIST1H2BD gene demonstrated significant gene-wise association with cocaine dependence (surpassing 10% FDR) (Figure S7).

4.3 Gene-set association analysis: Canonical pathways, BioCarta and GO gene-sets

Gene-set analyses were performed using MAGMA 1.05b. Based on the gene-based P-values generated as described in the previous section, we analysed sets of genes in order to test for enrichment in association signals in genes belonging to specific biological pathways or processes. MAGMA applies a competitive test to analyse whether the genes of a gene set are more strongly associated with the trait than other genes, while correcting for a series of confounding effects such as gene length and size of the gene set. In our analysis only genes on autosomes were included. For gene sets we used “All Canonical Pathways” (1,329 gene sets), “Gene Ontology” (4,436 gene sets) and “BioCarta” (217 gene sets) provided from MsigDB 5.1 (Subramanian *et al.*, 2005, <https://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/>). Multiple testing corrections were performed for each gene set separately. When gene sets strongly overlap, the Bonferroni correction can be quite conservative, and for this reason we used an empirical multiple testing correction implemented in MAGMA, based on a permutation procedure.

No gene sets remained significantly associated with the disorder after correction for multiple testing (information available upon request), although the BioCarta gene set “BIOCARTA TNFR2 PATHWAY” showed a possible trend (uncorrected $P = 5.38 \text{ e-}04$, corrected $P = 0.09$), that was also the most significant associated canonical pathway

gene set. From the firsts 10 Gene Ontology gene sets, 7 were related to synapse organization, glutamatergic neurotransmission or brain functions.

5. Genetic correlation of cocaine dependence with comorbid conditions

5.1 Description of the summary statistics from comorbid conditions

We performed genetic correlation studies between cocaine dependence and previously described comorbid disorders or associated phenotypes using publicly available summary statistics (Table 1B):

- Schizophrenia (SCZ) European meta-analysis: 34,241 cases and 45,604 controls, and 1,235 parent-affected offspring trios. In total: 15,358,498 SNPs (Ripke *et al*, 2014).
- Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) European meta-analysis: 19,099 cases and 34,194 controls. In total: 8,094,095 SNPs (Demontis *et al*, 2017).
- Major depressive disorder (MDD): 59,851 cases and 113,154 controls. In total: 13,554,490 SNPs (Wray *et al*, 2018).
- Children's aggressive behavior (Child-Aggre) GWAS from EAGLE (Early Genetics and Lifecourse Epidemiology Consortium): 18,988 individuals. Prior to analysis, data from this dataset was converted from hg18 to hg19 using the liftOver tool. In total: 2,200,951 SNPs (Pappa *et al*, 2016).

All of them available from PGC website, <https://www.med.unc.edu/pgc/results-and-downloads>.

- Antisocial behavior (ASB) meta-analysis: 16,400 individuals. In total: 7,795,277 SNPs (Tielbeek *et al*, 2017). Available on BroadABC website (http://broadabc.ctglab.nl/summary_statistics).
- Risk taking (RT) from the UK BioBank: 325,821 individuals. In total: 10,894,597 SNPs. Available on <https://sites.google.com/broadinstitute.org/ukbbgwasresults/home?authuser=0>.

As a negative control we used summary statistics of vitamin D levels from the UK BioBank: 335,591 individuals. In total: 10,894,597 SNPs.

5.2 LDSC Genetic correlation

Genetic correlations (r_g) between cocaine dependence and six comorbid disorders/phenotypes (ADHD, SCZ, MDD, Child-Aggre, ASB, RT) were calculated using LDSC 1.0.0 (Bulik-Sullivan *et al*, 2015a). In this analyses we used summary statistics from all samples and pre-computed LD scores from HapMap3 SNPs, calculated on 378 phased European-ancestry individuals from the 1000Genomes Project (available on <https://github.com/bulik/ldsc>). Only results for markers present in the HapMap3 SNPs list with an imputation INFO score > 0.90 (this filter was applied only in datasets where this information was available) were included in the analysis. We selected a conservative significance threshold to control for multiple testing by applying the Bonferroni correction. As we tested genetic correlation between cocaine dependence and 7 phenotypes, significance threshold was set at $P < 7.1e-03$ ($P < 0.05/7$).

We found significant genetic correlations between cocaine dependence and SCZ ($r_g = 0.2$; $SE = 0.05$; $P = 1e-04$), ADHD ($r_g = 0.5$; $SE = 0.08$; $P = 1.6e-09$), MDD ($r_g = 0.4$; $SE = 0.08$; $P = 6.6e-07$) and RT ($r_g = 0.35$; $SE = 0.06$; $P = 9.1e-08$) but not with Child-Aggre ($r_g = 0.28$; $SE = 0.23$; $P = 0.22$) or ASB ($r_g = 0.58$; $SE = 0.28$; $P = 0.04$) (Figure 3A). No significant results were found for the negative control ($r_g=0.08$; $SE=0.15$; $P = 0.55$).

Furthermore, the genetic correlation of cocaine dependence with other traits available at LD Hub (Zheng *et al*, 2017, <http://ldsc.broadinstitute.org/ldhub/>) were evaluated. In total, 832 phenotypes were tested for genetic overlap with cocaine dependence, but we obtained valid results only for 690 and 109 demonstrated significant correlation after Bonferroni correction ($P < 7.24e-05$). Detailed information about significant genetic correlations can be found in Figure S8 (further information available upon request).

5.3 Polygenic risk scores for cocaine dependence

Polygenic Risk Scores (PRS) can be used to investigate the shared genetic etiology between cocaine dependence and comorbid phenotypes, and to test how these phenotypes can predict cocaine dependence. Using GWAS summary statistics results, the PRS on the discovery phenotype are calculated, and these are used as predictors of a target phenotype in a regression analysis. Using PRSice 2.1.0 software (Euesden, Lewis and O'Reilly, 2015, <https://github.com/choishingwan/PRSice>) we analyzed the proportion of genetic aetiology shared between cocaine dependence and comorbid psychiatric disorders (ADHD, SCZ and MDD) or associated phenotypes (RT, Child-Aggre and ASB).

In order to perform PRS analysis, the samples (1-4) used for the cocaine dependence GWAS meta-analysis were merged using PLINK v1.9 and were used as a target sample. After merging, quality control was performed and only SNPs with MAF > 0.01, SNP call rate > 0.98 and individual call rate > 0.98 were used (resulting in 5,957,307 SNPs in 2,083 cases and 4,287 controls). To assess population stratification we performed PCA using smartPCA included in Eigensoft (previously described), and 10 firsts PCs and a dummy variable indicating genotyping-study were included in the PRS analysis as covariates.

We used the summary statistics of the comorbid conditions (described above) as discovery samples. The discovery samples were clumped ($r^2 < 0.1$ in a 250-kb window) to remove SNPs in LD. Both variants with an imputation INFO score < 0.9 and ambiguous strand variants were removed from the analysis. Then, PRSs were estimated for each discovery sample using a wide range of meta-analysis p-value thresholds (P_T) between $P_T = 1e-04$ and $P_T = 1$ at increments of $5e-05$. Summing over the markers abiding by the p-value threshold in the discovery set and weighting by the additive scale effect measure of the marker ($\log(OR)$ or β). For each P_T , the proportion of variance explained (R^2) by each discovery sample was computed by comparing the full model (PRS + covariates (10 PCs and study)) score to a reduced model (covariates only). The reported R^2 value is the difference between R^2 from the two models. For quantitative traits we performed linear regression analysis, and for qualitative traits we performed traits logistic regression and *Nagelkerke's pseudo- R^2* values are shown.

We selected a conservative significance threshold to control for multiple testing by applying a Bonferroni correction. Euesden *et al.* recommend using a significance threshold of at least $P = 0.004$ in order to control for the high-resolution scoring approach of selecting the most predictive PRS (Euesden *et al.*, 2015). As we tested the most predictive PRS across each of the 7 discovery phenotypes, we divided the P-value by the number of tests performed ($P = 0.004/7$), which resulted in a significance threshold of $P < 5.7e-04$.

For all discovery samples, PRS significantly predict cocaine dependence: SCZ (pseudo- $R^2 = 2.28\%$, $P_T = 0.4911$, $P = 1.21e-26$), ADHD (pseudo- $R^2 = 1.39\%$, $P_T = 0.04275$, $P = 4.5e-17$), ASB ($R^2 = 1.33\%$, $P_T = 0.4055$, $P = 2.2e-16$), MDD (pseudo- $R^2 = 1.21\%$, $P_T = 0.0129$, $P = 4.35e-15$), RT ($R^2 = 0.60\%$, $P_T = 0.00135$, $P = 2.7e-08$) and Child-Aggre ($R^2 = 0.3\%$, $P_T = 0.3552$, $P = 8.8e-05$). No significant results were found for the negative control ($R^2 = 0.07\%$, $P_T = 0.03075$, $P = 0.06$) (Figure 3B, S9 and S10).

5.4 Gene-based meta-analysis with comorbid conditions

In order to identify new genes associated with comorbid disorders, gene-based meta-analysis between different traits was performed using MAGMA 1.05b. First, gene-based analysis for each independent dataset was performed as previously described. Then, the weighted Stouffer's Z method was used to combine the Z-scores for each gene across cohorts, with weights set to the square root of the sample size. We performed six independent gene-based meta-analyses with cocaine dependence using summary statistics of six phenotypes that had previously been reported to be comorbid with cocaine dependence: ADHD (Table S1), SCZ, MDD, Child-Aggre, ASB and RT.

References

Aguet F, Brown AA, Castel SE, Davis JR, He Y, Jo B, et al (2017). Genetic effects on gene expression across human tissues. *Nature* 550: 204–213.

- Ardlie KG, DeLuca DS, Segrè A V., Sullivan TJ, Young TR, Gelfand ET, et al (2015). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science* (80-) 348: 648–660.
- Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature* 526: 68–74.
- Bierut LJ, Agrawal A, Bucholz KK, Doheny KF, Laurie C, Pugh E, et al (2010). A genome-wide association study of alcohol dependence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5082–7.
- Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, et al (2012). Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res* 22: 1790–1797.
- Bulik-Sullivan B, Finucane HK, Anttila V, Gusev A, Day FR, Loh PR, et al (2015a). An atlas of genetic correlations across human diseases and traits. *Nat Genet* 47: 1236–1241.
- Bulik-Sullivan BK, Loh P-R, Finucane HK, Ripke S, Yang J, Patterson N, et al (2015b). LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies. *Nat Genet* 47: 291–295.
- Compton WM, Thomas YF, Stinson FS, Grant BF (2007). Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV drug abuse and dependence in the United States: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions. *Arch Gen Psychiatry* 64: 566–576.
- Das S, Forer L, Schönherr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, et al (2016). Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet* 48: 1284–1287.
- Delaneau O, Marchini J, Zagury JF (2012). A linear complexity phasing method for thousands of genomes. *Nat Methods* 9: 179–181.
- Demontis D, Walters RK, Martin J, Mattheisen M, Als TD, Agerbo E, et al (2017). Discovery Of The First Genome-Wide Significant Risk Loci For ADHD. *bioRxiv* 145581.
- Ernst J, Kellis M (2015). Large-scale imputation of epigenomic datasets for systematic annotation of diverse human tissues. *Nat Biotechnol* 33: 364–376.
- Euesden J, Lewis CM, O’Reilly PF (2015). PRSice: Polygenic Risk Score software. *Bioinformatics* 31: 1466–1468.
- Finucane HK, Bulik-Sullivan B, Gusev A, Trynka G, Reshef Y, Loh P-R, et al (2015). Partitioning heritability by functional annotation using genome-wide association summary statistics. *Nat Genet* 47: 1228–1235.
- Hou CD (2005). A simple approximation for the distribution of the weighted combination of non-independent or independent probabilities. *Stat Probab Lett* 73: 179–187.
- Howe FS, Fischl H, Murray SC, Mellor J (2017). Is H3K4me3 instructive for transcription activation? *BioEssays* 39: 1–12.
- Iperen EPA Van, Hovingh GK, Asselbergs FW, Zwinderman AH (2017). Extending the use of GWAS data by combining data from different genetic platforms. *PLoS One* 12: e0172082.
- Kircher M, Witten DM, Jain P, O’roak BJ, Cooper GM, Shendure J (2014). A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet* 46: 310–315.
- Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, Heravi-Moussavi A, et al (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518: 317–330.
- MacArthur J, Bowler E, Cerezo M, Gil L, Hall P, Hastings E, et al (2017). The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog). *Nucleic Acids Res* 45: D896–D901.
- Mitchell BD, Fornage M, McArdle PF, Cheng YC, Pulit SL, Wong Q, et al (2014). Using previously genotyped controls in genome-wide association studies (GWAS): Application to the Stroke Genetics Network (SiGN). *Front Genet* 5: 95.
- Pappa I, St Pourcain B, Benke K, Cavadino A, Hakulinen C, Nivard MG, et al (2016). A genome-wide approach to children’s aggressive behavior: The EAGLE consortium. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 171: 562–572.
- Patterson N, Price AL, Reich D (2006). Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet* 2: 2074–2093.
- Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D (2006). Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* 38: 904–909.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, et al (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81: 559–75.

- Ramasamy A, Trabzuni D, Guelfi S, Varghese V, Smith C, Walker R, et al (2014). Genetic variability in the regulation of gene expression in ten regions of the human brain. *Nat Neurosci* 17: 1418–1428.
- Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh KH, Holmans PA, et al (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511: 421–427.
- Roadmap Epigenomics Consortium A, Kundaje A, Meuleman W, Ernst J, Bilenky M, Yen A, et al (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* 518: 317–30.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci* 102: 15545–15550.
- Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J, et al (2015). An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature* 526: 75–81.
- Tielbeek JJ, Johansson A, Polderman TJC, Rautiainen M-R, Jansen P, Taylor M, et al (2017). Genome-Wide Association Studies of a Broad Spectrum of Antisocial Behavior. *JAMA Psychiatry*
- Trynka G, Sandor C, Han B, Xu H, Stranger BE, Liu XS, et al (2013). Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. *Nat Genet* 45: 124–130.
- Turner SD (Cold Spring Harbor Laboratory: 2014). qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *bioRxiv*
- Uh HW, Deelen J, Beekman M, Helmer Q, Rivadeneira F, Hottenga JJ, et al (2012). How to deal with the early GWAS data when imputing and combining different arrays is necessary. *Eur J Hum Genet* 20: 572–576.
- Wang K, Li M, Hakonarson H (2010). ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38: e164–e164.
- Watanabe K, Taskesen E, Bochoven A Van, Posthuma D (2017). Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nat Commun* 8: 1826.
- Willer CJ, Li Y, Abecasis GR (2010). METAL: Fast and efficient meta-analysis of genomewide association scans. *Bioinformatics* 26: 2190–2191.
- Woo H, Ha SD, Lee SB, Buratowski S, Kim TS (2017). Modulation of gene expression dynamics by co-Transcriptional histone methylations. *Exp Mol Med* 49: e326–e326.
- Wray NR, Ripke S, Mattheisen M, Trzaskowski M, Byrne EM, Abdellaoui A, et al (2018). Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression. *Nat Genet* 167577
- Zheng J, Erzurumluoglu AM, Elsworth BL, Kemp JP, Howe L, Haycock PC, et al (2017). LD Hub: A centralized database and web interface to perform LD score regression that maximizes the potential of summary level GWAS data for SNP heritability and genetic correlation analysis. *Bioinformatics* 33: 272–279.
- Zuvich RL, Armstrong LL, Bielinski SJ, Bradford Y, Carlson CS, Crawford DC, et al (2011). Pitfalls of merging GWAS data: Lessons learned in the eMERGE network and quality control procedures to maintain high data quality. *Genet Epidemiol* 35: 887–898.

SUPPLEMENTARY FIGURES

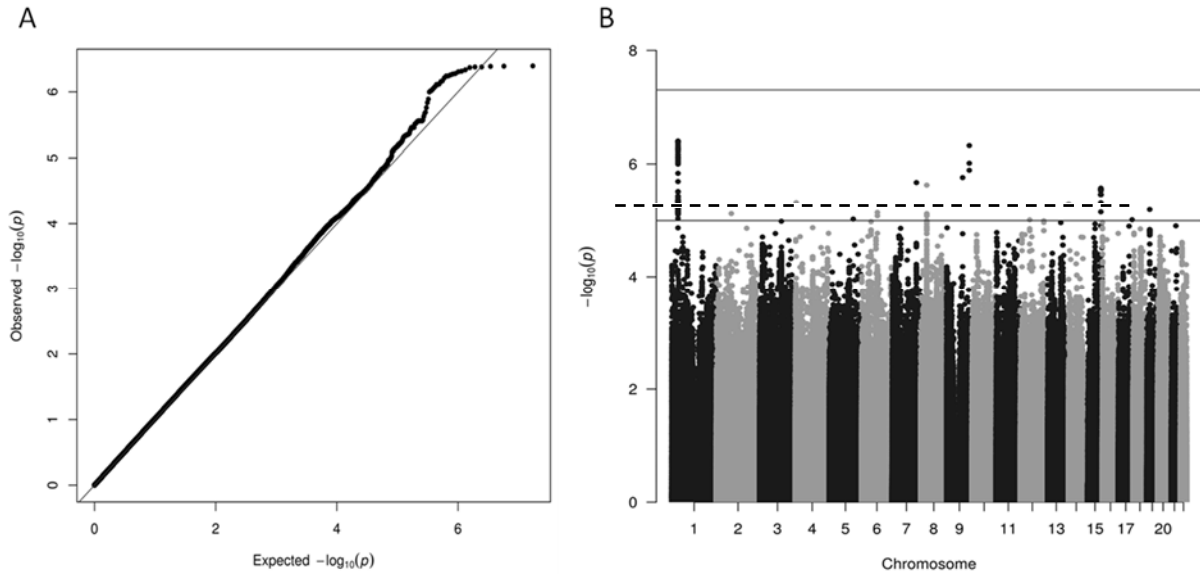


Figure S1. GWAS meta-analysis results. A) Q-Q plot and B) Manhattan plot obtained for the heterogeneity test between samples in the cocaine dependence GWAS meta-analysis. Continuous line: threshold for genome-wide significance ($P < 5e-08$). Discontinuous line: threshold for suggestive associations ($P < 1e-05$).

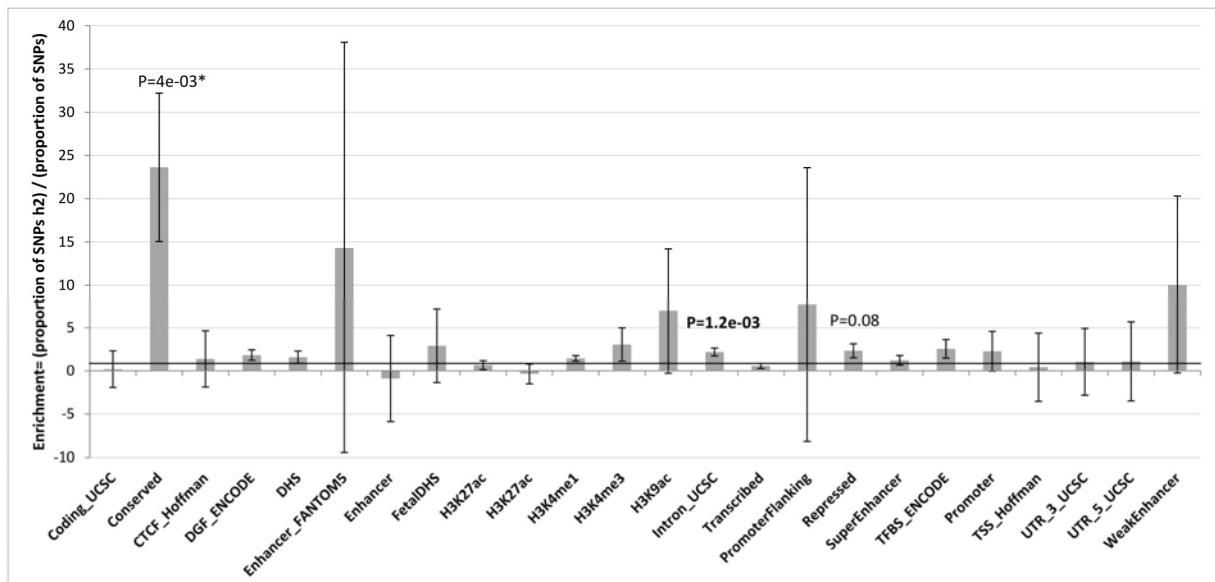


Figure S2. Partitioning of h^2 by functional annotations. Enrichment by 24 functional annotations defined by Finucane et al. (2015) Error bars represent 95% confidence intervals. P-values for annotation categories with nominal significant enrichment are shown and * indicates significance after Bonferroni correction ($P < 2e-03$). The vertical black line indicates no enrichment.

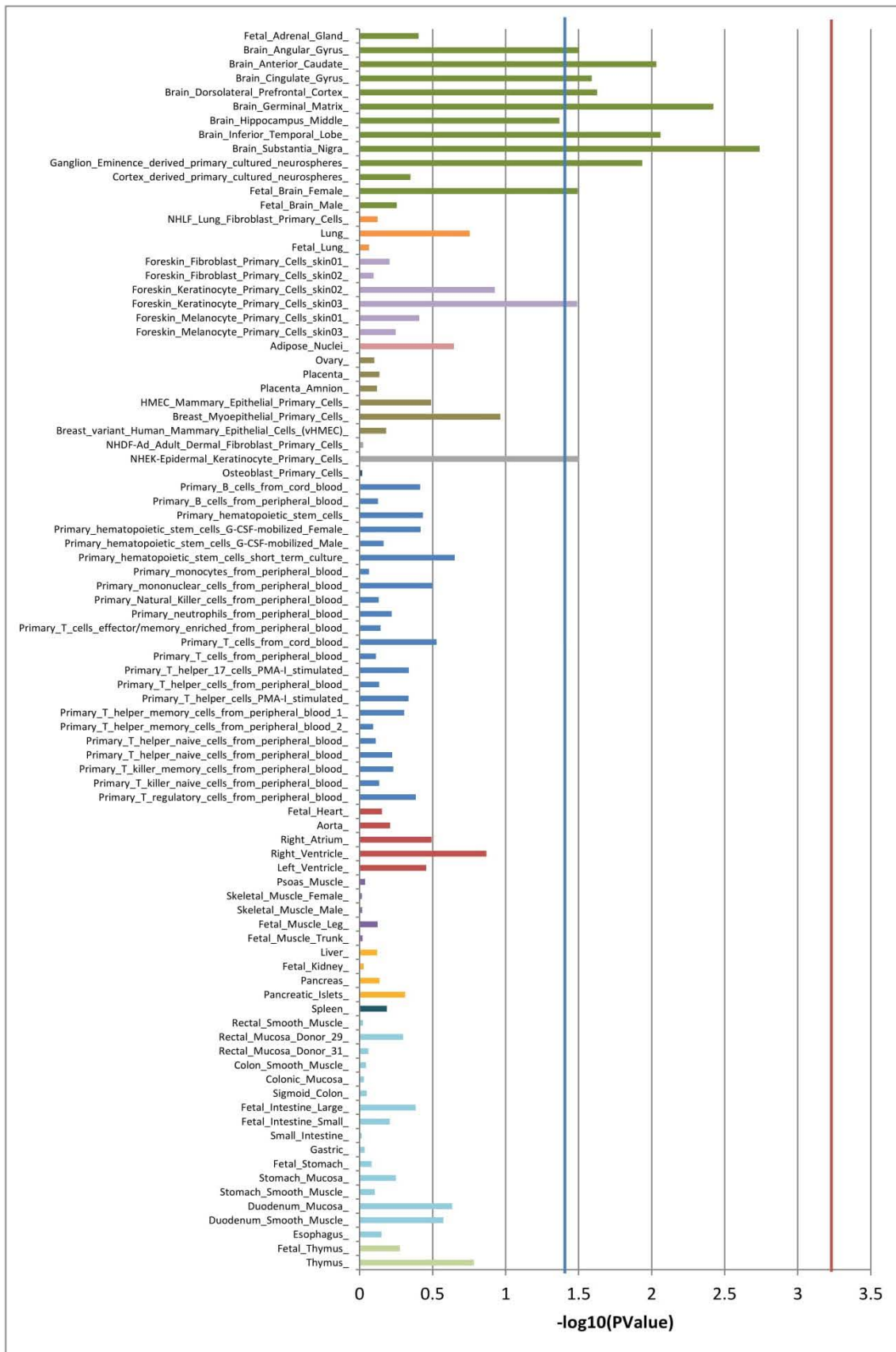


Figure S3. Partitioning of h2 by tissue-specific H3K4me3 annotations. P-values for enrichment in the SNP heritability of cocaine dependence by variants located within regulatory regions (H3K4me3 peaks) of various cells and tissues (annotations from the Roadmap Epigenomics Mapping Consortium). Blue line: threshold for nominal significance. Red line: threshold for significance after Bonferroni correction ($P < 5.6 \times 10^{-4}$).

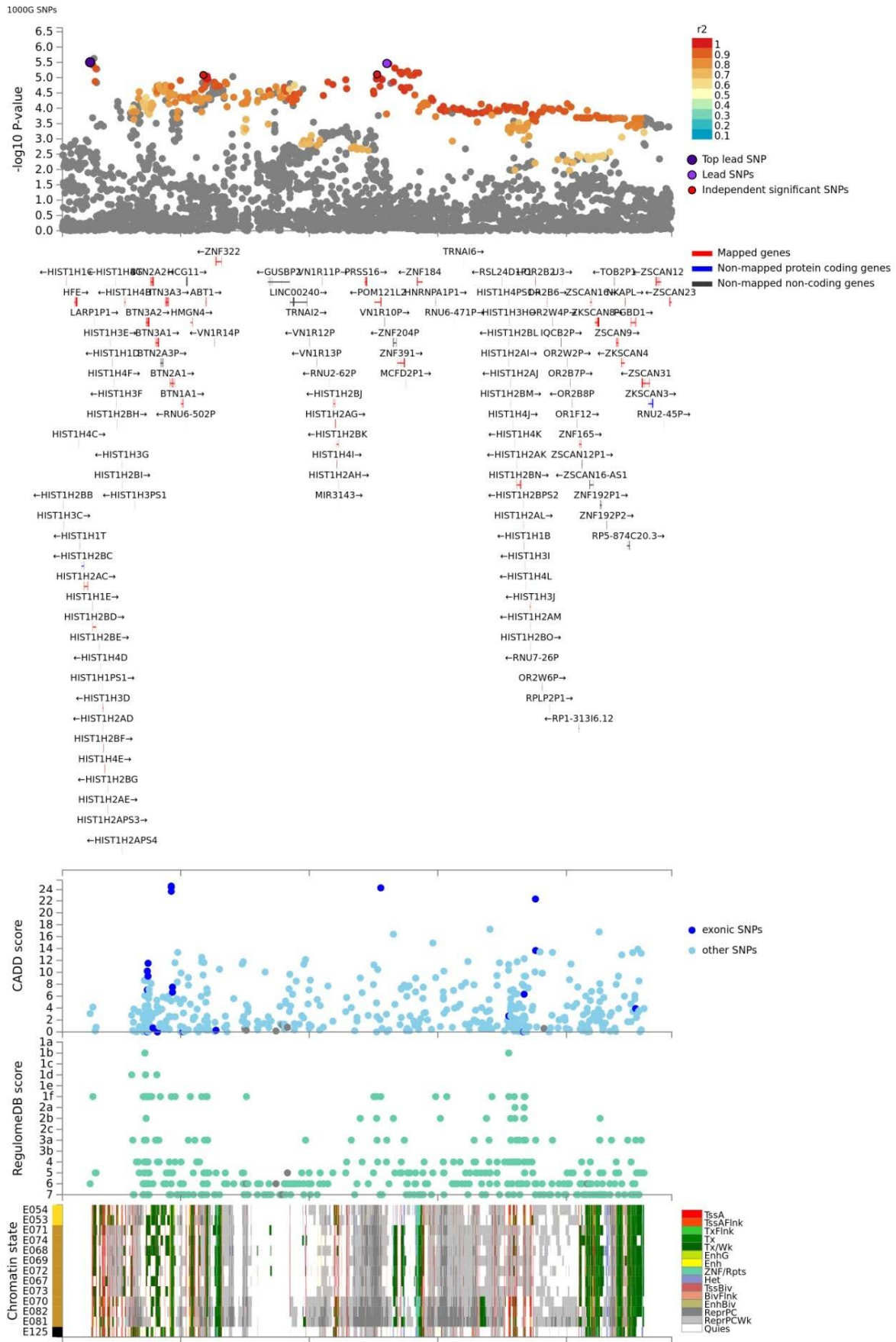




Figure S4. Regional plot with genes and functional annotations of genomic risk loci on Chr6 by FUMA. Genes prioritized by FUMA are highlighted in red. From the top, GWAS P-value (SNPs are colored based on r^2), CADD score (coding SNPs and other SNPs are colored blue and light blue, respectively), RegulomeDB score, 15-core chromatin state in the brain, eQTL P-value and chromatin interactions. eQTLs are plotted per gene and colored based on tissue type.

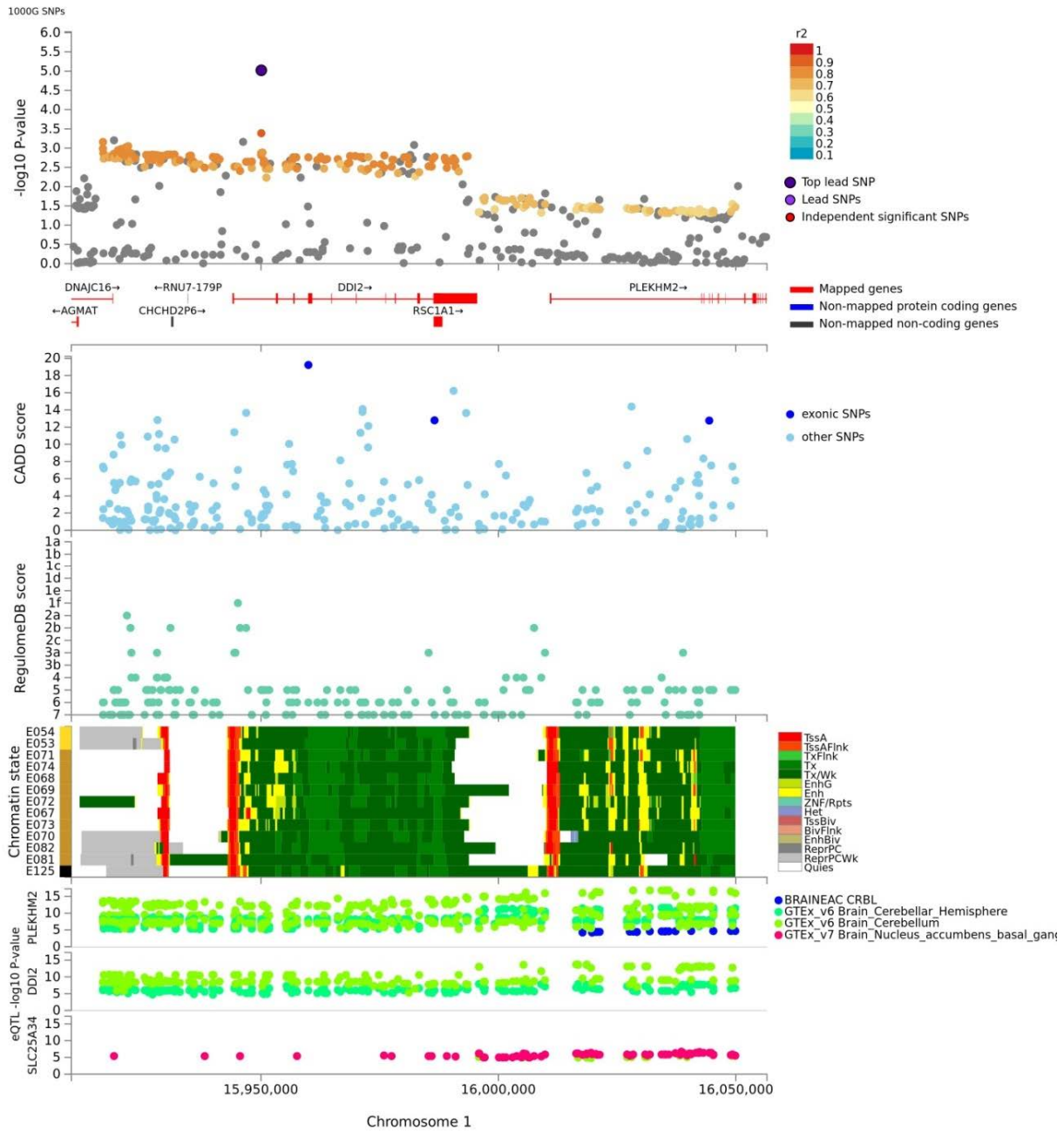


Figure S5. Regional plot with genes and functional annotations of genomic risk loci on Chr1 by FUMA. Genes prioritized by FUMA are highlighted in red. From the top, GWAS P-value (SNPs are colored based on r^2), CADD score (coding SNPs and other SNPs are colored blue and light blue, respectively), RegulomeDB score, 15-core chromatin state in the brain and eQTL P-value. Tissue/cell 19 types of epigenome ID are the following; E054: Ganglion eminence derived primary cultured neurospheres, E053: Cortex derived primary cultured neurospheres, E071: Hippocampus middle, E074: Substantia nigra, E068: Anterior caudate, E069: Cingulate gyrus, E072: Inferior temporal lobe, E067: Angular gyrus, E073: Dorsolateral prefrontal cortex, E070: Germinal matrix, E082: Fetal brain female, E081: Fetal brain male and E125: NH-A Astrocytes primary cells. eQTLs are plotted per gene and colored based on tissue type.

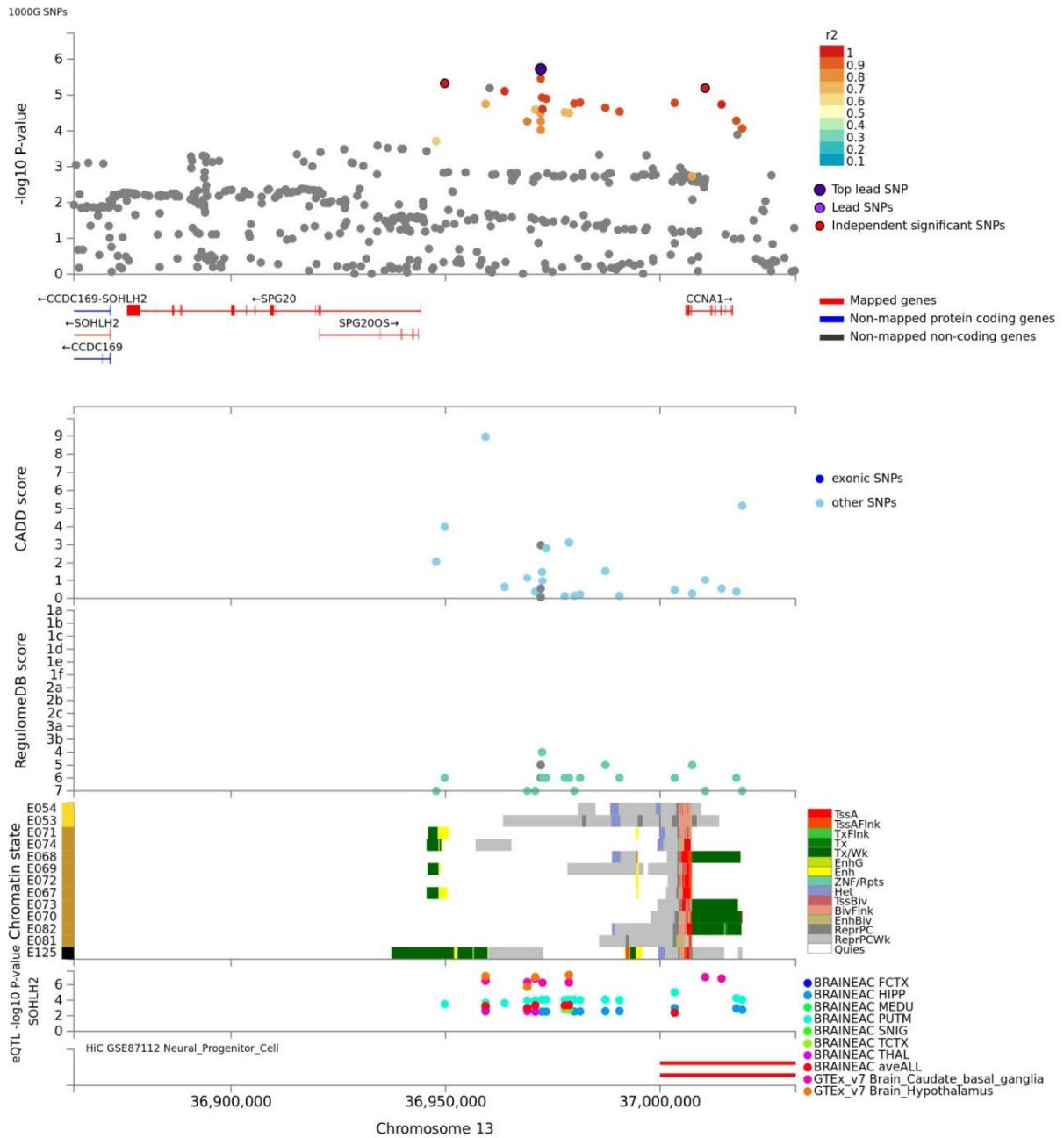


Figure S6. Regional plot with genes and functional annotations of genomic risk loci on Chr13 by FUMA. Genes prioritized by FUMA are highlighted in red. From the top, GWAS P-value (SNPs are colored based on r^2), CADD score (coding SNPs and other SNPs are colored blue and light blue, respectively), RegulomeDB score, 15-core chromatin state in the brain, eQTL P-value and chromatin interactions. Tissue/cell 19 types of epigenome ID are the following; E054: Ganglion eminence derived primary cultured neurospheres, E053: Cortex derived primary cultured neurospheres, E071: Hippocampus middle, E074: Substantia nigra, E068: Anterior caudate, E069: Cingulate gyrus, E072: Inferior temporal lobe, E067: Angular gyrus, E073: Dorsolateral prefrontal cortex, E070: Germinal matrix, E082: Fetal brain female, E081: Fetal brain male and E125: NH-A Astrocytes primary cells. eQTLs are plotted per gene and colored based on tissue type.

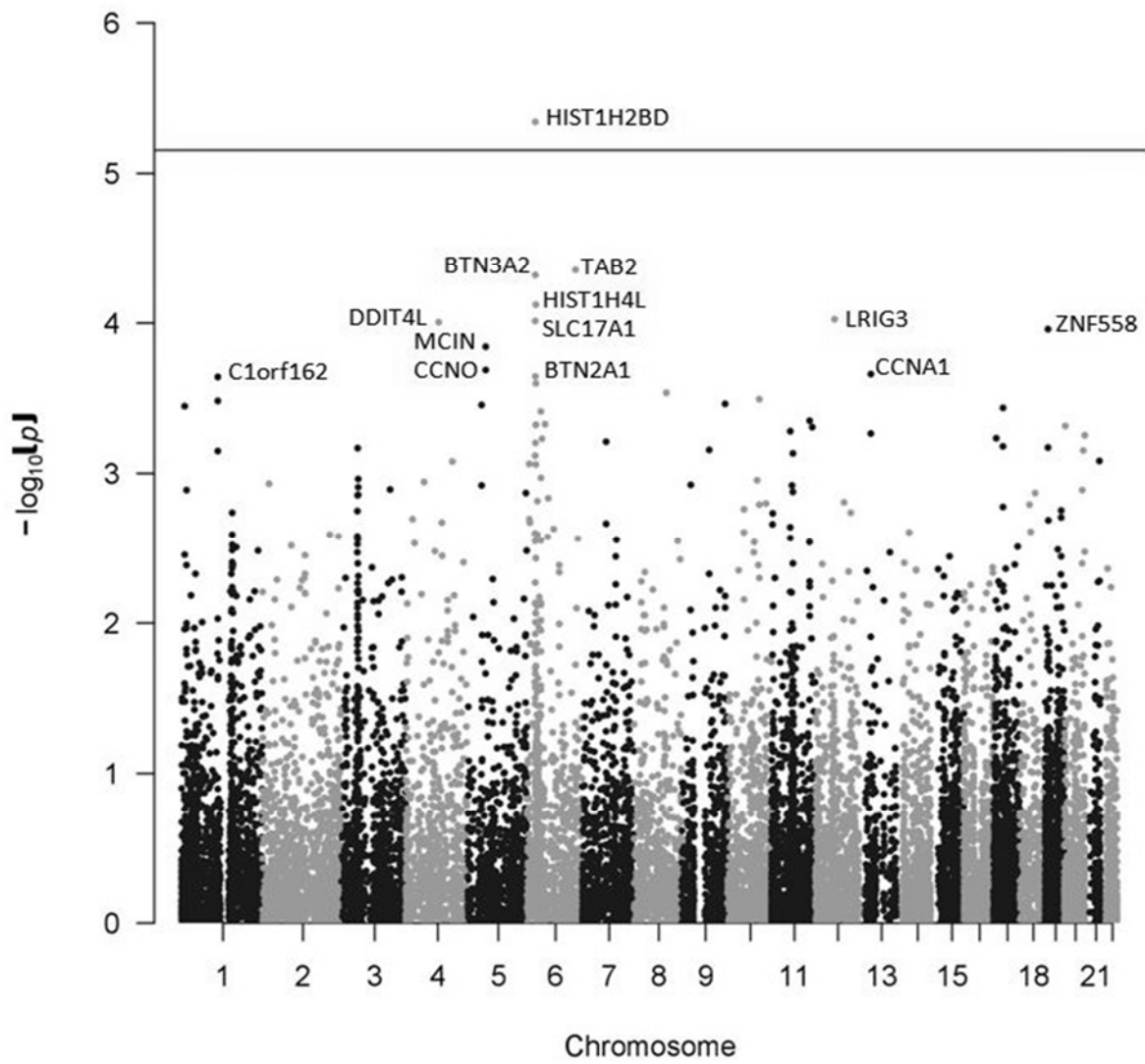


Figure S7. Manhattan plot of gene-based p-values in the cocaine dependence meta-analysis. Line: threshold for 10% FDR significance.

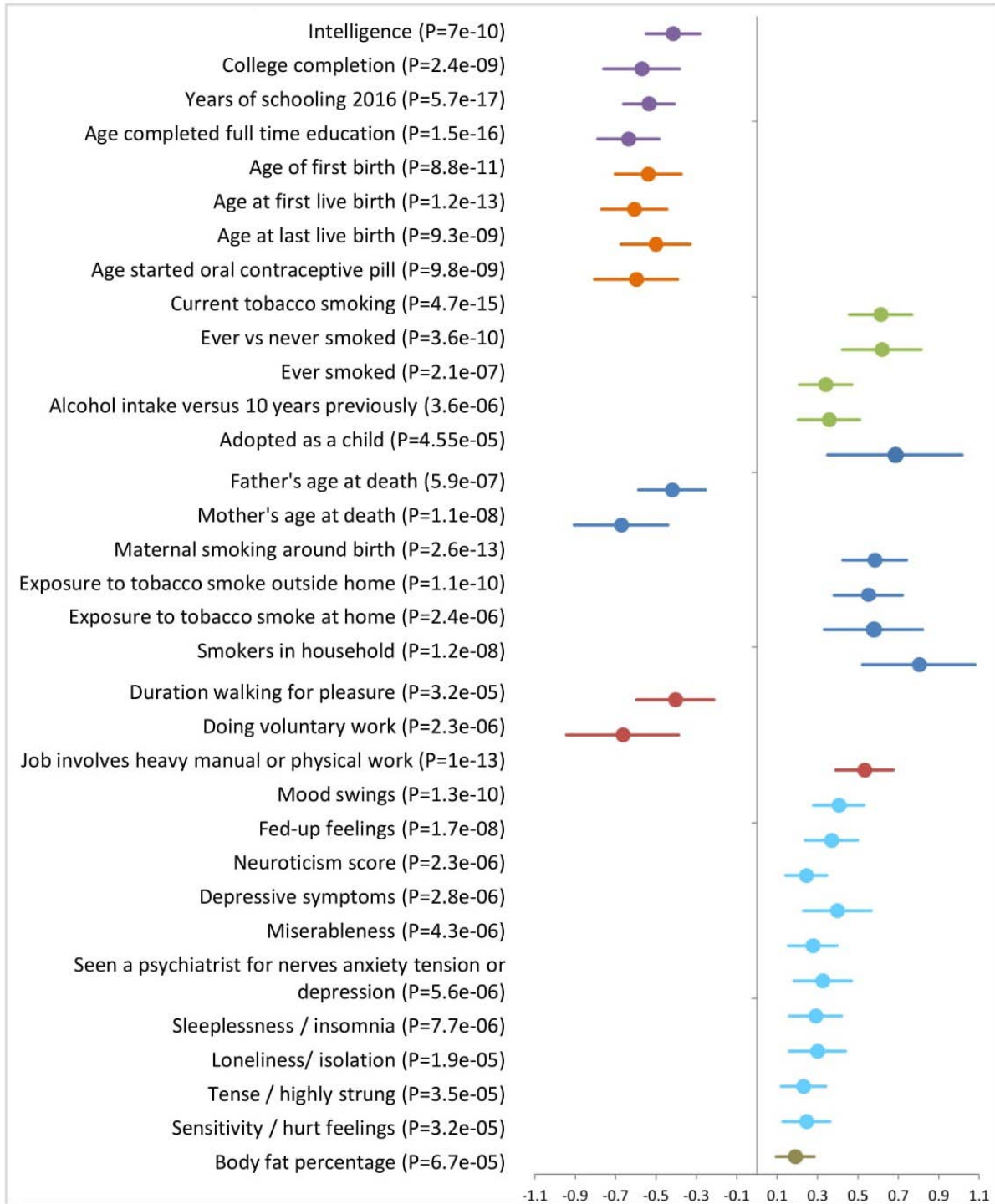


Figure S8 Genetic correlation of cocaine dependence with other traits from LDhub. Significant genetic correlations between cocaine dependence and other traits after Bonferroni correction for testing a total of 690 traits available at LDhub. The most interesting results are shown here; see table S5 for the full output of this analysis. Groups defined by colours, from the top: In purple, educational achievements; in orange, reproductive traits; in green, alcohol and tobacco exposure; in dark blue, familiar situation; in red, exercise; in light blue, psychiatric traits; in brown, physical condition. Error bars indicate 95% confidence limits. The significance threshold was set at $P < 7.24 \times 10^{-5}$.

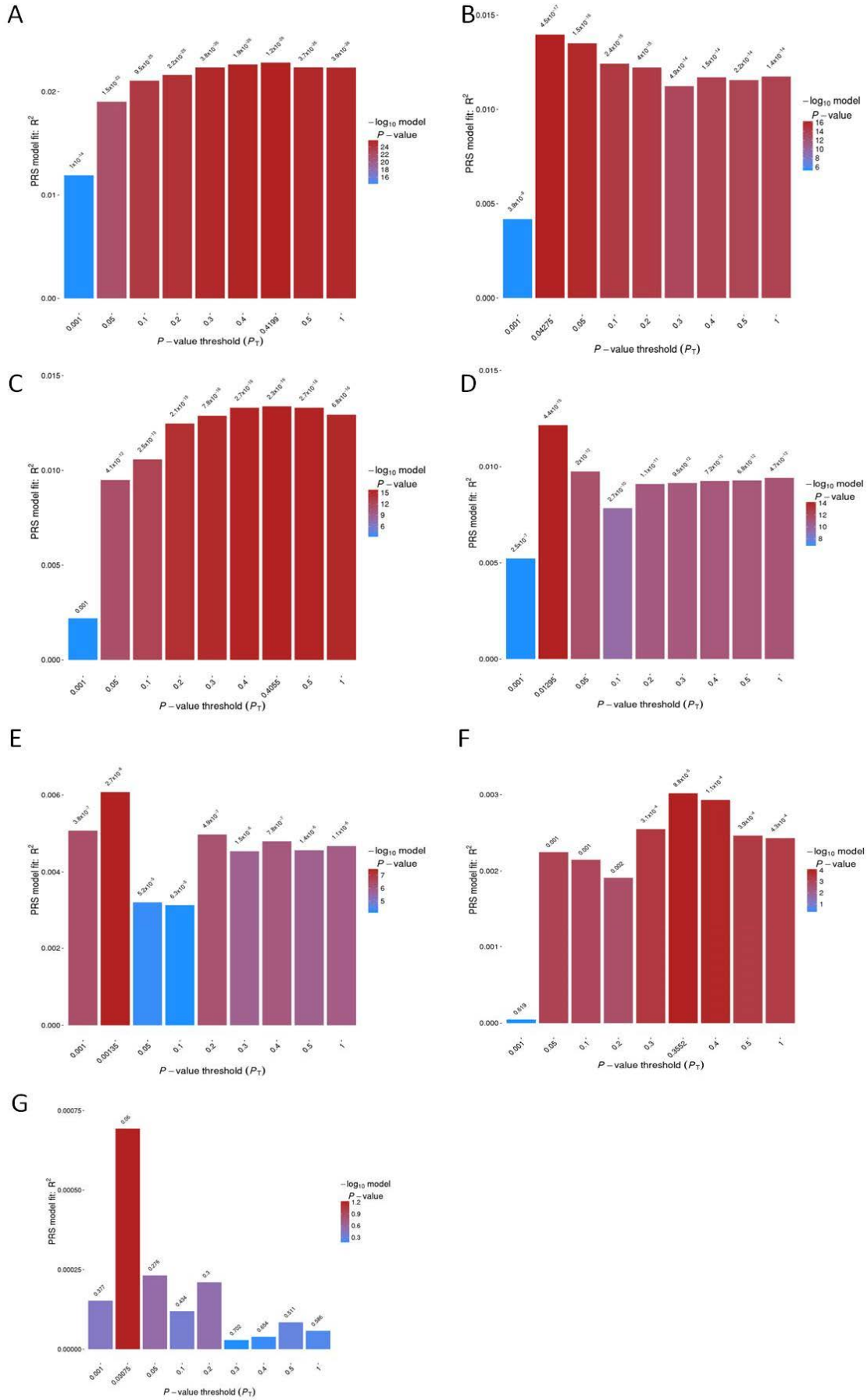


Figure S9. PRS results from the 7 tested phenotypes. A) Schizophrenia, B) Attention deficit/hyperactivity disorder, C) Antisocial behavior, D) Major depressive disorder, E) Risk taking behavior, F) Children's aggressive behavior and G) Negative control (Vitamin D levels). P-value threshold (P_T) represents the P-value at the cut-off for inclusion of SNPs in the polygenic risk score. Values on top of the bars represent P-values for the regression models. The significance threshold was set at $P < 5.7e-04$.

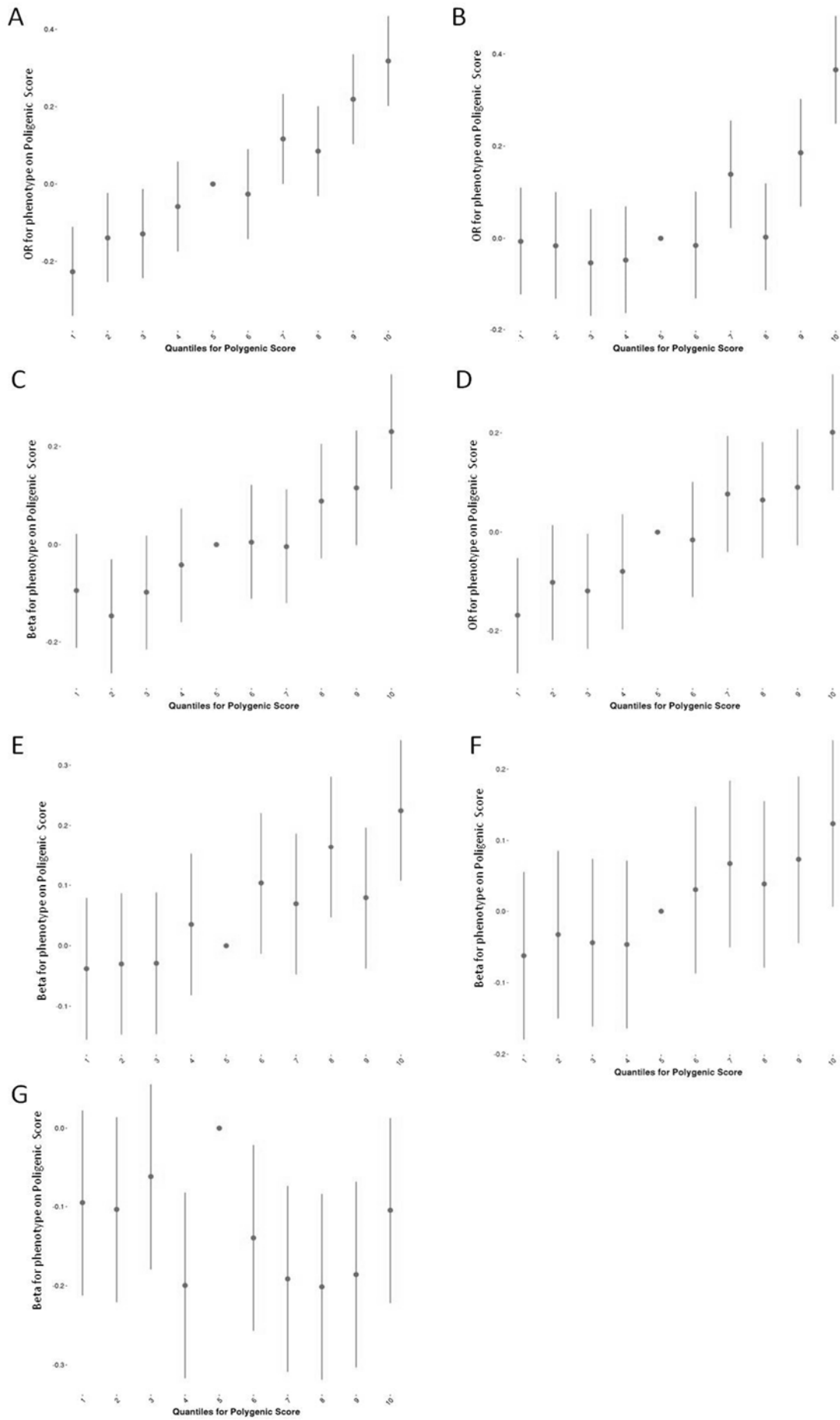


Figure S10. Deciles of polygenic risk scores plotted against effects on phenotypes. A) Schizophrenia, B) Attention deficit/hyperactivity disorder, C) Antisocial behavior, D) Major depression disorder, E) Risk taking behavior, F) Children’s aggressive behavior and G) Negative control (Vitamin D levels). A regression is performed with phenotype as outcome and each 5% quantile separately, whereby the effect size of each quantile is compared to the central quantile as a reference, such that each polygenic score in the quantile in question is coded 1 and each polygenic score in the reference quantile is coded 0. In each regression, the covariates used in the main analyses are included. OR, odds ratio. Error bars indicate 95% confidence limits.

Table S1. Combined gene-based meta-analysis between cocaine dependence and ADHD.

Gene symbol	EntrezID	Coordinates*	NSNPs	N	Combined P ^{&}	P ADHD	P COCA
<i>ST3GAL3</i>	6487	1:44173204-44396837	518	59056	3.36E-12	5.8E-12	0.0840
<i>KDM4A</i>	9682	1:44115797-44171189	74	59115	8.97E-11	3.6E-11	0.2531
<i>PTPRF</i>	5792	1:43991708-44089343	240	59077	1.64E-09	5.4E-10	0.3185
<i>TIE1</i>	7075	1:43766566-43788781	32	58177	1.85E-09	2.0E-08	0.0151
<i>CDH8</i>	1006	16:61681169-62070939	835	59057	2.77E-09	1.1E-08	0.0493
<i>SEMA6D</i>	80031	15:47476403-48066420	1540	59060	3.16E-09	3.8E-10	0.5114
<i>MPL</i>	4352	1:43803475-43820135	13	59604	1.75E-08	4.7E-08	0.0743
<i>MANBA</i>	4126	4:103552643-103682151	216	58893	1.76E-08	6.8E-08	0.0517
<i>SORCS3</i>	22986	10:106400859-107024993	1864	59340	2.15E-08	5.2E-09	0.4186
<i>SZT2</i>	23334	1:43855556-43919918	88	58521	2.91E-08	1.2E-08	0.3113
<i>CDC20</i>	991	1:43824626-43828874	6	57440	3.66E-08	6.3E-08	0.1149
<i>MEF2C</i>	4208	5:88014058-88199922	344	58906	5.17E-08	7.8E-08	0.1331
<i>DUSP6</i>	1848	12:89741837-89746296	21	59291	7.24E-08	2.2E-09	0.8062
<i>SLC6A9</i>	6536	1:44462155-44497171	64	55667	2.21E-07	9.4E-07	0.0469
<i>PIDD1</i>	55367	11:799179-809872	31	55077	3.69E-07	5.3E-07	0.1463
AMIGO3	386724	3:49754267-49757238	1	59670	4.03E-07	1.9E-05	6.7E-04
<i>ELOVL1</i>	64834	1:43829068-43833745	4	51706	4.24E-07	1.2E-06	0.0723
<i>CCDC24</i>	149473	1:44457280-44462200	8	58973	5.13E-07	2.1E-06	0.0492
BSN	8927	3:49591922-49708982	162	59054	5.42E-07	1.8E-05	1.3E-03
<i>HYI</i>	81888	1:43916674-43919938	6	56506	8.81E-07	3.2E-07	0.4093
<i>FOXP2</i>	93986	7:113726365-114333827	914	58176	2.80E-06	1.2E-06	0.3964

*Gene coordinates based on GRCh37/hg19. NSNPs: Number of SNPs per gen. N: number of individuals included in the analysis. & Combined p-value obtained in the gene-based meta-analysis. In bold, new genes identified.

CAPÍTOL 4: EFECTE DE LA COCAÏNA SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA: ESTUDIS EN MODELS NEURONALS EN CULTIU I MOSTRES DE CERVELL *POST-MORTEM* HUMANES.

Article 5:

“Un estudi transcricional i genètic identifica el gen *NFAT5* com un candidat per la dependència de cocaïna”.

Resum:

El sistema de neurotransmissió dopaminèrgica és l'encarregat de produir els efectes de recompensa de la cocaïna. En aquest estudi hem avaluat els canvis en l'expressió gènica induïts per l'exposició aguda a la cocaïna de cèl·lules SH-SY5Y diferenciades, que s'utilitzen com un model neuronal dopaminèrgic. Hem observat canvis en l'expressió gènica i increments en l'activitat neuronal després d'una exposició a cocaïna 5µM, però no a una concentració d'1µM. En relació als canvis d'expressió gènica, hem identificat un total de 756 gens, majoritàriament relacionats amb la regulació de la transcripció i l'expressió gènica, cicle cel·lular, adhesió i projeccions cel·lulars, així com també les vies de senyalització de la proteïna cinasa activada per mitogen (MAPK), CREB, neurotrofina i neuregulina. A continuació hem prioritzat funcionalment els gens per seleccionar SNPs que podrien tenir efecte funcional, i hem realitzat un estudi d'associació cas-control en un mostra de 806 pacients dependents de cocaïna i 817 controls. Hem detectat associació significativa entre la dependència de cocaïna i cinc SNPs situats a 3'UTR del gen *NFAT5*, tot i que només les variants rs1437134 i rs7359336 superaven correccions de Bonferroni per tests múltiples. Tots ells alterarien llocs d'unió de miRNAs segons prediccions bioinformàtiques. Mitjançant un assaig amb el gen reporter luciferasa hem pogut confirmar l'efecte funcional de la variant rs1437134, tot observant una disminució de l'expressió en presència de l'al·lel rs1437134G, que és més pronunciada en presència del hsa-miR-509. No obstant això, no hem observat correlació entre les variants del gen *NFAT5* i el volum de regions cerebrals rellevants en l'establiment de l'addicció, anàlisi que hem realitzat a partir d'imatges de ressonància magnètica nuclear. Aquests resultats suggereixen que el gen *NFAT5*, l'expressió del qual augmenta a les poques hores de l'exposició a cocaïna, podria estar implicat en la predisposició genètica a la dependència de cocaïna.

Referència:

Noèlia Fernández-Castillo, Judit Cabana-Domínguez, Jordi Soriano, Cristina Sánchez-Mora, Carlos Roncero, Lara Grau-López, Elena Ros-Cucurull, Constanza Daigre, Marjolein M.J. van Donkelaar, Barbara Franke, Miguel Casas, Marta Ribasés, Bru Cormand. *Transcriptomic and genetic studies*

identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence. Translational Psychiatry 2015; 5,e667.
doi:10.1038/tp.2015.158

ORIGINAL ARTICLE

Transcriptomic and genetic studies identify *NFAT5* as a candidate gene for cocaine dependence

N Fernández-Castillo^{1,2,3}, J Cabana-Domínguez^{1,2}, J Soriano⁴, C Sánchez-Mora^{5,6,7}, C Roncero^{5,7,8,9}, L Grau-López^{5,7,8,9}, E Ros-Cucurull^{5,8,9}, C Daigre^{5,7,8,9}, MMJ van Donkelaar^{10,11}, B Franke^{10,11,12}, M Casas^{5,7,8,9}, M Ribasés^{5,6,7,13} and B Cormand^{1,2,3,13}

Cocaine reward and reinforcing effects are mediated mainly by dopaminergic neurotransmission. In this study, we aimed at evaluating gene expression changes induced by acute cocaine exposure on SH-SY5Y-differentiated cells, which have been widely used as a dopaminergic neuronal model. Expression changes and a concomitant increase in neuronal activity were observed after a 5 μ m cocaine exposure, whereas no changes in gene expression or in neuronal activity took place at 1 μ m cocaine. Changes in gene expression were identified in a total of 756 genes, mainly related to regulation of transcription and gene expression, cell cycle, adhesion and cell projection, as well as mitogen-activated protein kinase (MAPK), CREB, neurotrophin and neuregulin signaling pathways. Some genes displaying altered expression were subsequently targeted with predicted functional single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in a case-control association study in a sample of 806 cocaine-dependent patients and 817 controls. This study highlighted associations between cocaine dependence and five SNPs predicted to alter microRNA binding at the 3'-untranslated region of the *NFAT5* gene. The association of SNP rs1437134 with cocaine dependence survived the Bonferroni correction for multiple testing. A functional effect was confirmed for this variant by a luciferase reporter assay, with lower expression observed for the rs1437134G allele, which was more pronounced in the presence of hsa-miR-509. However, brain volumes in regions of relevance to addiction, as assessed with magnetic resonance imaging, did not correlate with *NFAT5* variation. These results suggest that the *NFAT5* gene, which is upregulated a few hours after cocaine exposure, may be involved in the genetic predisposition to cocaine dependence.

Translational Psychiatry (2015) 5, e667; doi:10.1038/tp.2015.158; published online 27 October 2015

INTRODUCTION

Cocaine is a psychostimulant drug of abuse and its use has become a public health problem worldwide. Cocaine's pleasurable and addictive effects are thought to be mediated mainly through dopamine (DA), which is a key neurotransmitter in reward pathways.¹ Cocaine binds the DA transporter producing an increase in DA concentration at the synapses and thus stimulating neurons in brain regions involved in reward and reinforcement behavior.^{1–3}

Cocaine's chronic and acute effects on gene expression have been studied using a broad range of animal models and experimental paradigms and procedures, including human post-mortem samples.^{4,5} These studies have identified gene expression changes in the brain related to diverse functional categories including synaptic communication and neuroplasticity, receptors, ion channels and transporters, cytoskeleton, extracellular matrix, oligodendrocytes and myelin, mitochondrial function, apoptosis and cell death, transcription factors and signal transduction. Moreover, two important pathways have been found affected by changes in gene expression: the mitogen-activated protein kinase

(MAPK) and the synaptic long-term potentiation signal transduction pathways.^{4,5}

The repeated use of cocaine induces molecular and cellular adaptations in the central nervous system, such as synaptic changes and neuronal remodeling, and as the consumption becomes chronic those adaptations become stable.⁶ Individual's genetic background and environment determine the initial sensitivity to first drug exposure and how individual nerve cells and circuits adapt to chronic drug exposure, which could establish the development of addiction in some individuals but not others.⁷ Around 15–16% of cocaine users develop dependence, and heritability for cocaine addiction has been estimated around 60–70%.^{8–10} Some of those genetic factors may lie in genes that mediate acute and chronic cocaine's effects, conferring initial vulnerability to the establishment of drug-induced adaptations.

Compared with other drugs of abuse, relatively few association studies have been performed on cocaine dependence, and little is known about the genetic susceptibility to this psychiatric disorder.¹¹ Some association studies have focused on candidate genes, especially on DA-related genes, the majority failing to detect associations or showing controversial results. Only

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain; ³Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain; ⁴Departament d'Estructura i Constituents de la Matèria, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁵Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; ⁶Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ⁷Biomedical Network Research Center on Mental Health (CIBERSAM), Barcelona, Spain; ⁸Addiction and Dual Diagnosis Unit, Psychiatric Service, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Agència de Salut Pública, Barcelona, Spain; ⁹Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ¹⁰Department of Human Genetics, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands; ¹¹Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University, Nijmegen, The Netherlands and ¹²Department of Psychiatry, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands. Correspondence: Dr N Fernández-Castillo or Dr B Cormand, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 645, edifici annex, 3^a planta, Barcelona 08028, Spain.

Email: noefernandez@ub.edu or bcormand@ub.edu

¹³These authors contributed equally to this work.

Received 15 August 2015; accepted 19 August 2015



associations with two genes, *CNR1* (cannabinoid receptor 1, brain) and *CHRNA5* (cholinergic receptor, nicotinic, alpha 5, neuronal) have been replicated so far.^{11–13} Other studies have assessed hundreds of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in multiple genes within candidate systems, and two genome-wide association studies have been reported in cocaine dependence, identifying shared as well as specific associations in European Americans and in African American populations.^{14–17}

We aimed at discovering novel genes involved in the susceptibility to cocaine dependence that could mediate its effects. Under the hypothesis that sequence variants in genes showing differential expression induced by cocaine may contribute to cocaine dependence, and considering the essential role that DA has in cocaine's effects and addiction, we designed a two-stage study by (i) identifying cocaine-induced changes in gene expression in a dopaminergic neuron-like model (SH-SY5Y) using microarray technology and (ii) subsequently considering differentially expressed genes as potential candidates for cocaine dependence, by assessing predicted functional SNPs in these genes through a case–control association study.

MATERIALS AND METHODS

A brief description of the materials and methods is presented below. For detailed information of all procedures see Supplementary Information.

Cell culture and cocaine treatments

SH-SY5Y cells (ATCC, LGC Standards, Middlesex, UK) were differentiated with retinoic acid (Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO, USA) during 7 days at a final concentration of 10 μM supplemented on the media (50:50 Dulbecco's modified Eagle's medium:F12, 10% fetal bovine serum and 1% P/S, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). SH-SY5Y differentiation was assessed by changes compatible with neuron-like morphology and neurite outgrowth, expression of tyrosine hydroxylase as a dopaminergic neuronal marker by western blot, and cell cycle analysis (Supplementary Figure 1). Cytotoxicity of cocaine was assessed with XTT assays (Cell Proliferation Kit II, Roche Life Sciences, Branford, CT, USA) at 0, 1, 5, 10, 15 and 20 μM of cocaine-HCl. The range of cocaine concentrations were selected based on concentrations determined in human plasma and brain in different studies.^{1,18–24} For gene expression analysis, cocaine treatment was performed on differentiated SH-SY5Y cells at 0, 1 and 5 μM , selected on the basis of a previous microarray study²⁵ and the range observed in cocaine abusers.^{19,21} After 30 min of exposure, the medium was replaced and cells were retrieved at 6 or 24 h.

Microarray and qRT-PCR experiments

RNA was isolated from nine dishes per condition (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) and pools of three dishes were hybridized to the GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession number GSE71939 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE71939>).

For quantitative real-time (qRT-PCR) validation, we initially selected genes showing differences in expression ≥ 1.5 -fold, a total of 143. From those we considered genes included in representative enriched functional categories, pathways or gene networks. Finally, we selected eight genes based on their functions and possible involvement in mediating cocaine effects and neuroadaptations, in which expression had not previously been found to be altered by cocaine. Selected genes were validated using qRT-PCR and further assessed in new experiments at different time points (2, 4, 5, 6, 7, 8 and 10 h) after a cocaine acute exposure (0 vs 5 μM) with three replicates per condition. We performed a relative quantification of the results of the qRT-PCR experiments using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) expression for normalization.

Calcium imaging and neuronal activity monitoring

We used calcium imaging (Fluo-4-AM) to monitor changes in neuronal activity in differentiated SH-SY5Y cells at 0, 1, 5 and 10 μM cocaine-HCl

exposure as previously described.²⁶ Recordings were performed during 15 min per condition, assessing over eight replicates (160–240 active neurons per condition).

Subjects

Seven genes showing differential expression profiles after an acute cocaine treatment were selected to perform a case–control association study on cocaine dependence. The clinical sample included 806 cocaine-dependent subjects according to DSM-IV TR criteria (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edn, text revision) seeking treatment in the 'Addiction and Dual Diagnosis Unit' of Vall d'Hebron Hospital (Barcelona, Spain) and 817 sex-matched healthy controls (see Supplementary Table 1 for details). The controls were recruited at the Blood and Tissues Bank of Vall d'Hebron Hospital; none of them had injected drugs intravenously. All individuals were Spanish and Caucasian, with the two last names (one from each parent) of Spanish origin. All of them signed the informed consent, previously approved by the Ethics Committee and were evaluated according to the 'Addiction and Dual Diagnosis Unit' protocol.²⁷ DNA samples were isolated from peripheral blood. Population stratification was previously discarded in our sample.¹⁵

SNP selection and genotyping

A total of 22 SNPs within seven candidate genes were selected based on their predicted functional effect using the FuncPred software (<http://snpinfo.nih.gov/snpinfo/snpfunc.htm>) and two additional SNPs at the *SEMA6D* gene associated with substance dependence in a previous genome-wide association study²⁸ were also included in the assay. Finally, 23 SNPs were successfully genotyped with KASP technology with an average genotype call rate of 98.2%, and further evaluated in a case–control association study.

Functional evaluation of SNP effects on microRNA regulation using a luciferase assay

The effect of SNPs showing consistent predictions on microRNA regulation (using different software tools, see Supplementary Information) was experimentally tested by a luciferase reporter system in HeLa and in SH-SY5Y cells. The 3'-untranslated regions containing both alleles of each SNP were cloned in the pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector (Promega, Madison, WI, USA) and cotransfected into HeLa and SH-SY5Y cells with the corresponding microRNA cloned in a pCMV-MIR vector (OriGene, Rockville, MD, USA). Luciferase expression was assessed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega).

Neuroimaging genetics studies

The effect of *NFAT5* SNPs on regional brain volumes was tested using neuroimaging and genetic data of 1300 self-reported healthy adults from the Dutch Cognomics Resource Brain Imaging Genetics (<http://www.cognomics.nl>).²⁹ Seven regions of interest known to be involved in drug addiction³⁰ (orbitofrontal cortex, prefrontal cortex, nucleus accumbens, putamen, caudate nucleus, hippocampus and insula) were assessed in the discovery sample ($n = 645$, scanned at 1.5 Tesla) and then in the replication sample ($n = 655$, scanned at 3 Tesla; Supplementary Table 2).

Statistical analyses

We used the *affy* library to perform background correction, normalization and summarization, considering the background method, the Robust Multichip Average method and the median polish method, respectively.³¹ Genes were filtered by signal (threshold $\log_2(40)$), and the expression profiles were compared using the *limma* library. We used DAVID Annotation Tool³² for the functional enrichment clustering and the Ingenuity Pathway Analysis v8.8 software (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>) for gene network and canonical pathway enrichment analyses. WebGESTALT was used for microRNA-binding site enrichment analyses considering upregulated and downregulated subsets of genes separately.³³

The minimal statistical power in the case–control association study was estimated *post hoc* considering the SNP with the lowest minimum allele frequency (MAF = 0.143) and assuming an additive model of inheritance, with an estimated statistical power of 98% using the software Power Calculator for Genetic Studies (<http://sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS>). Analysis of Hardy–Weinberg equilibrium and the comparison of genotype

frequencies between cases and controls under an additive model were performed using the *SNPassoc* R package.³⁴ Significant *P*-values were adjusted for age. Bonferroni correction for multiple testing was applied considering 22 independent tests ($P < 0.0022$).

For cytotoxicity, qRT-PCR, calcium imaging and luciferase experiments, differences between conditions were evaluated with the IBM SPSS Statistics Software Version 22.0 (Released 2013; IBM, Armonk, NY, USA) using a Mann–Whitney non-parametric *U*-test, as normality was rejected using the Kolmogorov–Smirnov test (as expected, given the small number of samples), and statistical significance was set at $P < 0.05$. Brain volume analyses were performed by linear regression using PLINK software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>).

RESULTS

Under the hypothesis that cocaine-induced gene expression changes may highlight novel candidate genes predisposing to cocaine dependence, we performed an *in vitro* study in a dopaminergic neuron-like model to assess transcriptional changes induced by cocaine. Subsequently, we tested those genes showing differential expression as potential candidates for cocaine dependence through a case–control association study.

Cocaine-induced changes in gene expression in SH-SY5Y cells differentiated to dopaminergic neurons

SH-SY5Y cells differentiated to dopaminergic neurons (Supplementary Figure 1) showed no cocaine cytotoxic effects at any of the conditions under study (data not shown), and gene expression experiments were conducted at 6 or 24 h after 30 min of cocaine treatment at 0, 1 and 5 μM . After 6 h of an acute 30-min exposure to 5 μM cocaine, 756 genes exhibited significantly altered expression levels when compared to untreated cells (419 upregulated and 337 downregulated; Supplementary Table 3). Analysis of functional group over-representation identified several processes, including regulation of transcription, chromatin modification, focal adhesion and cell projection, and also neurotrophin and MAPK signaling pathways, among others (Figure 1a). Gene network construction showed a highly scored network (score = 34, Figure 1b) involved in molecular transport, cellular development and cell-to-cell signaling and interaction. The canonical pathways 'neuregulin signaling' and 'cyclic AMP response element-binding protein (CREB) signaling in neurons' were also altered (Supplementary Figure 2). The analysis of enrichment of microRNA-binding sites identified miR-124a, with predicted targets in 22 genes upregulated by cocaine (see Supplementary Table 4). The validation assays of expression patterns at different time points for eight genes showing expression differences ≥ 1.5 -fold and involved in neuroadaptation, axon guidance, neuroplasticity, neurite outgrowth, neurotrophin signaling pathway or transcription regulation, confirmed increased expression around 6 h after cocaine exposure for ectodermal–neural cortex 1 (*ENCT1*), nuclear factor-activated T-cells 5 (*NFATS5*), E74-like factor 1 (*ELF1*), protein phosphatase 1 regulatory subunit 9A (*PPP1R9A*), insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 (*IGF2BP3*) and neuregulin 1 (*NRG1*), and decreased expression for semaphorin 6D (*SEMA6D*) (Figure 2).

No differences in gene expression were observed in the microarray experiments when cells were treated with 1 μM cocaine or 24 h after exposure. In order to explain the lack of changes observed at this concentration, we hypothesized that neuronal activation may co-occur with transcriptional changes above a specific threshold of cocaine concentration, and 1 μM cocaine may not be sufficient to induce detectable changes in neuronal activity nor in gene expression. For this purpose, we investigated neuronal network activity by means of calcium imaging after exposure to different cocaine concentrations (Figure 3a). We observed a concentration-dependent progressive increase in neuronal response and firing amplitude (Figures 3b and c). No changes in

the percentage of active neurons were observed when we compared 0 and 1 μM cocaine treatment (22 and 26%, $P = 0.44$), nor in the average number of firing/neuron (0.4 and 0.5 firings/neuron, $P = 0.40$) (Figures 3d and e). Increases in active neurons and a higher number of firings/neuron, however, were detected after exposure to 5 μM (64%, $P = 8.7\text{e} - 05$; 1.4 firings/neuron, $P = 0.047$) or 10 μM cocaine–HCl (67%, $P = 1.5\text{e} - 06$; 1.9 firings/neuron, $P = 3.6\text{e} - 03$) compared to 0 μM (Figures 3d and e). The absence of differences in neuronal activity below 1 μM correlates with the lack of differences observed in gene expression at this cocaine concentration.

Case–control association study on cocaine dependence

The seven genes that showed cocaine-induced expression changes validated by qRT-PCR were subsequently considered as candidates to contribute to cocaine dependence susceptibility. Twenty-three potentially functional SNPs in genes showing cocaine-induced changes in expression levels (*NFATS5*, *ELF1*, *PPP1R9A*, *SEMA6D* and *IGF2BP3*) were subsequently followed-up in a case–control association study of 806 cocaine-dependent patients and 817 sex-matched healthy controls. All SNPs, except for rs854524, not considered in the subsequent analyses, were in Hardy–Weinberg equilibrium both in cases and in controls (Supplementary Table 5).

The single-marker analysis showed that five SNPs in the 3'-untranslated region of the *NFATS5* gene were associated with cocaine dependence, and two of them (rs1437134 and rs7359336, in high linkage disequilibrium) survived the Bonferroni correction for multiple testing (Table 1; Supplementary Table 5; Supplementary Figure 3). All five variants were predicted to alter binding sites for microRNAs (Supplementary Figure 4) and two of them, rs1437134 and rs11641233, were predicted to alter hsa-miR-509 and hsa-miR-649 binding to the *NFATS5* messenger RNA by at least three different software tools. We subsequently focused on these two SNPs and performed a luciferase reporter assay in HeLa and SH-SY5Y cells. A significant decrease in gene expression was observed for allele rs1437134G compared to allele rs1437134A, both in HeLa and in SH-SY5Y cells (9 and 13%, respectively; Figure 4). In the presence of the microRNA hsa-miR-509, the decrease in gene expression shown by rs1437134G, compared to rs1437134A, was more pronounced in both cell lines (31% in HeLa and 21% in SH-SY5Y; Figure 4). In contrast, no effect on gene expression was detected for rs11641233 in the presence of hsa-miR-649 (data not shown).

Finally, as *NFATS5* is a member of the NFAT protein family, involved in axon guidance, and it is highly expressed in the developing and adult brain, we tested possible effects of *NFATS5* variation on brain volumes using brain imaging data. In this way, we aimed at identifying potential mechanisms mediating the effect of this gene on addiction risk. However, no significant correlations were observed between brain volumes in the regions of interest and any of the SNPs investigated (Supplementary Table 6).

DISCUSSION

This study aimed at uncovering genes mediating cocaine's effects in an *in vitro* model that could eventually participate also in the susceptibility to cocaine dependence. For this purpose, we first identified genes showing differential expression under cocaine exposure in a dopaminergic cell model, and we subsequently investigated their possible role in the predisposition to cocaine dependence by assessing functional common genetic variants through a case–control study. The results of our experimental design pointed at *NFATS5*, which is upregulated by cocaine and bears functional risk variants for cocaine dependence.



4

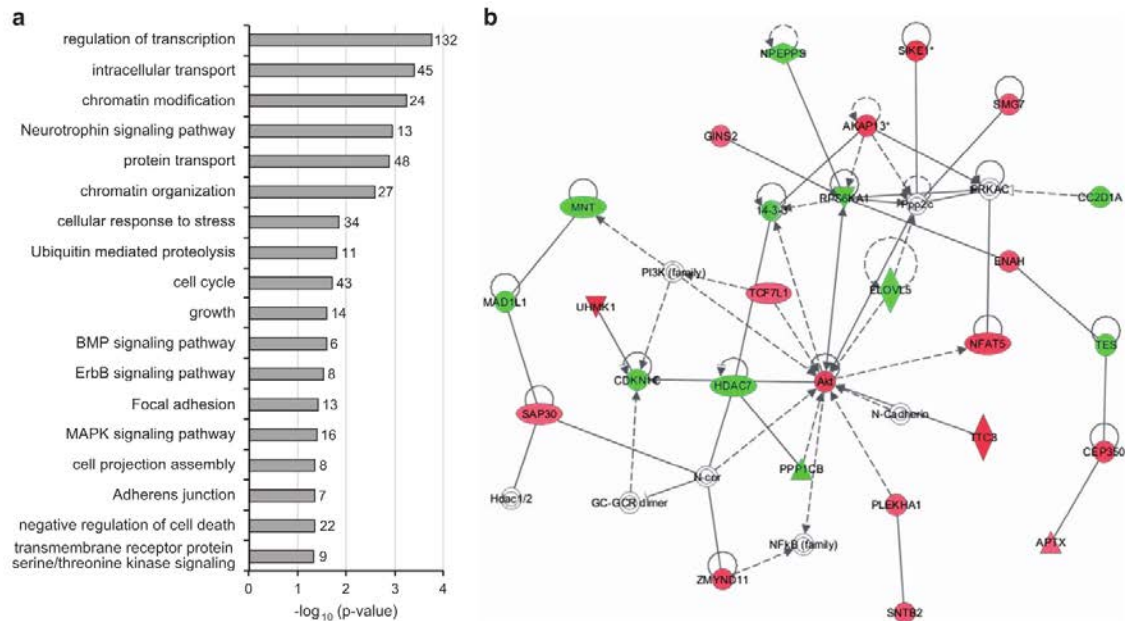


Figure 1. Gene expression changes caused by exposure to 5 μ M cocaine *in vitro* after 6 h. **(a)** Representative over-represented biological categories (Gene Ontology terms, GO) and pathways (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) identified by DAVID software among the differentially expressed genes. The number of genes with altered expression included in each category is indicated on the right side of the bar. **(b)** Gene network involved in molecular transport, cell-to-cell signaling and interaction and cellular development (score = 34). The green and red nodes in the pathway indicate the down- and upregulated genes, respectively, induced by 5 μ M cocaine-HCl after 6 h.

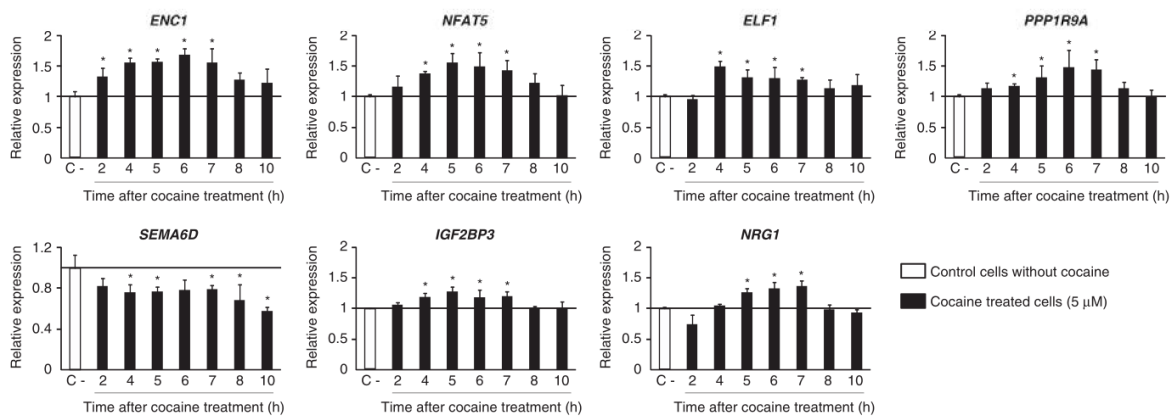


Figure 2. Quantitative real-time PCR validation of gene expression changes identified by microarray experiments. Transcription levels of seven genes involved in neuronal adaptations and transcription were determined by qRT-PCR at different time points after a 30-min exposure to 5 μ M cocaine. Significant differences compared with control cells (not exposed to cocaine) normalized to *GAPDH* are indicated (* $P < 0.05$). Error bars indicate s.d.

To our knowledge, this is the first study assessing gene expression changes induced by cocaine in a dopaminergic cell model, with dopaminergic neurons being the key of the reward system and cocaine pleasurable effects. For this purpose, we used the SH-SY5Y cell line differentiated with retinoic acid, which shows neuron-like morphology, has increased DA content, expresses neuronal and dopaminergic markers, has functional DA transporter, and features excitability, potential propagation and enhanced dopaminergic neurotransmission.^{35–38}

In vitro studies assessing the effect of cocaine exposure on gene expression have previously been performed in neuronal

progenitor or fetal cells to study prenatal brain alterations, and showed changes in immune and inflammatory responses, and cell-death related genes.^{25,39,40} Under our experimental conditions, changes in expression were detected for genes involved in transcription, transport, cell cycle, cell projection and adhesion, and MAPK and CREB signaling, which is in agreement with previous gene expression studies after cocaine abuse performed in humans and animals.^{4,5} Several genes showing differential expression in our study were also found altered in previous studies performed in human post-mortem samples and rat models, including *ADORA1* (adenosine A1 receptor), *CALM2*

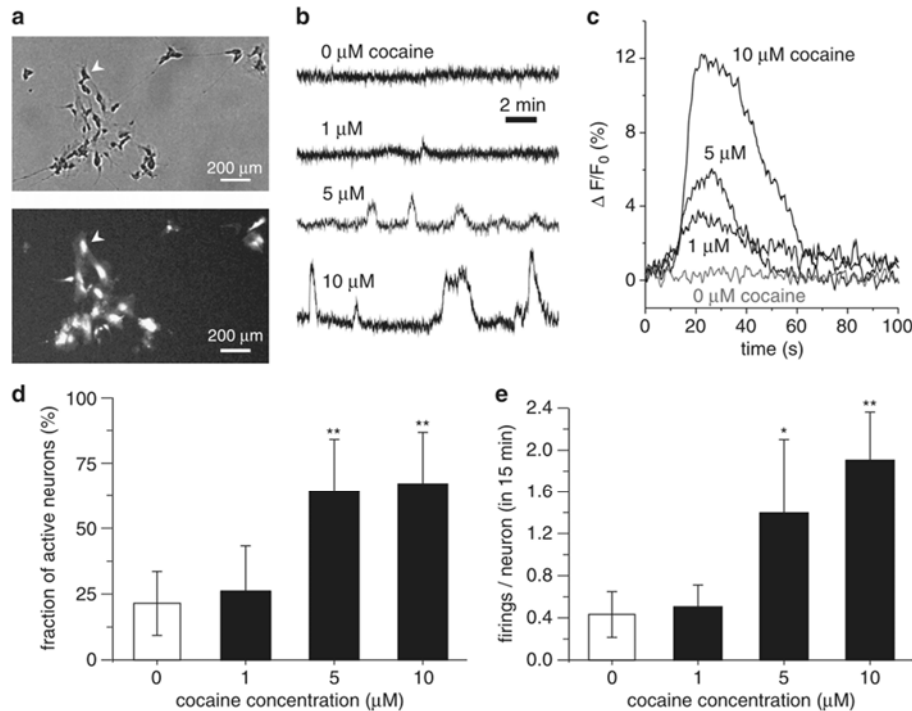


Figure 3. Neuronal activity changes induced by cocaine. **(a)** Comparison of a phase-contrast snapshot (top) with the fluorescence equivalent (bottom). For the latter, bright spots are firing neurons, showing the ability to track neuronal activity with single-cell resolution. The arrowhead indicates the same neuron in both images. **(b)** Representative fluorescence traces of neuronal activity for gradual exposure to higher cocaine concentrations. Neuronal response is weak for 1 μM concentration, and increases progressively for 5 and 10 μM . **(c)** Detail of neuronal response to cocaine, showing that the firing amplitude increases with cocaine concentration. Each trace at a given concentration is an average over the responses of 10 different neurons. **(d)** Comparison of the fraction of active neurons, showing that network activity significantly increases for 5 and 10 μM cocaine exposure compared to the 0 μM (spontaneous activity) and 1 μM concentration. **(e)** Average number of activations per neuron for the different conditions, highlighting the much higher neuronal activity at 5 and 10 μM cocaine. Significant differences compared to 0 μM cocaine are indicated. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Error bars indicate s.d.

(calmodulin 2), *GRIN1* (glutamate receptor, ionotropic, *N*-methyl *D*-aspartate 1), *LAMB1* (laminin beta 1) and *SMN1* (survival of motor neuron 1, telomeric; see Supplementary Table 3).^{41–46} We detected the effect of cocaine exposure on SH-SY5Y cells at 6 h after 5 μM cocaine treatment. This is different from a previous study by Crawford *et al.*²⁵ in human neuronal progenitor cells showing gene expression changes 24 and 48 h after only 1 μM cocaine treatment. The results of the transcription analysis correlated with our calcium imaging experiments, a technique previously employed in SH-SY5Y cells to assess caffeine and carbachol effects,⁴⁷ that revealed significant increases in neuronal activity after exposure to 5 μM cocaine, but almost no activity changes under 1 μM cocaine. This is consistent with previous studies detecting cocaine concentrations in the caudate-putamen of cocaine abusers in the range of 0.8–1.8 μM (average about 1 μM) during the 30 min after an intravenous cocaine dose of 0.1–mg kg^{-1} ,⁴⁸ a dose that was not sufficient to produce a subjective 'high', rush and craving in humans;¹ these were only observed at higher intravenous doses (0.3 and 0.6 mg kg^{-1} , commonly used by cocaine abusers). Thus, 1 μM cocaine in dopaminergic regions of the brain (after a 0.1–mg kg^{-1} dose) would not be enough to produce those cocaine effects, which may correlate with our findings obtained in neuronal activity and expression studies *in vitro*.

Among the genes showing the most pronounced expression changes after exposure to 5 μM cocaine, we selected some showing functions that could potentially mediate cocaine effects

and participate in neuronal circuit remodeling and neuroadaptations that lead to cocaine dependence. We succeeded in validating expression changes for seven of the eight selected genes, *ENC1*, *NFAT5*, *ELF1*, *PPP1R9A*, *SEMA6D*, *IGF2BP3* and *NRG1*, whose expression had not previously been described to be altered after exposure to cocaine. *ENC1* (NRP/B) is primarily expressed in neurons and encodes an actin-binding protein that induces neurite outgrowth and has a role in nervous system development and differentiation.^{49,50} *PPP1R9A* is also expressed in neurons; it encodes Neurabin-1, a synaptic protein that controls neuronal actin cytoskeleton and reorganization and is involved in neurite formation.^{51,52} Semaphorin 6D, encoded by *SEMA6D*, is involved in axon guidance, and SNPs in this gene have previously been associated with substance dependence in a genome-wide association study.^{28,53,54} Other semaphorins have also been found upregulated by cocaine in animal and human studies.^{44,55} *IGF2BP3* is involved in neuronal differentiation and Neuregulin1, encoded by *NRG1*, is a signaling protein that mediates cell-to-cell interactions, neuronal survival, synaptic maturation and maintenance, growth cone dynamics and trafficking of neurotransmitter receptors.^{56,57} Both *ELF-1* and *NFAT5* encode transcription factors that have been studied mainly in lymphoid cells and immune response. *ELF-1* binds to the EBS elements of *NFAT1*, another *NFAT* family member.⁵⁸

We subsequently considered these seven genes, which could mediate cocaine's effects and neuroadaptations, as candidates for participating in the susceptibility to cocaine dependence.



Table 1. SNPs associated with cocaine dependence in the *NFAT5* gene in a Spanish sample of 806 cocaine-dependent patients and 817 controls

Locus	Marker	Predicted effect	Controls N (%)				Cases N (%)				Sum	P-value ^a	Adj P-value ^b	OR (95% CI)
			11	12	22	Sum	11	12	22	Sum				
<i>NFAT5</i>	rs1437134	G > A	278 (34.2)	384 (47.3)	150 (18.5)	812	325 (40.5)	370 (46.1)	108 (13.4)	803	0.00118 ^c	0.00031 ^c	1.27 (1.10–1.45) ^d	
	rs7359336	A > G	278 (34.1)	386 (47.3)	152 (18.6)	816	321 (40.2)	369 (46.2)	109 (13.6)	799	0.00141 ^c	0.00035 ^c	1.25 (1.09–1.45) ^d	
	rs11641233	C > T	516 (63.2)	264 (32.3)	37 (4.5)	817	461 (57.5)	286 (35.7)	55 (6.8)	802	0.00734	0.02599	1.25 (1.06–1.47)	
	rs6499244	A > T	264 (32.4)	390 (47.8)	161 (19.8)	815	293 (36.5)	385 (48.0)	124 (15.5)	802	0.0156	0.00474	1.37 (1.03–1.37) ^d	
	rs12232410	G > A	516 (63.3)	262 (32.2)	37 (4.5)	815	463 (57.5)	288 (35.8)	54 (6.7)	805	0.00749	0.0351	1.25 (1.06–1.47)	

Abbreviations: CI, confidence interval; miRNA, microRNA; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism. ^aLog-additive model. ^bAdjusted by age. ^cSurvive Bonferroni correction $P < 0.0022$. ^dWhen $OR < 1$, the inverted score is shown.

Functional SNPs in these genes, selected as potential risk factors for this phenotype, were assessed in our Spanish sample of cocaine-dependent patients and controls. Our case-control association study with common genetic variants pointed to five SNPs in *NFAT5* as risk factors for cocaine dependence, with rs1437134 surviving the Bonferroni correction for multiple testing and showing evidence of functional effects on gene expression. The risk allele for cocaine dependence, rs1437134G, determined a decreased *NFAT5* expression, an effect that was more pronounced in the presence of the microRNA hsa-miR-509 in the two cell lines tested. Previous studies support a link between the effects of cocaine and microRNAs. Cocaine chronic exposure resulted in increased Ago2 messenger RNA and protein in the striatum (a key brain region involved in addiction), and consequently an alteration of microRNA expression levels.⁵⁹ Also, cocaine administration induced expression changes in a wide range of microRNAs in dopaminergic neurons in the striatum.⁶⁰ A subset of these microRNAs upregulate genes known to influence the motivational properties of cocaine in mice, such as *Bdnf*, *FosB* and *Cdk5r1*.⁶⁰ Additional evidence suggesting that cocaine may exert its effects on gene expression through the regulation of the microRNA machinery was also found in our study, as an enrichment of predicted binding sites for miR-124a was observed among the list of genes found upregulated by cocaine. Interestingly, miR-124a has previously been reported to be down-regulated in SH-SY5Y cells after exposure to cocaine and in the mesolimbic dopaminergic system after chronic cocaine administration.^{61,62}

Our expression and case-control association studies suggest that *NFAT5* may contribute to the vulnerability to cocaine dependence, which is in agreement with previous evidence suggesting that cocaine-induced activation of gene expression may be partially mediated by NFAT-dependent transcription.⁶³ Transcription regulated by NFAT is shown to be induced by DA receptor stimulation. Cocaine triggers striatal NFAT4c nuclear translocation, possibly through a DA increase in the synaptic cleft produced by this drug.⁶³ Interestingly, *NFAT5* was present in the gene network identified, and NFAT canonical pathways were significantly over-represented in our gene expression study (Figure 1b; Supplementary Figures 2 and 5), which means that several genes regulated by NFAT or encoding related proteins are also differentially expressed after cocaine exposure. The NFAT family is involved in axonal growth and guidance by calcineurin/NFAT signaling pathway. *NFAT5* (also known as TonEBP), however, differs from the other family members, as it does not have the calcineurin-binding domain.^{64,65} It has been involved in regulating response to osmotic stress and hypertonicity in several cell types, including T cells, kidney and neurons, and its activation also upregulates its own transcription.^{64,66–69} It is highly expressed in the brain at embryonic stages, but little is known about its function in the brain.^{66,70} Interestingly, a recent study suggests that *NFAT5* could participate in DA synthesis and secretion in renal proximal tubule cells.⁷¹ If *NFAT5* is involved in DA neurotransmission in the brain, genetic variants within this gene may predispose to cocaine dependence through changes in DA activity. This would be in agreement with 'the reward deficiency syndrome' hypothesis, which postulates that hypodopaminergic activity predisposes to cocaine addiction.⁷²

Considering all these data, *NFAT5*, a transcription factor, could be an important mediator of cocaine's effects by activating NFAT-dependent transcription as well as dopaminergic activity. Cocaine might activate *NFAT5* nuclear translocation, as it was shown for another member of the NFAT family,⁶³ being responsible for cocaine-induced changes in gene expression, including its own upregulation. It is thus tempting to speculate that genetic variants impacting *NFAT5* will cause an effect on the expression of relevant downstream genes and on DA activity, which could eventually contribute to cocaine dependence phenotypes.

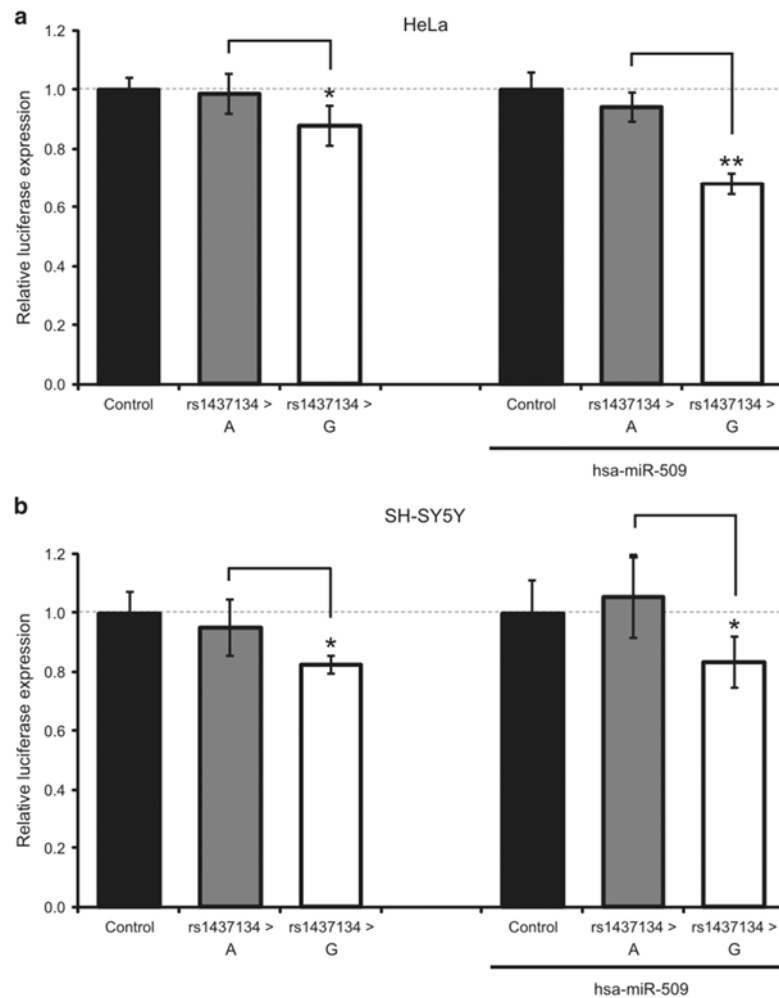


Figure 4. Effect of rs1437134 on gene expression. Effect on gene expression of the two alleles of the associated variant rs1437134 in absence and presence of hsa-miR-509 in HeLa cells (a) and in SH-SY5Y cells (b). Relative luciferase expression of the pmirGlo vector (control) and the constructs with the 3'-untranslated region of *NFAT5* containing the rs1437134 A and G alleles. Significant differences between the G and the A allele are indicated as * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. Error bars indicate s.d.

This study should be viewed in terms of several strengths and limitations. Some strengths are as follow: (i) through a comprehensive hypothesis-free study, we have identified variants in a gene that seem to have a functional impact and that may participate in cocaine dependence; (ii) gene expression changes detected with microarrays were validated and are consistent with other studies; (iii) the clinical sample was evaluated by members of the research team in a single hospital following the same clinical assessment; (iv) all individuals, cases and controls, were Spanish, Caucasian and from the same small geographical area in Barcelona, Spain. Some limitations of the study, however, should be recognized: (i) cocaine effects on gene expression and neuronal activity were performed in a dopaminergic neuron-like model, from a tumor cell line, and thus they may differ from those taking place in the brain; (ii) the limited number of replicates in the microarray study may have prevented us from identifying existing differences in gene expression; (iii) in the association study, SNPs in the candidate genes were not selected under genetic coverage criteria, and thus, other variants not tested by us may be involved in cocaine dependence predisposition; (iv) cocaine dependence

was not discarded in the control sample, which could lead to false-negative findings in our association study; (v) the SNPs found associated were not assessed in a replication sample; (vi) the functional effect of SNPs on microRNA regulation was studied *in vitro* with a reporter system and overexpressing the microRNAs, and may differ considerably from real conditions; (vii) we had a large sample for the neuroimaging genetics study, but we only tested few brain phenotypes, based on earlier findings on regions of interest to addiction rather than testing brain-wide effects.

To sum up, our data indicate that cocaine-induced changes in gene expression occur in differentiated SH-SY5Y cells a few hours after exposure to the drug, which are related to regulation of transcription and gene expression, cellular movement and neuronal adaptations. These changes occur at 5 μM cocaine, a concentration that increases neuronal activity and firing. Additional evidence suggests that a common functional variant in one of the genes showing increased expression after cocaine exposure, rs1437134 in *NFAT5*, may contribute to cocaine dependence. However, further genetic and functional studies of *NFAT5* are needed to confirm its role in cocaine dependence.

**CONFLICT OF INTEREST**

BF received a speaker fee from Merz. The remaining authors declare no conflict of interest for this research.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to all the patients, their families and clinical collaborators who contributed with the patient recruitment (Carmen Barral, Nieves Martínez-Luna, Jesús Pérez-Pazos, Alfonso Abad and Laia Rodríguez-Cintas). We thank Fèlix Junyent, Hector Diez, Eulàlia Martí, Mónica Cozar, Javier Orlandi and Concepció Arenas for helpful suggestions with cell culture, differentiation, western blot, neuronal activity and statistical analyses. This work made use of the BIG (Brain Imaging Genetics) database, first established in Nijmegen, The Netherlands, in 2007. This resource is now part of Cognomics (<http://www.cognomics.nl>), a joint initiative by researchers of the Donders Centre for Cognitive Neuroimaging, the Human Genetics and Cognitive Neuroscience Departments of the Radboud University Medical Center and the Max Planck Institute for Psycholinguistics in Nijmegen. We thank all persons who kindly participated in the BIG research. NF-C and JC-D were supported by contracts of the 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras' (CIBERER), and JC-D was additionally supported by 'Generalitat de Catalunya' (2015 FLB 00448). Major financial support for this research was received by BC from the Spanish 'Ministerio de Economía y Competitividad' (SAF2012-33484) and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2014SGR932). JS acknowledges financial support from the Spanish 'Ministerio de Ciencia e Innovación' (FIS2011-28820-C02-01 and FIS2013-41144-P) and from 'Generalitat de Catalunya' (2009SGR14 and 2014SGR878). MR is a recipient of a Miguel de Servet contract from the 'Instituto de Salud Carlos III', Spain (CP09/00119) and CS-M was supported by the European Community's Seventh Framework Programme (FP7HEALTH2013/602805, Aggrosotype). MR received financial support from 'Instituto de Salud Carlos III' (PI11/00571, PI11/01629, PI12/01139, PI14/01700), and by the European Regional Development Fund (ERDF) and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2014SGR1357). CR received financial support by 'Instituto de Salud Carlos III' (PI13/1911) and 'Plan Nacional Sobre Drogas (2013/044). BF was supported by grants from the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO), that is, the NWO Brain & Cognition Excellence Program (grant 433-09-229), Vici grant (grant 016-130-669), the European Community's Seventh Framework Programme (under grant agreement number 602450, IMAGEMEND) and from the NIH BD2K Initiative (grant number U54 EB020403). BC and BF also received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (under grant agreement number 602805, Aggrosotype) and from the European Community's Horizon 2020 Programme (under grant agreement number 643051, MiND).

REFERENCES

- Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN et al. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 1997; **386**: 827–830.
- Pettit HO, Justice JB Jr. Dopamine in the nucleus accumbens during cocaine self-administration as studied by in vivo microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; **34**: 899–904.
- Ritz MC, Cone EJ, Kuhar MJ. Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life Sci* 1990; **46**: 635–645.
- Lull ME, Freeman WM, Vrana KE, Mash DC. Correlating human and animal studies of cocaine abuse and gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1141**: 58–75.
- Yuferov V, Nielsen D, Butelman E, Kreek MJ. Microarray studies of psychostimulant-induced changes in gene expression. *Addict Biol* 2005; **10**: 101–118.
- Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2001; **2**: 119–128.
- Nestler EJ. Genes and addiction. *Nat Genet* 2000; **26**: 277–281.
- Wagner FA, Anthony JC. From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology* 2002; **26**: 479–488.
- Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC, Prescott CA. Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry* 2000; **57**: 261–269.
- Kendler KS, Prescott CA. Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 1998; **173**: 345–350.
- Buhler KM, Gine E, Echeverry-Alzate V, Calleja-Conde J, de Fonseca FR, Lopez-Moreno JA. Common single nucleotide variants underlying drug addiction: more than a decade of research. *Addict Biol* 2015; **20**: 845–871.
- Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Olie JP, Charles-Nicolas A et al. Polymorphisms TaqI A of the DRD2, Ball of the DRD3, exon III repeat of the DRD4, and

- 3' UTR VNTR of the DAT: association with childhood ADHD in male African-Caribbean cocaine dependents? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007; **144B**: 1034–1041.
- Hall FS, Drgonova J, Jain S, Uhl GR. Implications of genome wide association studies for addiction: are our a priori assumptions all wrong? *Pharmacol Ther* 2013; **140**: 267–279.
- Fernandez-Castillo N, Cormand B, Roncero C, Sanchez-Mora C, Grau-Lopez L, Gonzalvo B et al. Candidate pathway association study in cocaine dependence: the control of neurotransmitter release. *World J Biol Psychiatry* 2012; **13**: 126–134.
- Fernandez-Castillo N, Roncero C, Grau-Lopez L, Barral C, Prat G, Rodriguez-Cintas L et al. Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence. *Genes Brain Behav* 2013; **12**: 39–46.
- Gelernter J, Sherva R, Koesterer R, Almasy L, Zhao H, Kranzler HR et al. Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene. *Mol Psychiatry* 2014; **19**: 717–723.
- Yu Y, Kranzler HR, Panhuysen C, Weiss RD, Poling J, Farrer LA et al. Substance dependence low-density whole genome association study in two distinct American populations. *Hum Genet* 2008; **123**: 495–506.
- Ellenhorn MJ, Barceloux DG. *Medical Toxicology*. Elsevier: New York, NY, USA, 1988; 644–661.
- Fowler JS, Volkow ND, Wolf AP, Dewey SL, Schlyer DJ, Macgregor RR et al. Mapping cocaine binding sites in human and baboon brain in vivo. *Synapse* 1989; **4**: 371–377.
- Jatlow P. Cocaine: analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition. *Yale J Biol Med* 1988; **61**: 105–113.
- Jufer RA, Walsh SL, Cone EJ. Cocaine and metabolite concentrations in plasma during repeated oral administration: development of a human laboratory model of chronic cocaine use. *J Anal Toxicol* 1998; **22**: 435–444.
- Paly D, Jatlow P, Van Dyke C, Jeri FR, Byck R. Plasma cocaine concentrations during cocaine paste smoking. *Life Sci* 1982; **30**: 731–738.
- Stephens BG, Jentzen JM, Karch S, Mash DC, Wetli CV. Criteria for the interpretation of cocaine levels in human biological samples and their relation to the cause of death. *Am J Forensic Med Pathol* 2004; **25**: 1–10.
- Van Dyke C, Barash PG, Jatlow P, Byck R. Cocaine: plasma concentrations after intranasal application in man. *Science* 1976; **191**: 859–861.
- Crawford FC, Wood ML, Wilson SE, Mathura VS, Hollen TR, Geall F et al. Cocaine induced inflammatory response in human neuronal progenitor cells. *J Neurochem* 2006; **97**: 662–674.
- Orlandi JG, Soriano J, Alvarez-Lacalle E, Teller S, Casademunt J. Noise focusing and the emergence of coherent activity in neuronal cultures. *Nat Phys* 2013; **9**: 582–590.
- Roncero C, Daigre C, Barral C, Ros-Cucurull E, Grau-Lopez L, Rodriguez-Cintas L et al. Neuroticism associated with cocaine-induced psychosis in cocaine-dependent patients: a cross-sectional observational study. *PLoS One* 2014; **9**: e106111.
- Drgon T, Zhang PW, Johnson C, Walther D, Hess J, Nino M et al. Genome wide association for addiction: replicated results and comparisons of two analytic approaches. *PLoS One* 2010; **5**: e8832.
- Guadalupe T, Zwiers MP, Teumer A, Wittfeld K, Vasquez AA, Hoogman M et al. Measurement and genetics of human subcortical and hippocampal asymmetries in large datasets. *Hum Brain Mapp* 2014; **35**: 3277–3289.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: brain circuits and treatment strategies. *Neuropharmacology* 2004; **47**: 3–13.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; **4**: 249–264.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; **4**: 44–57.
- Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: W741–W748.
- Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X et al. SNPpass: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; **23**: 644–645.
- Lopes FM, Schroder R, da Frota ML Jr, Zanotto-Filho A, Muller CB, Pires AS et al. Comparison between proliferative and neuron-like SH-SY5Y cells as an in vitro model for Parkinson disease studies. *Brain Res* 2010; **1337**: 85–94.
- Wernicke C, Hellmann J, Finckh U, Rommelspacher H. Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells. *Pharmacol Rep* 2010; **62**: 649–663.
- Cuende J, Moreno S, Bolanos JP, Almeida A. Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC(Cdh1) activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene* 2008; **27**: 3339–3344.

- 38 Sarkanen JR, Nykky J, Siikonen J, Selinummi J, Ylikomi T, Jalonen TO. Cholesterol supports the retinoic acid-induced synaptic vesicle formation in differentiating human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Neurochem* 2007; **102**: 1941–1952.
- 39 Lee CT, Chen J, Hayashi T, Tsai SY, Sanchez JF, Errico SL et al. A mechanism for the inhibition of neural progenitor cell proliferation by cocaine. *PLoS Med* 2008; **5**: e117.
- 40 Lee CT, Lehmann E, Hayashi T, Amable R, Tsai SY, Chen J et al. Gene expression profiling reveals distinct cocaine-responsive genes in human fetal CNS cell types. *J Addict Med* 2009; **3**: 218–226.
- 41 Albertson DN, Pruetz B, Schmidt CJ, Kuhn DM, Kapatos G, Bannon MJ. Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. *J Neurochem* 2004; **88**: 1211–1219.
- 42 Freeman WM, Brebner K, Lynch WJ, Robertson DJ, Roberts DC, Vrana KE. Cocaine-responsive gene expression changes in rat hippocampus. *Neuroscience* 2001; **108**: 371–380.
- 43 Lehrmann E, Colantuoni C, Deep-Soboslay A, Becker KG, Lowe R, Huestis MA et al. Transcriptional changes common to human cocaine, cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One* 2006; **1**: e114.
- 44 Mash DC, French-Mullen J, Adi N, Qin Y, Buck A, Pablo J. Gene expression in human hippocampus from cocaine abusers identifies genes which regulate extracellular matrix remodeling. *PLoS One* 2004; **2**: e1187.
- 45 Tang WX, Fasulo WH, Mash DC, Hemby SE. Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. *J Neurochem* 2003; **85**: 911–924.
- 46 Toda S, McGinty JF, Kalivas PW. Repeated cocaine administration alters the expression of genes in corticolimbic circuitry after a 3-week withdrawal: a DNA microarray study. *J Neurochem* 2002; **82**: 1290–1299.
- 47 van Acker K, Bautmans B, Bultynck G, Maes K, Weidema AF, de Smet P et al. Mapping of IP(3)-mediated Ca(2+) signals in single human neuroblastoma SH-SY5Y cells: cell volume shaping the Ca(2+) signal. *J Neurophysiol* 2000; **83**: 1052–1057.
- 48 Logan J, Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW et al. Concentration and occupancy of dopamine transporters in cocaine abusers with [11C] cocaine and PET. *Synapse* 1997; **27**: 347–356.
- 49 Kim TA, Lim J, Ota S, Raja S, Rogers R, Rivnay B et al. NRP/B, a novel nuclear matrix protein, associates with p110(RB) and is involved in neuronal differentiation. *J Cell Biol* 1998; **141**: 553–566.
- 50 Kim TA, Jiang S, Seng S, Cha K, Avraham HK, Avraham S. The BTB domain of the nuclear matrix protein NRP/B is required for neurite outgrowth. *J Cell Sci* 2005; **118**: 5537–5548.
- 51 Nakanishi H, Obaishi H, Satoh A, Wada M, Mandai K, Satoh K et al. Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *J Cell Biol* 1997; **139**: 951–961.
- 52 Burnett PE, Blackshaw S, Lai MM, Qureshi IA, Burnett AF, Sabatini DM et al. Neurabin is a synaptic protein linking p70 S6 kinase and the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8351–8356.
- 53 Qu X, Wei H, Zhai Y, Que H, Chen Q, Tang F et al. Identification, characterization, and functional study of the two novel human members of the semaphorin gene family. *J Biol Chem* 2002; **277**: 35574–35585.
- 54 Frank E. Axon guidance in the spinal cord: choosin' by exclusion. *Neuron* 2006; **52**: 745–746.
- 55 Bahi A, Dreyer JL. Cocaine-induced expression changes of axon guidance molecules in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 2005; **28**: 275–291.
- 56 Mori H, Sakakibara S, Imai T, Nakamura Y, Iijima T, Suzuki A et al. Expression of mouse igf2 mRNA-binding protein 3 and its implications for the developing central nervous system. *J Neurosci Res* 2001; **64**: 132–143.
- 57 Talmage DA. Mechanisms of neuregulin action. *Novartis Found Symp* 2008; **289**: 74–84.
- 58 Thompson CB, Wang CY, Ho IC, Bohjanen PR, Petryniak B, June CH et al. cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol Cell Biol* 1992; **12**: 1043–1053.
- 59 Eipper-Mains JE, Kiraly DD, Palakodeti D, Mains RE, Eipper BA, Graveley BR. microRNA-Seq reveals cocaine-regulated expression of striatal microRNAs. *RNA* 2011; **17**: 1529–1543.
- 60 Schaefer A, Im HL, Veno MT, Fowler CD, Min A, Intrator A et al. Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction. *J Exp Med* 2010; **207**: 1843–1851.
- 61 Rodrigues AC, Li X, Radecki L, Pan YZ, Winter JC, Huang M et al. MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines. *Biopharm Drug Dispos* 2011; **32**: 355–367.
- 62 Chandrasekar V, Dreyer JL. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol Cell Neurosci* 2009; **42**: 350–362.
- 63 Groth RD, Weick JP, Bradley KC, Luoma JI, Aravamudan B, Klug JR et al. D1 dopamine receptor activation of NFAT-mediated striatal gene expression. *Eur J Neurosci* 2008; **27**: 31–42.
- 64 Halterman JA, Kwon HM, Wamhoff BR. Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5). *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; **302**: C1–C8.
- 65 Nguyen T, Di Giovanni S. NFAT signaling in neural development and axon growth. *Int J Dev Neurosci* 2008; **26**: 141–145.
- 66 Aramburu J, Drews-Elger K, Estrada-Gelonch A, Minguillon J, Morancho B, Santiago V et al. Regulation of the hypertonic stress response and other cellular functions by the Rel-like transcription factor NFAT5. *Biochem Pharmacol* 2006; **72**: 1597–1604.
- 67 Maallem S, Berod A, Mutin M, Kwon HM, Tappaz ML. Large discrepancies in cellular distribution of the tonicity-induced expression of osmoprotective genes and their regulatory transcription factor TonEBP in rat brain. *Neuroscience* 2006; **142**: 355–368.
- 68 Maallem S, Mutin M, Kwon HM, Tappaz ML. Differential cellular distribution of tonicity-induced expression of transcription factor TonEBP in the rat brain following prolonged systemic hypertonicity. *Neuroscience* 2006; **137**: 51–71.
- 69 Loyher ML, Mutin M, Woo SK, Kwon HM, Tappaz ML. Transcription factor tonicity-responsive enhancer-binding protein (TonEBP) which transactivates osmoprotective genes is expressed and upregulated following acute systemic hypertonicity in neurons in brain. *Neuroscience* 2004; **124**: 89–104.
- 70 Maouyo D, Kim JY, Lee SD, Wu Y, Woo SK, Kwon HM. Mouse TonEBP-NFAT5: expression in early development and alternative splicing. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; **282**: F802–F809.
- 71 Hsin YH, Tang CH, Lai HT, Lee TH. The role of TonEBP in regulation of AAD expression and dopamine production in renal proximal tubule cells upon hypertonic challenge. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **414**: 598–603.
- 72 Comings DE, Blum K. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res* 2000; **126**: 325–341.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on the Translational Psychiatry website (<http://www.nature.com/tp>)

Supplementary information for:

TRANSCRIPTOMIC AND GENETIC STUDIES IDENTIFY *NFAT5* AS A CANDIDATE GENE FOR COCAINE DEPENDENCE

N Fernández-Castillo, J Cabana-Domínguez, J Soriano, C Sánchez-Mora, C Roncero, L Grau-López, E Ros-Cucurull, C Daigre, M M J van Donkelaar, B Franke, M Casas, M Ribasés & B Cormand

SUPPLEMENTARY INFORMATION

1. COCAINE IN VITRO EXPERIMENTS AND MICROARRAYS

1.1. Cell culture, differentiation and cocaine treatment

SH-SY5Y cells (ATCC, LGC Standards, Middlesex, UK) were cultured in previously poly-lysinated 100 mm dishes at 37°C with 5% CO₂ in 50:50 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) : F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California). All cells used in this study were between the 8th and the 11th passages. For differentiation to dopaminergic neuron-like cells, around 1.17e04 cells/cm² were harvested with media supplemented with 10 nM retinoic acid (RA, Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO, USA) for 7 days, replacing with fresh RA medium on the 4th day. SH-SY5Y differentiation was assessed by changes compatible with neuronal-like morphology and neurite outgrowth, expression of tyrosine-hydroxylase (TH) as a dopaminergic neuronal marker by Western blot, and cell cycle analysis (Supplementary Figure 1). Western blotting of tubulin was performed as described elsewhere¹ and TH was tested with the same procedure using rabbit polyclonal anti-TH (Chemicon, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) 1:500 dilution with an overnight incubation at 4°C. Briefly, cell cycle analysis was performed by fixing cells with ethanol and incubating them with a propidium iodide solution (0.1% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO, USA) in PBS, 0.2 mg/ml RNase A (DNase free) (Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO, USA) and 200 µl propidium iodide 1 mg/ml (Molecular Probes, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) during 15 minutes at 37°C, and then analyzed by flow cytometry.

The range of cocaine concentrations to be studied was selected based on concentrations determined in different human studies: i) in plasma of volunteers after a single dose (0.4 – 1.5 µM);² ii) in plasma of cocaine abusers after repeated doses (1 – 5 µM);³ iii) in forensic plasma samples of cocaine abusers (0.8 – 13 µM in plasma);⁴ iv) plasma average concentration after death by cocaine overdose (20 µM);⁵ v) peak plasma levels after intravenous or smoking of the usual cocaine doses (1.6 – 3.3 µM);^{6,7} vi) in plasma of individuals correlating with significant increase of subjective “high” feeling, rush and craving, correlating with >60% DAT occupancy in a PET study (1 – 2.64 µM);⁸ vii) similar brain and plasma cocaine concentrations in humans after an intravenous administration (0.8 – 3 µM).⁹ For cytotoxicity experiments we considered the whole range of concentrations described in those studies (1 – 20 µM) and for the microarray experiments we used the lowest and highest concentrations in the normal range observed among cocaine abusers (1 – 5 µM),^{3,9} which were also used in a previous microarray study.¹⁰

Once the cells were differentiated, the medium with RA was replaced by fresh medium without RA during 24h before the exposure to cocaine, when the medium was again replaced by either medium without cocaine or medium containing 1 or 5 µM of cocaine hydrochloride (Alcaliber, Madrid, Spain). After 30 minutes of cocaine exposure, the medium was replaced by fresh medium and incubated during 6 or 24 h before retrieval for RNA extraction. Non-treated cells were exposed to the same media replacements. The six treatment groups consisted of untreated (control, 0 µM cocaine-HCl) differentiated SH-SY5Y cells retrieved at 6 and 24 h, differentiated SH-

SY5Y cells treated with 1 μM cocaine-HCl retrieved at 6 and 24 h, and differentiated SH-SY5Y cells treated with 5 μM cocaine-HCl retrieved at 6 and 24 h. Nine dishes of cells were used for each condition.

1.2. Cytotoxicity

For evaluating cocaine cytotoxicity, an XTT assay was performed using the Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Life Sciences, Branford, CT, USA), based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt XTT to form an orange formazan dye by metabolically active cells. Briefly, SH-SY5Y cells were harvested in 24-well plates and differentiated with RA as described above. The medium was replaced by medium containing cocaine at different concentrations (0, 1, 5, 10, 15 and 20 μM) for an acute 30 or 60 minutes exposure, and then replaced by fresh medium. The XTT assay was performed at 24 or 48 hours after cocaine exposure, four replicates per condition, by replacing the medium with fresh medium supplemented with the XTT labelling reagent and the Electron Coupling Reagent as indicated in the manufacturer's protocol. Absorbance was measured at 490nm in a 96-well plate 2 and 4h after adding the medium with XTT. Absorbance differences between conditions were evaluated using a U-Mann-Whitney non-parametric test, since normality was rejected using the Kolmogorov-Smirnov test (as expected given the small number of observations), and statistical significance was set at $P < 0.05$ considering a two-sided test.

1.3. RNA isolation and microarray hybridization

For each condition (exposure to a given cocaine concentration for a preset time after an acute exposure), nine dishes containing treated SH-SY5Y differentiated cells were trypsinized, the pellets were homogenized using Qiashredder (Qiagen, Hilden, Germany) and total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentration was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) and integrity was evaluated using the Bioanalyzer 2100 platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The average RIN value (RNA Integrity Number) was 9.7, being 8.6 the lowest value. RNA samples were stored at -80°C until analyzed. RNA pools from three dishes were used for each replicate in the microarray. For the microarray experiment we used the GeneChip[®] Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA), which contains probes that cover over 47,000 transcripts from over 38,500 well-characterized genes. A total of 18 chips were used: three pools per condition (0, 1 and 5 μM of cocaine-HCl) and two time points, 6 and 24 hours after an acute 30-min cocaine exposure. Two μg of RNA from each pool were used to hybridize arrays at the Genomics Unit of Hospital Clínic-IDIBAPS (Barcelona, Spain). Chips were scanned using a GenePix4000B scanner and raw data was obtained using the GenePix Pro 4.0 and the GCOS software. Microarray data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession number GSE71939 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE71939>).

1.4. Statistical and bioinformatics analysis of the expression microarrays

Analysis of the microarray data was performed using the Bioconductor software for R environment and the *affy* library (www.bioconductor.org).¹¹ The quality assessment of the chips was performed using the *affyPLM* library. Background correction, normalization and summarization were performed using the background, Robust Multichip Average (RMA)¹² and median-polish methods, respectively. Genes were filtered by signal (threshold $\log_2(40)$), and we also discarded those probes that did not correspond to known genes. Genetic profiles at 6 and 24 hours were assessed separately in all steps to avoid interference, and a total number of 24,035 and 26,170 expressed probes (for 6 and 24 hours, respectively) were finally considered for the subsequent analyses. The Linear Modelling for Microarray Analysis (LIMMA) package¹³ was used for the class comparison, in which the expression patterns for 0 μM – 1 μM , 0 μM – 5 μM , and 1 μM – 5 μM conditions at 6 and 24 hours were compared. Corrections for multiple testing were applied by adjusting the p-values with a 10% False Discovery Rate (FDR). Functional group enrichment of genes showing significant differences in expression was performed using the DAVID Annotation Tool (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>) considering GO biological processes (FAT category) and

KEGG pathways.^{14,15} Canonical pathway enrichment analyses and gene networks were investigated with Ingenuity Pathway Analysis 8.8 software (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>; Ingenuity Systems, Redwood city, CA, USA). MicroRNA binding sites enrichment analyses were performed using the WebGESTALT software (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt>) considering separately up-regulated and down-regulated genes.¹⁶

1.5. Quantitative RT-PCR

For quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) validation we initially selected genes showing differences in expression ≥ 1.5 fold, a total of 143. From those, we considered genes included in representative enriched functional categories, pathways or gene networks. Finally, we selected eight genes based on their function and possible involvement in mediating cocaine effects that had not been previously identified to be altered by cocaine.

Validation of the selected results obtained in the microarray study was performed with the samples used in the microarray at 6 hours after cocaine exposure (0 μ M and 5 μ M). Gene expression was also assessed at different time points (2, 4, 5, 6, 7, 8 and 10 h) after cocaine acute exposure (0 μ M or 5 μ M) considering three replicates per condition. Cell culture and differentiation, cocaine treatment and RNA isolation were performed as described above.

Total RNA from the samples was transcribed using the High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). QRT-PCR experiments were performed for eight genes using the LightCycler 480 II system and the Universal Probe Library (Life Sciences, Branford, CT, USA). Gene assays were designed with the Universal ProbeLibrary Assay Design Center software (Roche Life Sciences, Branford, CT, USA). Sequence of the primers and probes used are available upon request. Relative quantification was performed for each selected gene and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (*HPRT1*) were used to normalize the relative amounts of mRNA. Gene expression changes for each comparison were evaluated using a U-Mann-Whitney non-parametric test, since normality was rejected using the Kolmogorov-Smirnov test (as expected given the small number of observations), and statistical significance was set at $P < 0.05$ considering a two-sided test.

1.6. Calcium imaging and neuronal activity monitoring

We used calcium imaging in the cell cultures to monitor the changes in neuronal activity upon cocaine treatment in an area containing about 200 neurons. SH-SY5Y cells were grown and differentiated as described above in 35 mm dishes. Prior to imaging, dishes were gently washed with 4ml PBS at room temperature to remove the original culture medium. Next, we incubated the cultures for 45 min in a solution that contained 1ml of recording medium (RM, consisting of 128 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 45 mM sucrose, 10 mM glucose, and 0.01 M HEPES; pH 7.4) and 4 μ g/ml of the cell-permeant calcium sensitive dye Fluo-4-AM. Then we washed the culture with 2 ml of fresh RM to remove residual free Fluo-4. This medium was discarded to place 4 ml of fresh RM, the final medium for actual recordings.

The culture dish was mounted on a Zeiss inverted microscope equipped with a 5X objective and a 0.32X optical zoom that provided a spatial resolution of 2.9 μ m/pixel. Spontaneous neuronal activity was monitored through a Hamamatsu Orca Flash 2.8 CMOS camera attached to the microscope, in combination with a light source for fluorescence. Grey-scale images of neuronal activity were acquired at a speed of 13.3 frames per second (75 ms interval between two consecutive frames), and a size of 960x720 pixels. These settings provided a final field of view of 2.8x2.1 mm that contained 150-300 neurons.

For data acquisition and analysis we proceeded as follows: We first recorded spontaneous activity (i.e. without cocaine exposure) for 15 min to characterize the background activity of the network. We next added cocaine to the media to reach a concentration C_1 (set as either 1 or 5 μ M), and measured for 15 min. Finally, we increased the cocaine concentration to $C_2 = 10$ μ M, and measured for additional 15 min. The settings of our recording device allowed the identification of single neuronal bodies with sufficient spatial resolution. Hence, we manually

selected all available neurons as regions of interest (ROIs), and then extracted the average grey-scale level (i.e. the fluorescence amplitude) for each region as a function of time. Neuronal firing events were detected as a fast rise in the fluorescence signal, as illustrated in Figure 3.

For each selected neuron and condition (0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, and 10 μ M of cocaine-HCl), we determined two network descriptors, namely the fraction of active neurons and the average activity of the network. Active cells were those that showed activity at any condition within our total recording time of 45 min. We typically observed about 20-30 active cells per culture. The fraction of active neurons in a culture was calculated as the number of cells that showed activity in a given condition divided by the total number of active cells monitored. The average activity of the network was determined as the total number of firings events divided by the total number of active cells. Data in both studies were finally averaged among different cultures. In total, for each condition, we averaged over eight different replicates per condition (a total of 160-240 active neurons per condition). Differences between conditions were evaluated using a U-Mann-Whitney non-parametric test, since normality was rejected using the Kolmogorov-Smirnov test (as expected given the small number of observations), and statistical significance was set at $P < 0.05$ considering a one-sided test.

2. CASE-CONTROL ASSOCIATION STUDY ON COCAINE DEPENDENCE

2.1. Subjects

The patient sample consisted of 806 cocaine dependent subjects (mean age 35.7 ± 8 years and 81.4% males ($n = 656$)), from which 10.3% were dependent only to cocaine and not to any other substance ($n = 83$) (Supplementary Table 3). All patients were recruited and evaluated at the Psychiatry Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) according to DSM-IV TR criteria (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th ed., text revision). The Structured Clinical Interview (SCID)¹⁷ was administered and volunteers with current DSM-IV diagnosis of dependence were included in the study. All patients were evaluated following a protocol of the Unit.¹⁸

The control sample consisted of 817 sex-matched healthy controls (mean age 55.9 ± 16 years, 81.8% males ($n = 668$)) (Supplementary Table 3). All controls were recruited at the Blood and Tissues Bank of Barcelona. None of them had injected drugs intravenously. Both patients and controls were Spanish and Caucasian, with the two last names (one from each parent) of Spanish origin. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitari Vall d'Hebron, and written informed consent was obtained from all participating individuals. Population stratification was previously discarded in our sample.¹⁹

2.2. DNA isolation and quantification

Genomic DNA samples were obtained from peripheral blood lymphocytes by a standard salting-out procedure and concentrations were determined using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Willmington, DE, USA).

2.3. SNP selection and genotyping

For the case-control association study we searched for SNPs in the seven genes showing validated differential expression in neuronal cells treated with cocaine, according to both microarray and qRT-PCR experiments. The selected SNPs had $MAF > 0.15$ in the CEU population (HapMap, <http://www.hapmap.org>), were located within the gene or in a region including 10 Kb upstream and 5 Kb downstream from the gene and were predicted to have a functional effect on the protein, microRNA binding, transcription factor binding or splicing by the SNP Function Prediction software (<http://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.htm>). Variants in two genes were not tested: *ENC1* did not have any SNP fulfilling these criteria and *NRG1* had three non-synonymous SNPs that were not predicted to be damaging by polyphen and, thus, were not considered. For *SEMA6D*, seven SNPs were previously found associated with substance dependence in a GWAS²⁰ and two SNPs with $MAF > 0.15$ that tag the

associated variants, rs3809485 and rs4775708, were also included in our study. A total of 24 SNPs were selected and genotyping was performed using KASP technology (KBiosciences UK Ltd, UK). One SNP assay failed, so a total of 23 SNPs within five genes (*NFAT5*, *ELF1*, *PPP1R9A*, *SEMA6D* and *IGF2BP3*) were successfully genotyped.

2.4. Case-control association study: statistical analysis

The minimal statistical power was estimated *post hoc* using the software Power Calculator for Genetic Studies (<http://sph.umich.edu/csg/abecasis/CaTS>)²¹ under the additive model, assuming an odds ratio (OR) of 1.5 and a significance level of 0.05. For the calculation we considered the lowest MAF value in the control sample (0.143) and a prevalence of 0.0163 for cocaine dependence (10.2% of adult Spanish consumers from which 16% developing dependence (EMCDDA 2012 Annual Report)). The analysis of Hardy–Weinberg equilibrium (threshold set at $P=0.01$) and the comparison of genotype frequencies between cases and controls under the additive model was performed using the *SNPassoc* R package.²² Significant *P* values were adjusted for age. Bonferroni correction for multiple testing was applied considering 22 independent tests, with the threshold for significance set at $P<0.0022$.

2.5. Linkage Disequilibrium assessment

To assess linkage disequilibrium (LD) between genotyped SNPs in the *NFAT5* gene we used the Haploview 4.2 software²³ and considered our genotyped control sample. We considered that SNPs were in high linkage disequilibrium if $r^2 > 0.9$.

3. FUNCTIONAL EFFECT OF ASSOCIATED SNPs

3.1. Effect of SNP variants on the regulation of gene expression by microRNAs using a reporter system

All associated SNPs were predicted to have a functional effect on microRNA binding by the SNP Function Prediction software. We first checked if those microRNAs had validated target sites in the predicted regions of *NFAT5* 3'UTR region using DIANA-TarBase (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/>). To assess potential functional effect of these SNPs we further checked with other programs: mrSNP (<http://mrsnp.osu.edu/>), mirSNP (<http://202.38.126.151/hmdd/mirsnp/search/>) and miRdSNP (<http://mirdsnp.ccr.buffalo.edu/>). Only SNPs rs1437134 and rs11641233 showed consistent predictions and seemed to alter hsa-mir-509-5p and hsa-miR-649 binding, respectively. Additionally, TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) predicted binding of hsa-mir-509-5p and hsa-miR-649 to the genomic regions corresponding to SNPs rs1437134 and rs11641233, respectively.

We used a luciferase reporter system to test the effect of rs1437134 and rs11641233 on *NFAT5* gene expression. We used the pmirGLO Dual-Luciferase microRNA Target Expression Vector (Promega, Madison, WI, USA) to clone the 3'UTR regions containing the SNPs. This vector allows the evaluation of microRNA binding to the predicted sites by cloning the microRNA target region 3' from the firefly luciferase gene (*luc2*), which is the primary reporter gene. The vector also contains the Renilla luciferase gene (hRLuc-neo) to normalize expression.

The regions containing the SNPs rs1437134 and rs11641233 were amplified by PCR in heterozygous individuals using the following primers containing the restriction sites *NheI* and *XbaI* (underlined): rs1437134 primers 5'-ACACGCTAGCTGACTGCAAAGAGCACACC-3' and 5'-ACAATCTAGAAGGAATTGCGCCTAGGAA-3', and rs11641233 primers 5'-ACACGCTAGCTTTTTAAATTAATTAGCTTTCCTCTGC-3' and 5'-AGAATCTAGATGGGACCATCCACAAATGAT-3' (Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO, USA). PCR products were purified using PCR-Illustra GFX PCR and Gel Band purification kit (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA). PCR fragments and pmirGLO Dual-Luciferase microRNA Target Expression Vector were digested with *NheI* and *XbaI* and the Cut Smart buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) for 3 hours at 37°C. The vector was dephosphorylated with the Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Promega, Madison, WI, USA) for 15 minutes at 37°C and inactivated during 15 minutes at 65 °C. Ligation was performed at 16°C O/N with the DNA ligation kit

version 2.1 (Takara Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) considering a 3:1 insert:vector molecular proportion. Ligation was transformed in Subcloning Efficiency™ DH5α™ Competent Cells (Invitrogen™, Paisley, Scotland, UK) following manufacturer's recommendations. Plasmidic DNA extraction was performed with the High Pure Plasmid Isolation Kit and Genopure Plasmid Midi-Kit (Roche Life Sciences, Branford, CT, USA). Sanger sequencing was performed using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The following constructs were obtained: pmiRGLO–rs1437134A, pmiRGLO–rs1437134G, pmiRGLO–rs11641233C and pmiRGLO–rs11641233T.

The microRNAs genes hsa-miR-509-1 and hsa-miR-649 were obtained as clones into the pCMV-MIR vector (OriGene, Rockville, MD, USA), which contains a GFP reporter for transfection. All clones used in the study were sequenced in full to confirm their integrity.

Experiments were performed in HeLa and in SH-SY5Y cells, which were previously discarded to be contaminated with mycoplasma with the kit Mycoplasma gel detection kit (Biotools B&M Labs S.A., Madrid, Spain). HeLa cells were cultured in 12-well plates with DMEM, 10% FBS and 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco, Life technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37 °C. For each condition we always co-transfected two constructs in a 1:1 molecular ratio considering 530 ng for all pmiRGLO constructs and 470 ng for all microRNAs constructs. When the pmiRGLO constructs were not cotransfected with a microRNA construct we used 250 ng of pmax GFP vector (Lonza, Basel, Switzerland). Each well plate was transfected with 3 μl Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen™, Paisley, Scotland, UK) and the following constructs: a) pmiR-Glo and pmax GFP, b) pmiR-Glo and pCMV-hsa-miR-509-1, c) pmiR-Glo – rs1437134>A and pmax GFP, d) pmiR-Glo – rs1437134>A and pCMV-hsa-miR-509-1, e) pmiR-Glo – rs1437134>G and pmax GFP, f) pmiR-Glo – rs1437134>G and pCMV-hsa-miR-509-1, g) pmiR-Glo and pCMV-hsa-miR-649, h) pmiR-Glo – rs11641233>C and pmax GFP, i) pmiR-Glo – rs11641233>C and pCMV-hsa-miR-649, j) pmiR-Glo – rs11641233>T and pmax GFP, k) pmiR-Glo – rs11641233>T and pCMV-hsa-miR-649. Five plate replicates were used for the experiment. Cells were retrieved 24 hours after transfection and washed with PBS twice. Cell lysates were obtained using the Passive Lysis Buffer (Promega, Madison, WI, USA) and were stored at -80°C.

In order to confirm the effect of rs1437134 on gene expression in another cell line, SH-SY5Y cells were cultured in 6-well plates as specified above (Page 1), without following differentiation protocol. For transfection we used the Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza, Basel, Switzerland) following the manufacturer's instructions. For each condition performed for rs1437134 (a-f, as detailed above), 2×10⁶ cells/well were transfected, and three experimental replicates were used for the experiments. Cells were also retrieved 24 hours after transfection and lysis was performed as described above.

Luciferase expression assays were performed by technical duplicates using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) and following the manufacturer's protocol for two injector luminometers. We used the luminometer Modulus Microplate Multimode Reader (Turner BioSystems, Sunnyvale, CA, USA). Relative luciferase expression (luciferase/renilla expression) of each allele was normalized to their corresponding control (pmiRGLO or pmiRGLO with the corresponding microRNA). Differences between conditions were evaluated using a U-Mann-Whitney non-parametric test, since normality was rejected using the Kolmogorov-Smirnov test (as expected given the small number of samples), and statistical significance was set at P<0.05 considering a two-sided test.

3.2. SNPs correlation with brain volume differences using brain imaging analysis

The Brain Imaging Genetics (BIG; <http://www.cognomics.nl>) study consists of healthy volunteers who participated in diverse small-scale studies at the Donders Centre for Cognitive Neuroimaging, Nijmegen, The Netherlands.²⁴ The present study included a subset of 1300 BIG subjects (744 females; mean age 22.9 (SD = 3.8)) who had undergone anatomical (T1-weighted) MRI scans and for whom genome-wide SNP genotype data were available.

MRI data were acquired using either 1.5 Tesla (n=645) or 3 Tesla (n=655) Siemens scanners (Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany). Details on scanning parameters and other neuroimaging procedures used in BIG are described in Guadalupe et al.²⁵ Automated parcellation of cerebral cortical regions was performed according to the Desikan atlas²⁶ using the FreeSurfer package.²⁷ Subcortical segmentations were also produced using FreeSurfer with the standard “-recon-all” processing pipeline and default parameters. Volumes were available for the following seven addiction associated brain structures²⁸: medial orbitofrontal cortex, prefrontal cortex (defined as superior frontal gyrus, rostral middle frontal gyrus, caudal middle frontal gyrus, inferior frontal gyrus, lateral and medial divisions of orbitofrontal cortex and frontal pole), and bilateral nucleus accumbens, putamen, caudate nucleus, hippocampus and insula. Ventral tegmental area (VTA), important in dopaminergic pathways of the reward system, could not be assessed. Estimates of total brain volume (TBV) were calculated as the voxel-wise sum of the gray matter and white matter probability maps produced by the VBM8 toolbox (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm/>), implemented in SPM8 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/>). Outliers more extreme than 3.5 SD from the mean were excluded from analysis.

Genotyping and imputation procedures performed in BIG are described in detail in Guadalupe et al.²⁹ In short, whole genome genotyping was done using the Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA). MACH software was used for haplotype phasing and minimac for the final imputation,^{30,31} with the 1000 Genomes Phase 1.v3 EUR reference panel.³² SNPs rs1437134, rs7359336, rs11641233, rs6499244 and rs12232410 were extracted from the data for the first stage of analysis using PLINK v1.07.³³ Since rs7359336 and rs6499244 were in strong linkage disequilibrium (LD) with rs1437134 ($r^2 > .9$), and rs12232410 was in strong LD with rs11641233 ($r^2 > .9$), only rs1437134 and rs11641233 ($r^2 = .207$) were included in the analysis. For a second gene-wide step of analysis, all available variants of the *NFAT5* gene were extracted, including a 100 kb flanking region to capture regulatory sequences. SNPs failing Hardy-Weinberg equilibrium test at a threshold of $P < 10^{-6}$, with minor allele frequency lower than 1% or with missingness rates higher than 5% were removed from the data. Participants with call rates lower than 95% were also excluded from analysis. For the gene-wide analysis, linkage disequilibrium pruned genotypes were used (r^2 threshold of .8). Eighty SNPs were left for analysis.

We carried out our analysis in two stages. First, associations of *NFAT5* SNPs rs1437134 and rs11641233 with volumes of prefrontal cortex, medial orbitofrontal cortex, nucleus accumbens, putamen, caudate nucleus, hippocampus and insula were assessed using linear regression as implemented in PLINK v1.07.³³ Results were considered significant at $P < 0.05$ divided by the number of structures and SNPs for each cohort ($P < 0.0036$). As a second step, the effect of common variants of *NFAT5* on the brain volumes was investigated using the statistical approach described by Bralten et al.³⁴ consisting of SNP-by-SNP linear regression and estimation of the effect of the whole gene. The BIG subjects scanned at 1.5 T were used as the discovery sample in all analyses and replication was attempted in the independent sample scanned at 3.0 T. In addition, the analyses were performed in the combined sample. All analyses were adjusted for gender, age and total brain volume. Field strength was added as a covariate for the combined analysis.

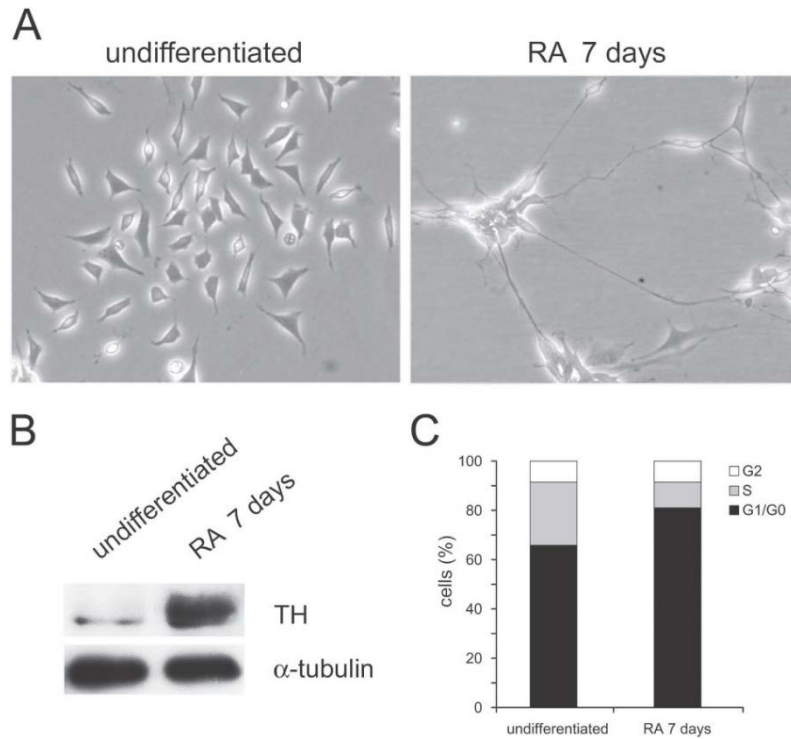
REFERENCES

1. Rodriguez-Pascau L, Gort L, Schuchman EH, Vilageliu L, Grinberg D, Chabas A. Identification and characterization of SMPD1 mutations causing Niemann-Pick types A and B in Spanish patients. *Hum Mutat* 2009; **30**: 1117-1122.
2. Van Dyke C, Barash PG, Jatlow P, Byck R. Cocaine: plasma concentrations after intranasal application in man. *Science* 1976; **191**: 859-861.
3. Jufer RA, Walsh SL, Cone EJ. Cocaine and metabolite concentrations in plasma during repeated oral administration: development of a human laboratory model of chronic cocaine use. *J Anal Toxicol* 1998; **22**: 435-444.
4. Stephens BG, Jentzen JM, Karch S, Mash DC, Wetli CV. Criteria for the interpretation of cocaine levels in human biological samples and their relation to the cause of death. *Am J Forensic Med Pathol* 2004; **25**: 1-10.

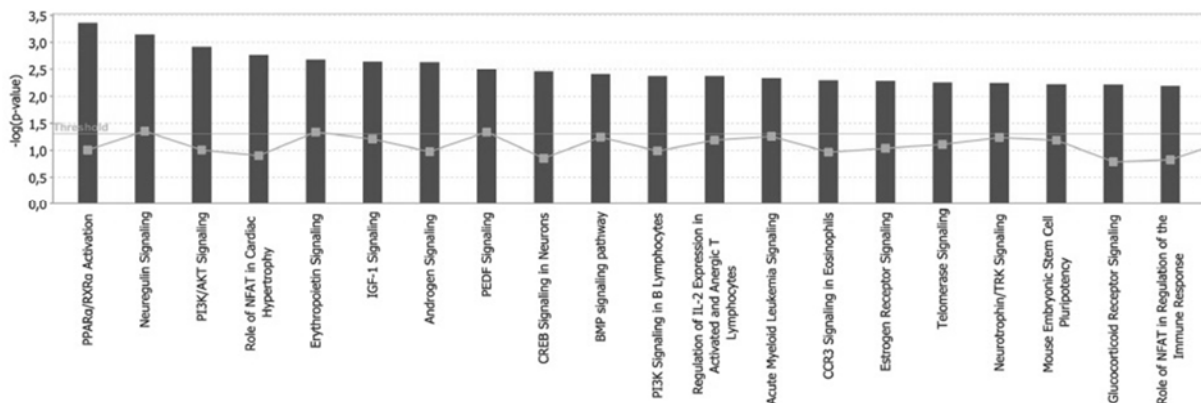
5. Ellenhorn MJ, Barceloux DG. *Medical toxicology* Elsevier: New York, 1988, 644-661pp.
6. Jatlow P. Cocaine: analysis, pharmacokinetics, and metabolic disposition. *Yale J Biol Med* 1988; **61**: 105-113.
7. Paly D, Jatlow P, Van Dyke C, Jeri FR, Byck R. Plasma cocaine concentrations during cocaine paste smoking. *Life Sci* 1982; **30**: 731-738.
8. Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN *et al.* Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 1997; **386**: 827-830.
9. Fowler JS, Volkow ND, Wolf AP, Dewey SL, Schlyer DJ, Macgregor RR *et al.* Mapping cocaine binding sites in human and baboon brain in vivo. *Synapse* 1989; **4**: 371-377.
10. Crawford FC, Wood ML, Wilson SE, Mathura VS, Hollen TR, Geall F *et al.* Cocaine induced inflammatory response in human neuronal progenitor cells. *J Neurochem* 2006; **97**: 662-674.
11. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S *et al.* Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; **5**: R80.
12. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U *et al.* Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; **4**: 249-264.
13. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; **3**: Article3.
14. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003; **4**: P3.
15. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; **4**: 44-57.
16. Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 2005; **33**: W741-748.
17. First M, Spitzer R, Gibbon M, JBW W. *Structured Clinical Interview for DSM-IV disorders (SCID-IV)*. Washington, DC: American Psychiatric Press.1997.
18. Roncero C, Daigre C, Barral C, Ros-Cucurull E, Grau-Lopez L, Rodriguez-Cintas L *et al.* Neuroticism associated with cocaine-induced psychosis in cocaine-dependent patients: a cross-sectional observational study. *PLoS One* 2014; **9**: e106111.
19. Fernandez-Castillo N, Roncero C, Grau-Lopez L, Barral C, Prat G, Rodriguez-Cintas L *et al.* Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence. *Genes Brain Behav* 2013; **12**: 39-46.
20. Drgon T, Zhang PW, Johnson C, Walther D, Hess J, Nino M *et al.* Genome wide association for addiction: replicated results and comparisons of two analytic approaches. *PLoS One* 2010; **5**: e8832.
21. Skol AD, Scott LJ, Abecasis GR, Boehnke M. Joint analysis is more efficient than replication-based analysis for two-stage genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006; **38**: 209-213.
22. Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X *et al.* SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; **23**: 644-645.
23. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; **21**: 263-265.
24. Franke B, Vasquez AA, Veltman JA, Brunner HG, Rijpkema M, Fernandez G. Genetic variation in CACNA1C, a gene associated with bipolar disorder, influences brainstem rather than gray matter volume in healthy individuals. *Biol Psychiatry* 2010; **68**: 586-588.
25. Guadalupe T, Zwiers MP, Wittfeld K, Teumer A, Vasquez AA, Hoogman M *et al.* Asymmetry within and around the human planum temporale is sexually dimorphic and influenced by genes involved in steroid hormone receptor activity. *Cortex* 2015; **62**: 41-55.
26. Desikan RS, Segonne F, Fischl B, Quinn BT, Dickerson BC, Blacker D *et al.* An automated labeling system for subdividing the human cerebral cortex on MRI scans into gyral based regions of interest. *Neuroimage* 2006; **31**: 968-980.
27. Fischl B, Salat DH, Busa E, Albert M, Dieterich M, Haselgrove C *et al.* Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron* 2002; **33**: 341-355.

28. Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: brain circuits and treatment strategies. *Neuropharmacology* 2004; **47 Suppl 1**: 3-13.
29. Guadalupe T, Zwiers MP, Teumer A, Wittfeld K, Vasquez AA, Hoogman M *et al.* Measurement and genetics of human subcortical and hippocampal asymmetries in large datasets. *Hum Brain Mapp* 2014; **35**: 3277-3289.
30. Howie BN, Donnelly P, Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet* 2009; **5**: e1000529.
31. Li Y, Willer CJ, Ding J, Scheet P, Abecasis GR. MaCH: using sequence and genotype data to estimate haplotypes and unobserved genotypes. *Genet Epidemiol* 2010; **34**: 816-834.
32. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM *et al.* A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; **467**: 1061-1073.
33. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 559-575.
34. Bralten J, Arias-Vasquez A, Makkinje R, Veltman JA, Brunner HG, Fernandez G *et al.* Association of the Alzheimer's gene SORL1 with hippocampal volume in young, healthy adults. *Am J Psychiatry* 2011; **168**: 1083-1089.

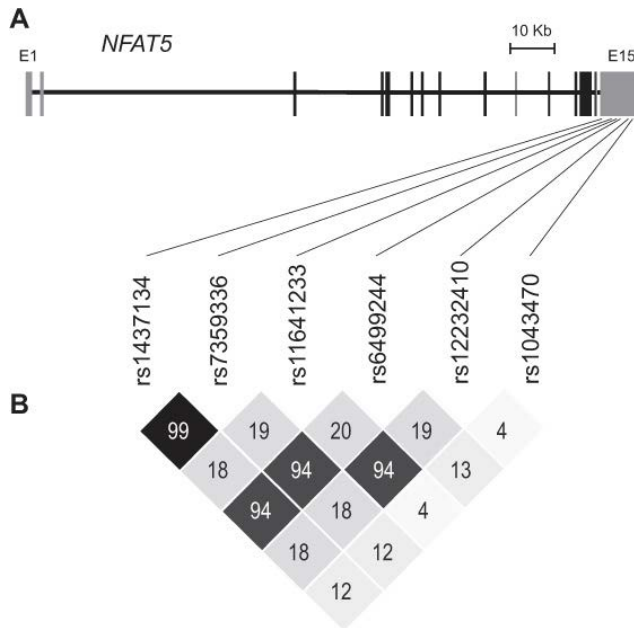
SUPPLEMENTARY FIGURES



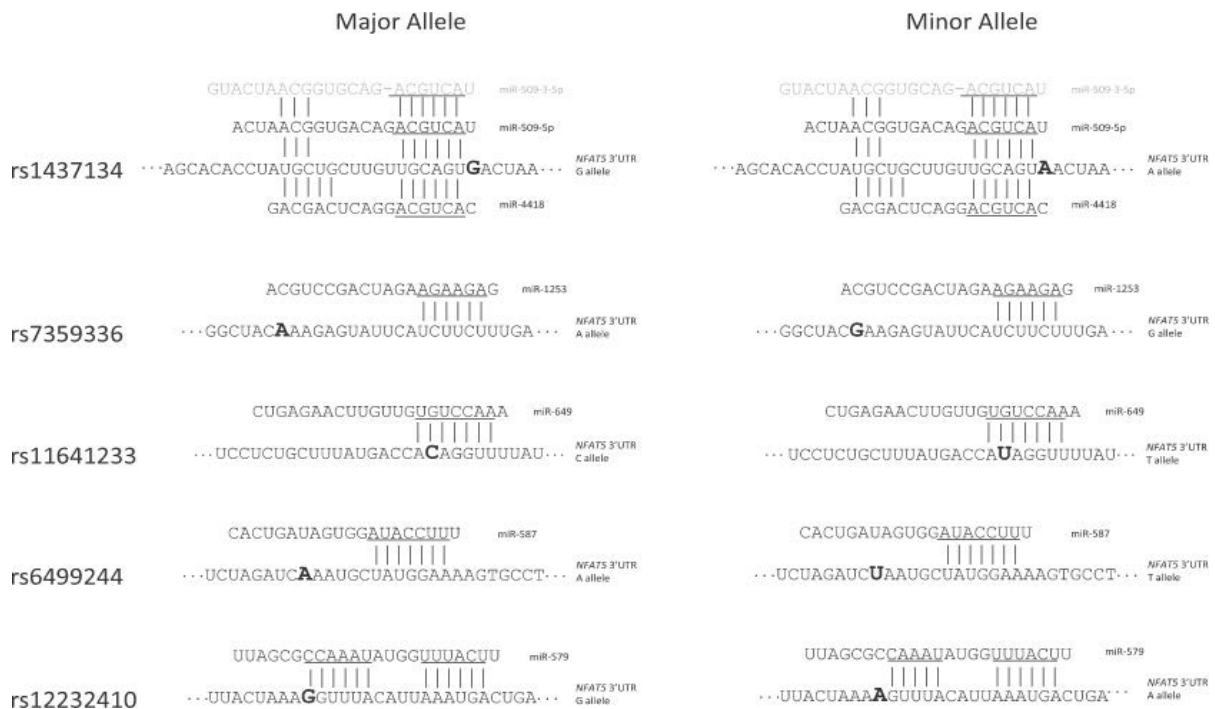
Supplementary Figure 1. SH-SY5Y differentiation with retinoic acid (RA) during 7 days. A) Neuron-like morphological changes observed in cultured cells after differentiation, including neurite outgrowth. B) Expression of tyrosine hydroxylase (TH) as a dopamine neuronal marker by Western blot. C) Cell cycle arrest in G0/G1.



Supplementary Figure 2. Canonical pathways enriched in the differentially expressed genes identified 6 hours after exposure of SH-SY5Y RA-differentiated cells to 5 μ M cocaine.

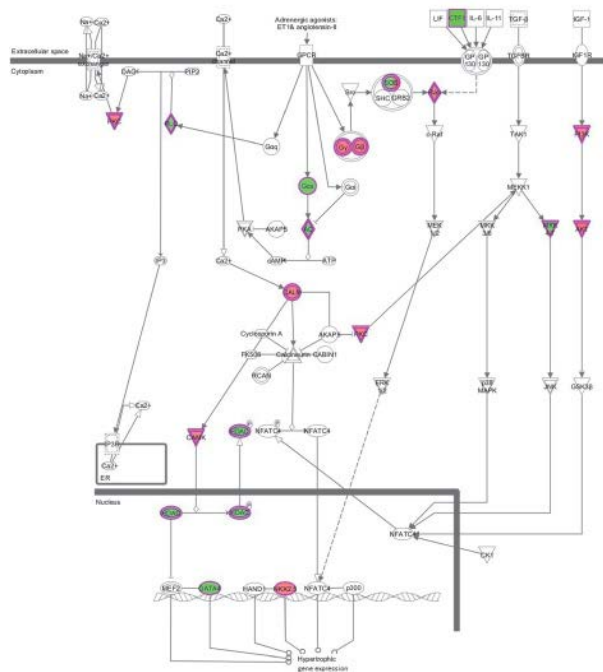


Supplementary Figure 3. Linkage disequilibrium among the genotyped SNPs of the *NFAT5* gene. On top, schematic representation of the *NFAT5* gene. Boxes indicate exons, with the untranslated regions in grey. The six SNPs included in the study are shown on top. Linkage disequilibrium plot of the six SNPs according to Haploview showing r^2 values. Considering the Confidence Interval algorithm⁷³, three SNPs are located in one block in high LD (rs1437134, rs7359336 and rs6499244) and two SNPs lie in another block (rs11641233 and rs12232410), also in high LD in our control sample.

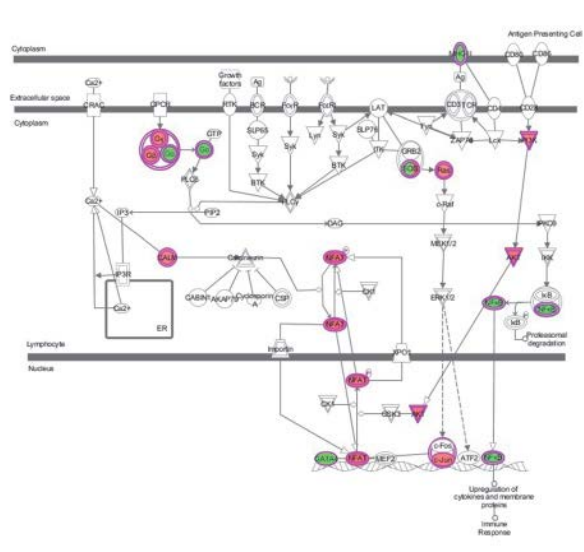


Supplementary Figure 4. Associated SNPs and effect on microRNA binding. Sequence alignments of the SNPs associated with cocaine dependence showing their predicted binding to microRNA molecules by TargetScan. Both alleles of each SNP are shown, indicated in bold, and the seed region of the microRNAs is underlined.

A The role of NFAT in cardiac hypertrophy



B The role of NFAT in the regulation of the immune response



Supplementary Figure 5. NFAT canonical pathways enriched in the differentially expressed genes identified 6 hours after exposure to 5 μ M cocaine. A) The canonical pathway “Role of NFAT in cardiac hypertrophy”. B) The canonical pathway “Role of NFAT in the regulation of the immune response”. The green and red nodes in the pathway indicate the down- and up-regulated genes, respectively, induced 6 hours after exposure to 5 μ M cocaine.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1. Descriptive characteristics of Spanish Caucasian individuals with cocaine dependence and controls		
	Cocaine dependence sample N = 806	Control sample N = 817
Gender N (%)		
Male	656 (81.4)	668 (81.8)
Female	150 (18.6)	149 (18.2)
Age (mean and SD)		
	35.7 ± 8.0	55.9 ± 15.9
Substance Dependence N (%)		
Total SD*		
Cocaine	806 (100)	-
Only cocaine dependence**	83 (10.3)	-
Alcohol	230 (28.6)	-
Cannabis	265 (32.9)	-
Opiates	165 (20.5)	-
Tobacco	595 (73.8)	-
Benzodiazepines	57 (7.1)	-
Amphetamines and metamphetamines	20 (2.5)	-
Ecstasy	12 (1.5)	-
Others	6 (0.7)	-
Psychotic symptoms N (%) Available data in 79.3% patients		
Presence	393 (48.8)	-
Absence	246 (30.5)	-

*Substance Dependence **Cocaine dependent patients without any other drug use, abuse or dependence but occasional alcohol use (not considering tobacco).

Supplementary Table 2. Descriptive characteristics of the Brain Imaging Genetics study (BIG; <http://www.cognomics.nl>) consisting of self-reported healthy adults

	Discovery sample (1.5 Tesla) N=645	Replication sample (3 Tesla) N=655	Complete sample N=1300
Gender N (%)			
Male	270 (41.9)	286 (43.7)	556 (42.8)
Female	375 (58.1)	369 (56.3)	744 (57.2)
Age (mean and SD)			
	23.12 ± 4.0	22.73 ± 3.6	22.73 ± 3.6
Total Brain Volume (mean and SD)			
TBV	1252.75 ± 112.8	1240.68 ± 117.6	1246.30 ± 114.6
Brain Volumes (mean and SD)			
Prefrontal cortex	154852.32* ± 15122.2	152827.84* ± 15871.8	153833.07* ± 15531.2
Insula	15021.29* ± 1652.8	14942.11* ± 1654.2	14981.36* ± 1653.3
Hippocampus	8810.20* ± 858.0	8994.33* ± 858.7	8902.91* ± 862.9
Nucleus accumbens	1067.48* ± 179.4	1098.29* ± 169.3	1083.03* ± 175.0
Caudate nucleus	8028.29* ± 970.9	8029.19* ± 954.0	8028.75* ± 962.1
Putamen	10959.71* ± 1265.5	11209.01* ± 1228.1	11085.32* ± 1252.5
Medial orbitofrontal cortex	11418.03* ± 1256.11	10771.15* ± 1239.4	11092.10* ± 1288.5

*mm³

Supplementary Table 3. Genes differentially expressed 6 hours after exposure of SH-SY5Y cells differentiated to dopaminergic neurons to 5 μ M cocaine

Probe	Gene symbol	Gene Name	P-value	Adj. P-value	5 – 0 μ M Fold Change
Up-regulated					
216450_x_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	1.73E-06	0.014	2.17
215992_s_at	RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	2.70E-06	0.014	1.57
224321_at	TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	3.39E-06	0.014	1.58
221088_s_at	PPP1R9A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	5.31E-06	0.014	1.74
209254_at	KIAA0265	KIAA0265 protein	5.47E-06	0.014	1.90
202773_s_at	SFRS8	splicing factor, arginine/serine-rich 8 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	6.16E-06	0.014	1.67
230629_s_at	EP400	E1A binding protein p400	6.40E-06	0.014	1.70
1558747_at	SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	6.43E-06	0.014	2.17
207937_x_at	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	7.67E-06	0.014	1.45
210943_s_at	LYST	lysosomal trafficking regulator	9.29E-06	0.015	1.59
215886_x_at	USP12	ubiquitin specific peptidase 12	1.06E-05	0.015	1.70
213328_at	NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1	1.09E-05	0.015	1.74
232940_s_at	MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	1.14E-05	0.015	1.48
238350_at	FLJ25778	hypothetical protein FLJ25778	1.14E-05	0.015	1.88
223578_x_at	PRO1073	PRO1073 protein	1.22E-05	0.015	2.21
209088_s_at	UBN1	ubiquitin 1	1.23E-05	0.015	1.49
232632_at	TSPAN3	tetraspanin 3	1.31E-05	0.015	1.82
209678_s_at	PRKCI	protein kinase C, iota	1.33E-05	0.015	1.37
227510_x_at	PRO1073	PRO1073 protein	1.41E-05	0.015	2.20
1555450_a_at	NARG1L	NMDA receptor regulated 1-like	1.55E-05	0.016	1.39
213494_s_at	YY1	YY1 transcription factor	1.85E-05	0.018	1.41
231735_s_at	PRO1073	PRO1073 protein	2.47E-05	0.021	1.47
240434_at	ABLIM2	actin binding LIM protein family, member 2	2.83E-05	0.022	1.38
208930_s_at	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	3.07E-05	0.023	1.54
204180_s_at	ZBTB43	zinc finger and BTB domain containing 43	4.04E-05	0.026	1.45
208232_x_at	NRG1	neuregulin 1	4.28E-05	0.027	1.59
1554740_a_at	IPP	intracisternal A particle-promoted polypeptide	4.51E-05	0.027	1.47
224030_s_at	FAM115A	family with sequence similarity 115, member A	4.53E-05	0.027	1.45
201340_s_at	ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	4.76E-05	0.028	1.67
203176_s_at	TFAM	transcription factor A, mitochondrial	5.63E-05	0.030	1.39
236371_s_at	TGS1	trimethylguanosine synthase homolog (S. cerevisiae)	6.00E-05	0.030	1.49
239898_x_at	ZNF286A	zinc finger protein 286A	6.24E-05	0.030	1.32
238536_at	LOC642236	similar to FRG1 protein (FSHD region gene 1 protein)	6.36E-05	0.030	1.33
237209_s_at	NFRKB	nuclear factor related to kappaB binding protein	6.67E-05	0.030	1.39
1555945_s_at	FAM120A	family with sequence similarity 120A	6.81E-05	0.030	1.33
242911_at	MED13L	mediator complex subunit 13-like	6.99E-05	0.030	1.51
202818_s_at	TCEB3	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kDa, elongin A)	7.04E-05	0.030	1.58
212451_at	KIAA0256	KIAA0256 gene product	7.34E-05	0.030	1.82
232021_at	GLT8D3	glycosyltransferase 8 domain containing 3	7.37E-05	0.030	1.67
227402_s_at	C8orf53	chromosome 8 open reading frame 53	7.45E-05	0.030	1.32
224568_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	7.76E-05	0.031	2.45
222027_at	NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	7.98E-05	0.031	1.78
225452_at	MED1	mediator complex subunit 1	9.36E-05	0.035	1.40
233985_x_at	PPP1R9A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	1.00E-04	0.037	1.35
239022_at	SDHALP2	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein pseudogene 2	1.03E-04	0.037	1.74
205184_at	GNG4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	1.09E-04	0.037	1.34
213812_s_at	CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta	1.09E-04	0.037	1.32
214600_at	TEAD1	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	1.10E-04	0.037	1.66
1558173_a_at	LUZP1	leucine zipper protein 1	1.11E-04	0.037	1.58
213971_s_at	SUZ12P	suppressor of zeste 12 homolog pseudogene	1.11E-04	0.037	1.28
205315_s_at	SNTB2	syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 2)	1.15E-04	0.037	1.35
204964_s_at	SSPN	sarcospan (Kras oncogene-associated gene)	1.15E-04	0.037	1.47

208844_at	VDAC3	voltage-dependent anion channel 3	1.31E-04	0.040	1.29
212078_s_at	MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	1.36E-04	0.041	1.35
213281_at	JUN	jun oncogene	1.51E-04	0.041	1.42
227514_at	LOC162073	hypothetical protein LOC162073	1.53E-04	0.041	1.43
220342_x_at	EDEM3	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	1.55E-04	0.041	1.50
1559548_at	ACVR2B	activin A receptor, type IIB	1.57E-04	0.041	1.41
243295_at	RBM27	RNA binding motif protein 27	1.58E-04	0.041	1.50
202412_s_at	USP1	ubiquitin specific peptidase 1	1.58E-04	0.041	1.46
212420_at	ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	1.58E-04	0.041	1.74
208664_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1.60E-04	0.041	1.52
209433_s_at	PPAT	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	1.65E-04	0.042	1.39
208325_s_at	AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	1.72E-04	0.042	1.60
215220_s_at	TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	1.74E-04	0.042	1.70
214474_at	PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	1.78E-04	0.042	1.61
200702_s_at	DDX24	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	1.81E-04	0.043	1.32
227039_at	AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	1.91E-04	0.044	1.56
242617_at	TMED8	transmembrane emp24 protein transport domain containing 8	1.96E-04	0.044	1.23
201831_s_at	USO1	USO1 homolog, vesicle docking protein (yeast)	1.97E-04	0.044	1.61
1555913_at	GON4L	gon-4-like (C. elegans)	1.99E-04	0.044	1.47
212649_at	DHX29	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29	2.11E-04	0.045	1.59
203532_x_at	CUL5	cullin 5	2.15E-04	0.046	1.37
240105_at	C21orf66	chromosome 21 open reading frame 66	2.21E-04	0.046	1.80
233368_s_at	RBJ	rab and DnaJ domain containing	2.22E-04	0.046	1.57
222508_s_at	ARGLU1	arginine and glutamate rich 1	2.25E-04	0.046	1.70
222387_s_at	VPS35	vacuolar protein sorting 35 homolog (S. cerevisiae)	2.29E-04	0.046	1.47
214693_x_at	NBPF1	neuroblastoma breakpoint family, member 1	2.30E-04	0.046	1.71
224693_at	C20orf108	chromosome 20 open reading frame 108	2.30E-04	0.046	1.30
207188_at	CDK3	cyclin-dependent kinase 3	2.32E-04	0.046	1.34
1555765_a_at	GNG4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	2.47E-04	0.048	1.38
239002_at	ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	2.50E-04	0.048	1.70
203833_s_at	TGOLN2	trans-golgi network protein 2	2.58E-04	0.049	1.63
200607_s_at	RAD21	RAD21 homolog (S. pombe)	2.67E-04	0.049	1.32
210172_at	SF1	splicing factor 1	2.67E-04	0.049	2.17
229010_at	CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence	2.73E-04	0.049	1.74
233559_s_at	WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1	2.83E-04	0.050	1.63
1557910_at	HSP90AB1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	2.85E-04	0.050	1.44
236957_at	CDCA2	cell division cycle associated 2	3.01E-04	0.052	1.83
211993_at	WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1	3.03E-04	0.052	1.58
216449_x_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	3.05E-04	0.052	1.43
212492_s_at	JMJD2B	jumonji domain containing 2B	3.07E-04	0.052	1.49
235598_at	SMAD2	SMAD family member 2	3.08E-04	0.052	1.34
223505_s_at	RBJ	rab and DnaJ domain containing	3.13E-04	0.052	1.27
214900_at	ZKSCAN1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	3.17E-04	0.052	1.45
227152_at	C12orf35	chromosome 12 open reading frame 35	3.18E-04	0.052	1.52
214052_x_at	BAT2D1	BAT2 domain containing 1	3.25E-04	0.053	1.54
57739_at	DND1	dead end homolog 1 (zebrafish)	3.47E-04	0.054	1.22
201793_x_at	SMG7	Smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)	3.49E-04	0.054	1.35
201085_s_at	SON	SON DNA binding protein	3.50E-04	0.054	1.40
208879_x_at	PRPF6	PRP6 pre-mRNA processing factor 6 homolog (S. cerevisiae)	3.56E-04	0.055	1.65
239046_at	TAF1B	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, 63kDa	3.65E-04	0.055	1.57
241419_at	ARHGAP1	Rho GTPase activating protein 1	3.66E-04	0.055	1.25
222946_s_at	C1orf135	chromosome 1 open reading frame 135	3.67E-04	0.055	1.33
201615_x_at	CALD1	caldesmon 1	3.72E-04	0.055	1.50
221734_at	PRRC1	proline-rich coiled-coil 1	3.75E-04	0.056	1.42
1554249_a_at	ZNF638	zinc finger protein 638	3.83E-04	0.056	1.64
235266_at	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	3.89E-04	0.056	1.51
214659_x_at	YLPM1	YLP motif containing 1	3.89E-04	0.056	1.35
222626_at	RBM26	RNA binding motif protein 26	4.03E-04	0.056	1.43
223940_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	4.12E-04	0.057	2.02
200598_s_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	4.13E-04	0.057	1.43
201072_s_at	SMARCC1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1	4.22E-04	0.057	1.36
205187_at	SMAD5	SMAD family member 5	4.26E-04	0.058	1.55

Resultats capítol 4. Article 5

226898_s_at	SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	4.31E-04	0.058	1.74
201101_s_at	BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	4.38E-04	0.058	1.46
220764_at	PPP4R2	protein phosphatase 4, regulatory subunit 2	4.44E-04	0.058	1.36
201702_s_at	PPP1R10	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 10	4.58E-04	0.059	1.55
227101_at	ZNF800	zinc finger protein 800	4.69E-04	0.059	1.52
216941_s_at	TAF1B	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, 63kDa	4.71E-04	0.059	1.27
240119_at	TEPP	testis/prostate/placenta-expressed protein	4.72E-04	0.059	1.28
226422_at	ERGIC2	ERGIC and golgi 2	4.72E-04	0.059	1.20
31637_s_at	NR1D1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	4.94E-04	0.060	1.27
230477_at	LOC147299	hypothetical protein LOC147299	4.96E-04	0.060	1.23
212926_at	SMC5	structural maintenance of chromosomes 5	4.97E-04	0.060	1.56
223888_s_at	LARS	leucyl-tRNA synthetase	4.98E-04	0.060	1.92
213875_x_at	C6orf62	chromosome 6 open reading frame 62	5.08E-04	0.061	1.23
208178_x_at	TRIO	triple functional domain (PTPRF interacting)	5.12E-04	0.061	1.36
90265_at	CENTA1	centaurin, alpha 1	5.16E-04	0.061	1.24
201208_s_at	TNFAIP1	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	5.20E-04	0.061	1.36
201879_at	ARIH1	ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (Drosophila)	5.25E-04	0.061	1.39
1554977_at	LOC198437	bA299N6.3	5.26E-04	0.061	1.43
1552978_a_at	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	5.27E-04	0.061	1.63
217826_s_at	UBE2J1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J1 (UBC6 homolog, yeast)	5.34E-04	0.061	1.37
213998_s_at	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	5.38E-04	0.061	1.78
203056_s_at	PRDM2	PR domain containing 2, with ZNF domain	5.40E-04	0.061	1.81
223577_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	5.42E-04	0.061	1.40
223028_s_at	SNX9	sorting nexin 9	5.48E-04	0.061	1.38
217644_s_at	SOS2	son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	5.61E-04	0.061	1.92
214305_s_at	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	5.62E-04	0.061	1.61
202323_s_at	ACBD3	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3	5.71E-04	0.061	1.33
223038_s_at	FAM60A	family with sequence similarity 60, member A	5.71E-04	0.061	1.23
221016_s_at	TCF7L1	transcription factor 7-like 1 (T-cell specific, HMG-box)	5.72E-04	0.061	1.27
37793_r_at	RAD51L3	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	5.74E-04	0.061	1.39
201730_s_at	TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	5.80E-04	0.061	1.34
212208_at	MED13L	mediator complex subunit 13-like	5.83E-04	0.061	1.33
231272_at	MED7	mediator complex subunit 7	5.84E-04	0.061	1.45
220219_s_at	LRRRC37A3	leucine rich repeat containing 37, member A3	5.91E-04	0.061	1.27
1554633_a_at	MYT1L	myelin transcription factor 1-like	5.91E-04	0.061	1.49
236408_at	KLHDC5	kelch domain containing 5	5.93E-04	0.061	1.44
223984_s_at	NUPL1	nucleoporin like 1	5.95E-04	0.061	1.41
200841_s_at	EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	5.98E-04	0.061	1.65
201728_s_at	KIAA0100	KIAA0100	6.03E-04	0.061	1.39
236665_at	CCDC18	coiled-coil domain containing 18	6.03E-04	0.061	1.65
215434_x_at	NBPF10	neuroblastoma breakpoint family, member 10	6.14E-04	0.061	1.70
219769_at	INCENP	inner centromere protein antigens 135/155kDa	6.17E-04	0.061	1.37
226173_at	TBC1D25	TBC1 domain family, member 25	6.18E-04	0.061	1.19
218006_s_at	ZNF22	zinc finger protein 22 (KOX 15)	6.23E-04	0.061	1.28
212758_s_at	ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	6.25E-04	0.061	1.40
235977_at	LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2	6.25E-04	0.061	1.53
1554512_a_at	CCDC123	coiled-coil domain containing 123	6.32E-04	0.061	1.24
223818_s_at	RSF1	remodeling and spacing factor 1	6.38E-04	0.062	1.41
242722_at	LMO7	LIM domain 7	6.45E-04	0.062	2.13
215155_at	HEXA	hexosaminidase A (alpha polypeptide)	6.45E-04	0.062	1.25
239270_at	PLCXD3	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3	6.49E-04	0.062	1.36
211086_x_at	NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1	6.56E-04	0.062	1.46
218745_x_at	TMEM161A	transmembrane protein 161A	6.62E-04	0.062	1.25
200956_s_at	SSRP1	structure specific recognition protein 1	6.63E-04	0.062	1.28
216962_at	OR5T2	olfactory receptor, family 5, subfamily T, member 2	6.66E-04	0.062	1.27
1558045_a_at	LOC441528	hypothetical protein LOC441528	6.66E-04	0.062	1.30
236481_at	FAH	fumarylacetoacetate hydrolase (fumarylacetoacetase)	6.94E-04	0.063	1.29
1553672_at	ENAH	enabled homolog (Drosophila)	6.97E-04	0.063	1.40
212620_at	ZNF609	zinc finger protein 609	7.12E-04	0.064	1.30
224311_s_at	CAB39	calcium binding protein 39	7.25E-04	0.064	1.59
231953_at	BPTF	bromodomain PHD finger transcription factor	7.34E-04	0.064	1.37
224563_at	WASF4	WAS protein family, member 4	7.34E-04	0.064	1.44
208610_s_at	SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2	7.36E-04	0.064	1.51

214313_s_at	EIF5B	eukaryotic translation initiation factor 5B	7.41E-04	0.064	1.47
236254_at	VPS13B	vacuolar protein sorting 13 homolog B (yeast)	7.42E-04	0.064	1.36
244110_at	MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	7.53E-04	0.065	1.25
226643_s_at	NUDCD2	NudC domain containing 2	7.55E-04	0.065	1.41
223879_s_at	OXR1	oxidation resistance 1	7.63E-04	0.065	1.40
228628_at	SRGAP2P1	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2 pseudogene 1	7.64E-04	0.065	1.24
1557227_s_at	TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	7.69E-04	0.065	2.06
238800_s_at	ZCCHC6	zinc finger, CCHC domain containing 6	7.79E-04	0.066	1.33
222704_at	POLR1A	polymerase (RNA) I polypeptide A, 194kDa	7.88E-04	0.066	1.19
206232_s_at	B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6	7.90E-04	0.066	1.58
235833_at	PPAT	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	7.96E-04	0.066	1.30
209127_s_at	SART3	squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3	8.02E-04	0.066	1.25
224854_s_at	SLAIN2	SLAIN motif family, member 2	8.03E-04	0.066	1.35
201683_x_at	TOX4	TOX high mobility group box family member 4	8.09E-04	0.066	1.34
1564002_a_at	C6orf199	chromosome 6 open reading frame 199	8.10E-04	0.066	1.43
1558942_at	ZNF813	zinc finger protein 813	8.16E-04	0.066	1.28
241820_at	RIF1	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	8.28E-04	0.066	1.54
35160_at	LDB1	LIM domain binding 1	8.37E-04	0.066	1.23
237741_at	SLC25A36	solute carrier family 25, member 36	8.59E-04	0.067	1.67
209013_x_at	TRIO	triple functional domain (PTPRF interacting)	8.66E-04	0.068	1.31
213963_s_at	SAP30	Sin3A-associated protein, 30kDa	8.74E-04	0.068	1.25
201294_s_at	WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	8.82E-04	0.068	1.45
242135_at	LOC642236	similar to FRG1 protein (FSHD region gene 1 protein)	8.90E-04	0.069	1.26
242609_x_at	ADCK4	aarF domain containing kinase 4	8.97E-04	0.069	1.43
1554873_at	CSPP1	centrosome and spindle pole associated protein 1	8.98E-04	0.069	1.42
220223_at	ATAD5	ATPase family, AAA domain containing 5	9.01E-04	0.069	1.30
235376_at	USP4	ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)	9.08E-04	0.069	1.63
229081_at	SLC25A13	solute carrier family 25, member 13 (citrin)	9.08E-04	0.069	1.29
232127_at	CLCN5	chloride channel 5 (nephrolithiasis 2, X-linked, Dent disease)	9.08E-04	0.069	1.52
230180_at	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	9.16E-04	0.069	2.58
1560599_a_at	CCDC123	coiled-coil domain containing 123	9.19E-04	0.069	1.41
244224_x_at	LYNX1	Ly6/neurotoxin 1	9.36E-04	0.069	1.36
208503_s_at	GATAD1	GATA zinc finger domain containing 1	9.60E-04	0.070	1.20
230000_at	RNF213	ring finger protein 213	9.63E-04	0.070	1.39
218521_s_at	UBE2W	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)	9.75E-04	0.070	1.39
210461_s_at	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	9.76E-04	0.070	1.47
1559108_at	VPS53	vacuolar protein sorting 53 homolog (S. cerevisiae)	9.80E-04	0.071	1.50
219393_s_at	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	9.85E-04	0.071	1.54
226365_at	LOC728555	hypothetical LOC728555	9.93E-04	0.071	1.36
220794_at	GREM2	gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	9.94E-04	0.071	1.46
221960_s_at	RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family	9.95E-04	0.071	1.71
206578_at	NKX2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)	9.97E-04	0.071	1.35
221976_s_at	HDGFRP3	hepatoma-derived growth factor, related protein 3	1.01E-03	0.071	1.68
224853_at	SLAIN2	SLAIN motif family, member 2	1.02E-03	0.071	1.38
222850_s_at	DNAJB14	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 14	1.03E-03	0.071	1.33
1554084_a_at	NOL9	nucleolar protein 9	1.03E-03	0.071	1.34
212382_at	TCF4	transcription factor 4	1.04E-03	0.071	1.34
223134_at	BBX	bobby sox homolog (Drosophila)	1.07E-03	0.073	1.24
201711_x_at	RANBP2	RAN binding protein 2	1.09E-03	0.074	1.31
1557388_at	RTTN	rotatin	1.10E-03	0.075	1.42
226919_at	LYRM2	LYR motif containing 2	1.11E-03	0.075	1.33
208900_s_at	TOP1	topoisomerase (DNA) I	1.11E-03	0.075	1.48
225476_at	BAT4	HLA-B associated transcript 4	1.12E-03	0.075	1.27
224227_s_at	BDP1	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	1.13E-03	0.076	1.82
203589_s_at	TFDP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	1.16E-03	0.076	1.23
201679_at	ARS2	arsenate resistance protein 2	1.17E-03	0.076	1.29
227171_at	CCT4	chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	1.18E-03	0.076	1.38
216493_s_at	IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	1.18E-03	0.076	1.79
242635_s_at	NAPEPLD	N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D	1.19E-03	0.077	1.23
1558046_x_at	LOC441528	hypothetical protein LOC441528	1.22E-03	0.078	1.26
244486_at	PINK1	PTEN induced putative kinase 1	1.22E-03	0.078	1.25
217777_s_at	PTPLAD1	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	1.23E-03	0.078	1.39
219858_s_at	FLJ20160	FLJ20160 protein	1.23E-03	0.078	1.36
219998_at	HSPC159	galectin-related protein	1.23E-03	0.078	1.36

Resultats capítol 4. Article 5

212763_at	CAMSAP1L1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1	1.24E-03	0.078	1.60
228563_at	GJC1	gap junction protein, gamma 1, 45kDa	1.24E-03	0.078	1.32
1555360_a_at	DNAJC11	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 11	1.25E-03	0.078	1.39
201446_s_at	TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	1.25E-03	0.078	1.32
213623_at	KIF3A	kinesin family member 3A	1.26E-03	0.078	1.19
206668_s_at	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	1.26E-03	0.078	1.36
205787_x_at	RP11-74E24.2	zinc finger CCCH-type domain-containing pseudogene	1.27E-03	0.078	1.76
222463_s_at	BACE1	beta-site APP-cleaving enzyme 1	1.29E-03	0.079	1.33
1559808_at	PLEC1	plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa	1.29E-03	0.079	1.28
224517_at	POLR2J4	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J, 13.3kDa pseudogene	1.29E-03	0.079	1.51
230546_at	VASH1	vasohibin 1	1.30E-03	0.079	1.35
224335_s_at	BACE1	beta-site APP-cleaving enzyme 1	1.30E-03	0.079	1.57
230071_at	SEPT11	septin 11	1.32E-03	0.079	1.34
221279_at	GDAP1	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	1.34E-03	0.079	1.44
232218_at	C9orf119	chromosome 9 open reading frame 119	1.34E-03	0.079	1.20
220295_x_at	DEPDC1	DEP domain containing 1	1.34E-03	0.079	1.71
209669_s_at	SERBP1	SERPINE1 mRNA binding protein 1	1.34E-03	0.079	1.18
218554_s_at	ASH1L	ash1 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	1.35E-03	0.079	1.31
236769_at	LOC158402	hypothetical protein LOC158402	1.35E-03	0.079	1.27
209136_s_at	USP10	ubiquitin specific peptidase 10	1.35E-03	0.079	1.60
201070_x_at	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	1.35E-03	0.079	1.56
222404_x_at	PTPLAD1	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1	1.35E-03	0.079	1.18
219158_s_at	NARG1	NMDA receptor regulated 1	1.36E-03	0.079	1.34
214955_at	TMPRSS6	transmembrane protease, serine 6	1.38E-03	0.079	1.31
1557370_s_at	MYCBP2	MYC binding protein 2	1.40E-03	0.079	1.30
239833_at	COMMD1	copper metabolism (Murr1) domain containing 1	1.40E-03	0.079	1.54
204121_at	GADD45G	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma	1.40E-03	0.079	1.28
1558924_s_at	CLIP1	CAP-GLY domain containing linker protein 1	1.42E-03	0.079	1.73
225640_at	LOC401504	hypothetical gene supported by AK091718	1.42E-03	0.079	1.26
235003_at	UHMK1	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	1.42E-03	0.079	1.83
238966_at	BRUNOL4	bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)	1.43E-03	0.080	1.31
207661_s_at	SH3PXD2A	SH3 and PX domains 2A	1.44E-03	0.080	1.20
233080_s_at	PRPF40A	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (S. cerevisiae)	1.45E-03	0.080	1.28
209920_at	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	1.45E-03	0.080	1.37
229570_at	LAMA5	laminin, alpha 5	1.45E-03	0.080	1.25
219024_at	PLEKHA1	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1	1.46E-03	0.080	1.32
216554_s_at	MBNL1	muscleblind-like (Drosophila)	1.50E-03	0.081	1.44
221052_at	TDRKH	tudor and KH domain containing	1.50E-03	0.081	1.25
205809_s_at	WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like	1.51E-03	0.081	1.60
1556222_at	RP11-291L22.2	similar to cell division cycle 10	1.51E-03	0.081	1.34
200907_s_at	PALLD	palladin, cytoskeletal associated protein	1.54E-03	0.082	1.28
205188_s_at	SMAD5	SMAD family member 5	1.55E-03	0.082	1.77
213119_at	SLC36A1	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 1	1.59E-03	0.083	1.20
1569472_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1.60E-03	0.083	1.79
1553106_at	C5orf24	chromosome 5 open reading frame 24	1.62E-03	0.083	1.93
219507_at	RSRC1	arginine/serine-rich coiled-coil 1	1.62E-03	0.083	1.41
221276_s_at	SYNC1	syncoilin, intermediate filament 1	1.63E-03	0.083	1.23
1552274_at	PXK	PX domain containing serine/threonine kinase	1.64E-03	0.083	1.37
241955_at	HECTD1	HECT domain containing 1	1.64E-03	0.083	1.62
1555125_at	C21orf66	chromosome 21 open reading frame 66	1.65E-03	0.083	1.39
202028_s_at	RPL38	ribosomal protein L38	1.65E-03	0.083	1.32
1555272_at	LOC728194	radial spoke head 10 homolog B (Chlamydomonas)-like	1.66E-03	0.083	1.31
219576_at	MAP7D3	MAP7 domain containing 3	1.66E-03	0.083	1.25
1563321_s_at	MLLT10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10	1.67E-03	0.083	1.40
202132_at	WWTR1	WW domain containing transcription regulator 1	1.68E-03	0.083	1.37
219387_at	CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	1.68E-03	0.083	1.48
212332_at	RBL2	retinoblastoma-like 2 (p130)	1.69E-03	0.083	1.43
1552812_a_at	SENP1	SUMO1/sentrin specific peptidase 1	1.70E-03	0.083	1.41
242762_s_at	KIAA1946	KIAA1946	1.73E-03	0.084	1.40
223222_at	SLC25A19	solute carrier family 25 (mitochondrial thiamine pyrophosphate carrier), member 19	1.75E-03	0.084	1.18
227918_s_at	ZYG11B	zyg-11 homolog B (C. elegans)	1.75E-03	0.084	1.39
208003_s_at	NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	1.77E-03	0.085	1.56
238831_at	TMEM33	transmembrane protein 33	1.78E-03	0.085	1.68

203784_s_at	DDX28	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 28	1.79E-03	0.085	1.29
1567906_at	SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4	1.79E-03	0.085	1.34
1558251_a_at	ZNF587	zinc finger protein 587	1.81E-03	0.085	1.21
216997_x_at	TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)	1.82E-03	0.085	1.59
206667_s_at	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	1.82E-03	0.085	1.71
1557595_at	GINS2	GINS complex subunit 2 (Psf2 homolog)	1.84E-03	0.085	1.24
225965_at	DDHD1	DDHD domain containing 1	1.84E-03	0.085	1.41
1558641_at	LOC202051	hypothetical protein LOC202051	1.85E-03	0.085	1.22
206538_at	MRAS	muscle RAS oncogene homolog	1.85E-03	0.085	1.24
236506_at	NIN	ninein (GSK3B interacting protein)	1.87E-03	0.085	1.29
208744_x_at	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	1.87E-03	0.085	1.47
224589_at	XIST	X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)	1.88E-03	0.085	1.35
1554159_a_at	ZMYND11	zinc finger, MYND domain containing 11	1.88E-03	0.085	1.53
219717_at	C4orf30	chromosome 4 open reading frame 30	1.89E-03	0.085	1.41
223254_s_at	KIAA1333	KIAA1333	1.89E-03	0.085	1.49
1553107_s_at	C5orf24	chromosome 5 open reading frame 24	1.89E-03	0.085	1.24
241611_s_at	FNDC3A	fibronectin type III domain containing 3A	1.90E-03	0.085	1.58
228067_at	C2orf55	chromosome 2 open reading frame 55	1.91E-03	0.085	1.27
225852_at	ANKRD17	ankyrin repeat domain 17	1.94E-03	0.086	1.26
1567213_at	PNN	pinin, desmosome associated protein	1.94E-03	0.086	1.40
235653_s_at	THAP6	THAP domain containing 6	1.95E-03	0.086	1.48
226967_at	FIZ1	FLT3-interacting zinc finger 1	1.97E-03	0.086	1.24
203348_s_at	ETV5	ets variant gene 5 (ets-related molecule)	1.99E-03	0.087	1.20
210214_s_at	BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	1.99E-03	0.087	1.40
238474_at	NUP43	nucleoporin 43kDa	1.99E-03	0.087	1.38
221524_s_at	RRAGD	Ras-related GTP binding D	2.00E-03	0.087	1.24
214451_at	TFAP2B	transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2 beta)	2.00E-03	0.087	1.19
228673_s_at	EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4	2.00E-03	0.087	1.63
224631_at	ZFP91	zinc finger protein 91 homolog (mouse)	2.01E-03	0.087	1.21
242787_at	INCENP	inner centromere protein antigens 135/155kDa	2.03E-03	0.087	1.18
212808_at	NFATC2IP	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 interacting protein	2.05E-03	0.088	1.38
1557385_at	FLJ13305	hypothetical protein FLJ13305	2.06E-03	0.088	1.36
216609_at	TXN	thioredoxin	2.09E-03	0.088	1.23
213926_s_at	HRB	HIV-1 Rev binding protein	2.10E-03	0.088	1.57
228688_at	FANCF	Fanconi anemia, complementation group F	2.13E-03	0.089	1.33
202044_at	GRLF1	glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	2.15E-03	0.089	1.17
203609_s_at	ALDH5A1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1 (succinate-semialdehyde dehydrogenase)	2.16E-03	0.089	1.42
239202_at	RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	2.16E-03	0.089	1.33
208629_s_at	HADHA	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), alpha subunit	2.17E-03	0.089	1.25
235173_at	MBNL1	muscleblind-like (Drosophila)	2.17E-03	0.089	1.24
228250_at	FNIP1	folliculin interacting protein 1	2.18E-03	0.089	1.40
201723_s_at	GALNT1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1)	2.20E-03	0.089	1.26
238608_at	LAMB1	laminin, beta 1	2.21E-03	0.089	1.33
206536_s_at	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis	2.22E-03	0.089	1.54
211580_s_at	PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)	2.23E-03	0.089	1.32
231999_at	ANKRD11	ankyrin repeat domain 11	2.23E-03	0.089	1.27
206500_s_at	C14orf106	chromosome 14 open reading frame 106	2.24E-03	0.089	1.76
213189_at	DKFZp667G2110	hypothetical protein DKFZp667G2110	2.29E-03	0.090	1.21
232913_at	TMED8	transmembrane emp24 protein transport domain containing 8	2.32E-03	0.091	1.36
211085_s_at	STK4	serine/threonine kinase 4	2.33E-03	0.091	1.47
243132_at	APTX	apratxin	2.34E-03	0.091	1.24
1555892_s_at	LOC253039	hypothetical protein LOC253039	2.35E-03	0.091	1.30
213826_s_at	H3F3A	H3 histone, family 3A	2.36E-03	0.091	1.31
213763_at	HIPK2	homeodomain interacting protein kinase 2	2.38E-03	0.092	1.37
212374_at	FEM1B	fem-1 homolog b (C. elegans)	2.41E-03	0.092	1.25
204183_s_at	ADRBK2	adrenergic, beta, receptor kinase 2	2.46E-03	0.094	1.21
1568877_a_at	ACBD5	acyl-Coenzyme A binding domain containing 5	2.48E-03	0.094	1.48
241702_at	HNRPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)	2.50E-03	0.095	1.57
201183_s_at	CHD4	chromodomain helicase DNA binding protein 4	2.51E-03	0.095	1.19
214941_s_at	PRPF40A	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (S. cerevisiae)	2.51E-03	0.095	1.17
218210_at	FN3KRP	fructosamine-3-kinase-related protein	2.52E-03	0.095	1.16

Resultats capítol 4. Article 5

239978_at	PITPNB	phosphatidylinositol transfer protein, beta	2.52E-03	0.095	1.53
235551_at	WDR4	WD repeat domain 4	2.55E-03	0.095	1.36
236613_at	RBM25	RNA binding motif protein 25	2.55E-03	0.095	1.37
232013_at	C9orf102	chromosome 9 open reading frame 102	2.58E-03	0.096	1.49
236557_at	ZBTB38	zinc finger and BTB domain containing 38	2.58E-03	0.096	1.31
221683_s_at	CEP290	centrosomal protein 290kDa	2.59E-03	0.096	1.31
209257_s_at	SMC3	structural maintenance of chromosomes 3	2.60E-03	0.096	1.23
213957_s_at	CEP350	centrosomal protein 350kDa	2.62E-03	0.096	1.55
201593_s_at	ZC3H15	zinc finger CCCH-type containing 15	2.62E-03	0.096	1.15
212007_at	UBXD2	UBX domain containing 2	2.64E-03	0.096	1.34
229571_at	CALM2	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	2.64E-03	0.096	1.46
204999_s_at	ATF5	activating transcription factor 5	2.65E-03	0.096	1.25
242828_at	FIGN	fidgetin	2.66E-03	0.096	1.22
241871_at	CAMK4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	2.69E-03	0.097	1.28
231011_at	LARP2	La ribonucleoprotein domain family, member 2	2.69E-03	0.097	1.42
206240_s_at	ZNF136	zinc finger protein 136	2.72E-03	0.097	1.20
211871_x_at	GNB5	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	2.72E-03	0.097	1.39
1553755_at	NXNL1	nucleoredoxin-like 1	2.74E-03	0.097	1.36
221705_s_at	SIKE	suppressor of IKK epsilon	2.74E-03	0.097	1.74
202631_s_at	APPBP2	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	2.74E-03	0.097	1.30
217094_s_at	ITCH	itchy E3 ubiquitin protein ligase homolog (mouse)	2.75E-03	0.097	1.18
204047_s_at	PHACTR2	phosphatase and actin regulator 2	2.75E-03	0.097	1.53
230226_s_at	JARID1A	jumonji, AT rich interactive domain 1A	2.76E-03	0.097	1.33
1554907_a_at	HYDIN	hydrocephalus inducing homolog (mouse)	2.77E-03	0.097	1.21
204077_x_at	ENTPD4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	2.79E-03	0.097	1.29
201914_s_at	SEC63	SEC63 homolog (S. cerevisiae)	2.81E-03	0.097	1.18
216804_s_at	PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	2.81E-03	0.097	1.38
214248_s_at	TRIM2	tripartite motif-containing 2	2.81E-03	0.097	1.27
230443_at	NHP2L1	NHP2 non-histone chromosome protein 2-like 1 (S. cerevisiae)	2.83E-03	0.097	1.29
221765_at	UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	2.84E-03	0.097	1.81
243857_at	MORF4L2	mortality factor 4 like 2	2.84E-03	0.097	1.63
217560_at	GGA1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1	2.91E-03	0.098	1.29
230887_at	CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae)	2.91E-03	0.098	1.29
236108_at	KIAA1632	KIAA1632	2.93E-03	0.098	1.27
215682_at	LOC440792	proline dehydrogenase (oxidase) 1 pseudogene	2.94E-03	0.098	1.18
224775_at	IWS1	IWS1 homolog (S. cerevisiae)	2.95E-03	0.098	1.50
223653_x_at	BRUNOL4	bruno-like 4, RNA binding protein (Drosophila)	2.95E-03	0.098	1.39
1552680_a_at	CASC5	cancer susceptibility candidate 5	2.96E-03	0.098	1.40
218211_s_at	MLPH	melanophilin	2.96E-03	0.098	1.28
1564467_at	FLJ13305	hypothetical protein FLJ13305	2.96E-03	0.098	1.26
1557128_at	FAM111B	family with sequence similarity 111, member B	2.97E-03	0.098	1.86
203653_s_at	COIL	coilin	2.97E-03	0.098	1.33
242349_at	HECTD1	HECT domain containing 1	2.99E-03	0.098	1.55
1568680_s_at	YTHDC2	YTH domain containing 2	3.00E-03	0.098	1.44
1553252_a_at	BRWD3	bromodomain and WD repeat domain containing 3	3.01E-03	0.098	1.73
211515_s_at	RIPK5	receptor interacting protein kinase 5	3.01E-03	0.098	1.38
217234_s_at	EZR	ezrin	3.01E-03	0.098	1.34
230313_at	TK2	thymidine kinase 2, mitochondrial	3.02E-03	0.098	1.32
212307_s_at	OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)	3.04E-03	0.098	1.49
1558533_at	KRBA2	KRAB-A domain containing 2	3.04E-03	0.098	1.17
236251_at	ITGAV	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	3.05E-03	0.098	1.66
210239_at	IRX5	iroquois homeobox 5	3.06E-03	0.099	1.38
209024_s_at	SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	3.08E-03	0.099	1.40
244055_at	RYR3	ryanodine receptor 3	3.09E-03	0.099	1.37
219066_at	PPCDC	phosphopantothencysteine decarboxylase	3.13E-03	0.099	1.20
Down-regulated					
215778_x_at	HAB1	B1 for mucin	1.05E-07	0.003	-1.88
216289_at	GPR144	G protein-coupled receptor 144	2.29E-06	0.014	-1.51
214316_x_at	CALR	calreticulin	6.58E-06	0.014	-1.76
238199_x_at	LOC440552	OK/SW-cl.16	7.43E-06	0.014	-1.90
244656_at	RASL10B	RAS-like, family 10, member B	2.32E-05	0.021	-1.76
229561_at	LRRC16B	leucine rich repeat containing 16B	2.38E-05	0.021	-1.43
213177_at	MAPK8IP3	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	2.51E-05	0.021	-1.44
239446_x_at	DCBLD2	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	2.69E-05	0.022	-1.95

240686_x_at	TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	3.29E-05	0.024	-1.62
213754_s_at	PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1	3.51E-05	0.025	-1.37
230929_s_at	UBE2J2	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	3.82E-05	0.026	-1.63
208730_x_at	RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family	3.98E-05	0.026	-1.43
214174_s_at	PDLIM4	PDZ and LIM domain 4	4.85E-05	0.028	-1.39
225587_at	TMEM129	transmembrane protein 129	5.22E-05	0.029	-1.36
229747_x_at	MGC40489	hypothetical protein MGC40489	5.62E-05	0.030	-1.71
210782_x_at	GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	6.01E-05	0.030	-1.40
207914_x_at	EVX1	even-skipped homeobox 1	6.10E-05	0.030	-1.41
221890_at	ZNF335	zinc finger protein 335	6.62E-05	0.030	-1.25
235186_at	LOC388692	hypothetical gene supported by AK123662	6.75E-05	0.030	-1.49
200639_s_at	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	8.24E-05	0.032	-1.38
209648_x_at	SOCS5	suppressor of cytokine signaling 5	9.05E-05	0.035	-1.44
214403_x_at	SPDEF	SAM pointed domain containing ets transcription factor	1.07E-04	0.037	-1.35
231846_at	FOXRED2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2	1.14E-04	0.037	-1.33
227738_s_at	ARMC5	armadillo repeat containing 5	1.20E-04	0.038	-1.39
241346_at	ARHGAP30	Rho GTPase activating protein 30	1.26E-04	0.039	-1.29
213225_at	PPM1B	protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform	1.33E-04	0.041	-1.37
212925_at	C19orf21	chromosome 19 open reading frame 21	1.38E-04	0.041	-1.35
208420_x_at	SUPT6H	suppressor of Ty 6 homolog (S. cerevisiae)	1.47E-04	0.041	-1.30
223851_s_at	TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	1.48E-04	0.041	-1.35
33760_at	PEX14	peroxisomal biogenesis factor 14	1.50E-04	0.041	-1.27
203852_s_at	SMN1	survival of motor neuron 1, telomeric	1.53E-04	0.041	-1.51
227781_x_at	FAM57B	family with sequence similarity 57, member B	1.60E-04	0.041	-1.45
220561_at	IGF2AS	insulin-like growth factor 2 antisense	1.72E-04	0.042	-1.46
232683_s_at	PARP6	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 6	1.75E-04	0.042	-1.24
203488_at	LPHN1	latrophilin 1	1.76E-04	0.042	-1.23
231268_at	LOC645895	hypothetical LOC645895	1.92E-04	0.044	-1.48
201783_s_at	RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3, p65 (avian)	1.99E-04	0.044	-1.23
241669_x_at	PRKD2	protein kinase D2	2.08E-04	0.045	-1.81
221869_at	ZNF512B	zinc finger protein 512B	2.09E-04	0.045	-1.42
221136_at	GDF2	growth differentiation factor 2	2.09E-04	0.045	-1.44
225229_at	AFF4	AF4/FMR2 family, member 4	2.20E-04	0.046	-1.27
235195_at	FBXW2	F-box and WD repeat domain containing 2	2.42E-04	0.048	-1.34
221141_x_at	EPN1	epsin 1	2.48E-04	0.048	-1.29
228744_at	CEP27	centrosomal protein 27kDa	2.65E-04	0.049	-1.38
209767_s_at	sep-05	septin 5	2.70E-04	0.049	-1.30
220173_at	C14orf45	chromosome 14 open reading frame 45	2.70E-04	0.049	-1.37
230073_at	DR1	down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)	2.73E-04	0.049	-1.46
227304_at	SMCR8	Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 8	2.79E-04	0.050	-1.28
212450_at	KIAA0256	KIAA0256 gene product	3.05E-04	0.052	-1.38
216180_s_at	SYNJ2	synaptojanin 2	3.07E-04	0.052	-1.30
222244_s_at	TUG1	taurine upregulated gene 1	3.23E-04	0.053	-1.27
218169_at	VAC14	Vac14 homolog (S. cerevisiae)	3.29E-04	0.053	-1.24
233734_s_at	OSBPL5	oxysterol binding protein-like 5	3.32E-04	0.053	-1.39
212553_at	KIAA0460	KIAA0460	3.32E-04	0.053	-1.29
223390_at	C9orf37	chromosome 9 open reading frame 37	3.49E-04	0.054	-1.27
204239_s_at	NNAT	neuronatin	3.61E-04	0.055	-1.25
217058_at	GNAS	GNAS complex locus	3.82E-04	0.056	-1.25
203379_at	RPS6KA1	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	3.93E-04	0.056	-1.29
228026_at	CSDE1	cold shock domain containing E1, RNA-binding	3.93E-04	0.056	-1.43
215949_x_at	IGHM	immunoglobulin heavy constant mu	3.95E-04	0.056	-1.42
217696_at	FUT7	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	4.03E-04	0.056	-1.36
222265_at	TNS4	tensin 4	4.04E-04	0.056	-1.34
207624_s_at	RPGR	retinitis pigmentosa GTPase regulator	4.17E-04	0.057	-1.26
220734_s_at	LOC727825	hypothetical LOC727825	4.22E-04	0.057	-1.25
209405_s_at	FAM3A	family with sequence similarity 3, member A	4.32E-04	0.058	-1.31
201990_s_at	CREBL2	cAMP responsive element binding protein-like 2	4.35E-04	0.058	-1.23
201407_s_at	PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	4.47E-04	0.058	-1.40
227644_at	RIMS4	regulating synaptic membrane exocytosis 4	4.47E-04	0.058	-1.28
229142_s_at	BBS1	Bardet-Biedl syndrome 1	4.53E-04	0.058	-1.32
229727_x_at	FAM148B	family with sequence similarity 148, member B	4.53E-04	0.058	-1.47
224501_at	C1orf170	chromosome 1 open reading frame 170	4.62E-04	0.059	-1.25
230576_at	BLOC1S3	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1, subunit 3	4.91E-04	0.060	-1.29

Resultats capítol 4. Article 5

212101_at	KPNA6	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	4.96E-04	0.060	-1.26
242402_x_at	CENTD1	centaurin, delta 1	5.22E-04	0.061	-1.52
58994_at	CC2D1A	coiled-coil and C2 domain containing 1A	5.23E-04	0.061	-1.27
204857_at	MAD1L1	MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	5.36E-04	0.061	-1.24
227095_at	LEPR	leptin receptor	5.42E-04	0.061	-1.32
243449_at	OSBP2	oxysterol binding protein 2	5.44E-04	0.061	-1.31
213447_at	SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	5.73E-04	0.061	-1.23
227820_at	TBC1D25	TBC1 domain family, member 25	5.84E-04	0.061	-1.32
221921_s_at	CADM3	cell adhesion molecule 3	5.90E-04	0.061	-1.31
209643_s_at	PLD2	phospholipase D2	6.00E-04	0.061	-1.22
207845_s_at	ANAPC10	anaphase promoting complex subunit 10	6.09E-04	0.061	-1.23
206813_at	CTF1	cardiotrophin 1	6.11E-04	0.061	-1.50
209472_at	CCBL2	cysteine conjugate-beta lyase 2	6.14E-04	0.061	-1.20
205516_x_at	CIZ1	CDKN1A interacting zinc finger protein 1	6.19E-04	0.061	-1.24
212019_at	RSL1D1	ribosomal L1 domain containing 1	6.42E-04	0.062	-1.38
209111_at	RNF5	ring finger protein 5	6.51E-04	0.062	-1.20
208924_at	RNF11	ring finger protein 11	6.68E-04	0.062	-1.26
214658_at	TICAM2	toll-like receptor adaptor molecule 2	6.69E-04	0.062	-1.32
217976_s_at	DYNC1L1	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 1	6.69E-04	0.062	-1.56
213296_at	RER1	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (S. cerevisiae)	6.75E-04	0.062	-1.22
220788_s_at	RNF31	ring finger protein 31	6.85E-04	0.063	-1.26
222235_s_at	CSGALNACT2	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	6.94E-04	0.063	-1.36
226704_at	UBE2J2	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	6.97E-04	0.063	-1.23
233337_s_at	SEZ6L2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2	6.98E-04	0.063	-1.19
218255_s_at	FBRS	fibrosin	7.15E-04	0.064	-1.25
208874_x_at	PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4	7.37E-04	0.064	-1.36
226673_at	SH2D3C	SH2 domain containing 3C	7.39E-04	0.064	-1.27
234256_at	SEBOX	SEBOX homeobox	7.48E-04	0.064	-1.25
208946_s_at	BECN1	beclin 1, autophagy related	7.95E-04	0.066	-1.22
208660_at	CS	citrate synthase	7.97E-04	0.066	-1.18
234918_at	GLTSCR2	glioma tumor suppressor candidate region gene 2	8.03E-04	0.066	-1.31
231850_x_at	KIAA1712	KIAA1712	8.04E-04	0.066	-1.34
214630_at	CYP11B2	cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2	8.12E-04	0.066	-1.40
227203_at	FBXL17	F-box and leucine-rich repeat protein 17	8.15E-04	0.066	-1.25
201321_s_at	SMARCC2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2	8.19E-04	0.066	-1.21
221988_at	MED26	mediator complex subunit 26	8.20E-04	0.066	-1.19
243766_s_at	TEAD2	TEA domain family member 2	8.25E-04	0.066	-1.31
203842_s_at	MAPRE3	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	8.32E-04	0.066	-1.38
219972_s_at	C14orf135	chromosome 14 open reading frame 135	8.72E-04	0.068	-1.37
240886_at	CASR	calcium-sensing receptor (hypocalciuric hypercalcemia 1, severe neonatal hyperparathyroidism)	9.03E-04	0.069	-1.27
219952_s_at	MCOLN1	mucolipin 1	9.21E-04	0.069	-1.27
230780_at	LOC730091	hypothetical protein LOC730091	9.23E-04	0.069	-1.36
239137_x_at	C6orf223	chromosome 6 open reading frame 223	9.29E-04	0.069	-1.26
213318_s_at	BAT3	HLA-B associated transcript 3	9.30E-04	0.069	-1.23
208405_s_at	CD164	CD164 molecule, sialomucin	9.37E-04	0.069	-1.28
201193_at	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	9.41E-04	0.069	-1.36
204569_at	ICK	intestinal cell (MAK-like) kinase	9.62E-04	0.070	-1.30
219908_at	DKK2	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	9.62E-04	0.070	-1.38
212705_x_at	PNPLA2	patatin-like phospholipase domain containing 2	9.99E-04	0.071	-1.36
218720_x_at	SEZ6L2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2	1.02E-03	0.071	-1.21
231835_at	C1orf93	chromosome 1 open reading frame 93	1.03E-03	0.071	-1.17
201139_s_at	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	1.03E-03	0.071	-1.30
217916_s_at	FAM49B	family with sequence similarity 49, member B	1.04E-03	0.071	-1.21
230228_at	LOC284297	hypothetical LOC284297	1.04E-03	0.071	-1.33
235433_at	APOOL	apolipoprotein O-like	1.06E-03	0.072	-1.22
215045_at	TNRC4	trinucleotide repeat containing 4	1.08E-03	0.073	-1.24
222604_at	GTF3C3	general transcription factor IIIC, polypeptide 3, 102kDa	1.12E-03	0.075	-1.31
224914_s_at	DNAJC14	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 14	1.13E-03	0.075	-1.18
33322_i_at	SFN	stratifin	1.14E-03	0.076	-1.35
209769_s_at	GP1BB	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	1.14E-03	0.076	-1.45
202778_s_at	ZMYM2	zinc finger, MYM-type 2	1.15E-03	0.076	-1.19
204945_at	PTPRN	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	1.16E-03	0.076	-1.23
213479_at	NPTX2	neuronal pentraxin II	1.17E-03	0.076	-1.37
228792_at	SLC24A5	solute carrier family 24, member 5	1.18E-03	0.076	-1.24
209595_at	GTF2F2	general transcription factor IIF, polypeptide 2, 30kDa	1.18E-03	0.076	-1.27

204159_at	CDKN2C	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	1.20E-03	0.077	-1.23
220465_at	FLJ12355	hypothetical protein FLJ12355	1.20E-03	0.077	-1.35
215038_s_at	SETD2	SET domain containing 2	1.21E-03	0.077	-1.31
234950_s_at	RFWD2	ring finger and WD repeat domain 2	1.24E-03	0.078	-1.23
205125_at	PLCD1	phospholipase C, delta 1	1.27E-03	0.078	-1.16
218911_at	YEATS4	YEATS domain containing 4	1.28E-03	0.079	-1.32
211837_s_at	PTCRA	pre T-cell antigen receptor alpha	1.34E-03	0.079	-1.32
212210_at	INTS1	integrator complex subunit 1	1.34E-03	0.079	-1.30
209490_s_at	PPT2	palmitoyl-protein thioesterase 2	1.35E-03	0.079	-1.20
206410_at	NR0B2	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	1.35E-03	0.079	-1.24
215857_at	NCLN	nicalin homolog (zebrafish)	1.36E-03	0.079	-1.27
218147_s_at	GLT8D1	glycosyltransferase 8 domain containing 1	1.36E-03	0.079	-1.25
218596_at	TBC1D13	TBC1 domain family, member 13	1.37E-03	0.079	-1.22
213149_at	DLAT	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	1.37E-03	0.079	-1.40
1555037_a_at	IDH1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	1.37E-03	0.079	-1.26
226372_at	CHST11	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11	1.38E-03	0.079	-1.39
54037_at	HPS4	Hermansky-Pudlak syndrome 4	1.39E-03	0.079	-1.20
224615_x_at	HM13	histocompatibility (minor) 13	1.41E-03	0.079	-1.20
211698_at	EID1	EP300 interacting inhibitor of differentiation 1	1.41E-03	0.079	-1.40
225125_at	TMEM32	transmembrane protein 32	1.41E-03	0.079	-1.20
202634_at	POLR2K	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K, 7.0kDa	1.42E-03	0.079	-1.20
226379_s_at	C19orf25	chromosome 19 open reading frame 25	1.42E-03	0.079	-1.22
218099_at	TEX2	testis expressed 2	1.45E-03	0.080	-1.20
202312_s_at	COL1A1	collagen, type I, alpha 1	1.45E-03	0.080	-1.30
211979_at	GPR107	G protein-coupled receptor 107	1.46E-03	0.080	-1.21
226686_at	CISD2	CDGSH iron sulfur domain 2	1.47E-03	0.080	-1.24
218311_at	MAP4K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	1.47E-03	0.080	-1.27
63009_at	SHQ1	SHQ1 homolog (S. cerevisiae)	1.47E-03	0.080	-1.21
201561_s_at	CLSTN1	calysntenin 1	1.48E-03	0.080	-1.26
222768_s_at	TRMT6	tRNA methyltransferase 6 homolog (S. cerevisiae)	1.48E-03	0.080	-1.20
224891_at	FOXO3	forkhead box O3	1.51E-03	0.081	-1.30
236737_at	C17orf56	chromosome 17 open reading frame 56	1.52E-03	0.081	-1.24
213360_s_at	POM121C	POM121 membrane glycoprotein C	1.52E-03	0.081	-1.18
223695_s_at	ARSD	arylsulfatase D	1.54E-03	0.082	-1.35
226074_at	PPM1M	protein phosphatase 1M (PP2C domain containing)	1.56E-03	0.082	-1.19
218487_at	ALAD	aminolevulinatase, delta-, dehydratase	1.56E-03	0.082	-1.26
1554202_x_at	CABP4	calcium binding protein 4	1.57E-03	0.082	-1.21
226492_at	SEMA6D	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D	1.57E-03	0.082	-1.64
215096_s_at	ESD	esterase D/formylglutathione hydrolase	1.57E-03	0.082	-1.18
1552789_at	TLOC1	translocation protein 1	1.58E-03	0.082	-1.29
212876_at	B4GALT4	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 4	1.58E-03	0.082	-1.28
200643_at	HDLBP	high density lipoprotein binding protein (vigilin)	1.59E-03	0.082	-1.35
211358_s_at	CIZ1	CDKN1A interacting zinc finger protein 1	1.60E-03	0.083	-1.19
1566177_at	CLYBL	citrate lyase beta like	1.60E-03	0.083	-1.25
209523_at	TAF2	TAF2 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 150kDa	1.63E-03	0.083	-1.26
208788_at	ELOVL5	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)	1.63E-03	0.083	-1.16
223342_at	RRM2B	ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)	1.64E-03	0.083	-1.28
230192_at	TRIM13	tripartite motif-containing 13	1.65E-03	0.083	-1.19
229546_at	LOC653602	hypothetical LOC653602	1.65E-03	0.083	-1.33
223084_s_at	CCNDBP1	cyclin D-type binding-protein 1	1.66E-03	0.083	-1.21
215354_s_at	PELP1	proline, glutamate and leucine rich protein 1	1.66E-03	0.083	-1.23
228876_at	BAIAP2L2	BAI1-associated protein 2-like 2	1.67E-03	0.083	-1.29
225585_at	RAP2A	RAP2A, member of RAS oncogene family	1.68E-03	0.083	-1.28
218196_at	OSTM1	osteopetrosis associated transmembrane protein 1	1.69E-03	0.083	-1.18
213105_s_at	C16orf42	chromosome 16 open reading frame 42	1.69E-03	0.083	-1.19
213044_at	ROCK1	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1	1.70E-03	0.083	-1.25
213885_at	TRIM3	tripartite motif-containing 3	1.71E-03	0.083	-1.19
244183_x_at	PCDHB3	protocadherin beta 3	1.71E-03	0.083	-1.23
216220_s_at	ADORA1	adenosine A1 receptor	1.74E-03	0.084	-1.30
216105_x_at	PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4	1.74E-03	0.084	-1.31
202806_at	DBN1	drebrin 1	1.75E-03	0.084	-1.15
220536_at	C14orf115	chromosome 14 open reading frame 115	1.77E-03	0.085	-1.26
212780_at	SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	1.79E-03	0.085	-1.17
209021_x_at	KIAA0652	KIAA0652	1.79E-03	0.085	-1.23

Resultats capítol 4. Article 5

202366_at	ACADS	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	1.79E-03	0.085	-1.21
208868_s_at	GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	1.79E-03	0.085	-1.25
231852_at	THEX1	three prime histone mRNA exonuclease 1	1.81E-03	0.085	-1.76
212507_at	TMEM131	transmembrane protein 131	1.82E-03	0.085	-1.23
201701_s_at	PGRMC2	progesterone receptor membrane component 2	1.83E-03	0.085	-1.26
219487_at	BBS10	Bardet-Biedl syndrome 10	1.83E-03	0.085	-1.31
201091_s_at	CBX3	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	1.84E-03	0.085	-1.24
224975_at	NFIA	nuclear factor I/A	1.85E-03	0.085	-1.67
224789_at	WDR40A	WD repeat domain 40A	1.85E-03	0.085	-1.19
212484_at	FAM89B	family with sequence similarity 89, member B	1.85E-03	0.085	-1.24
200948_at	MLF2	myeloid leukemia factor 2	1.86E-03	0.085	-1.18
225813_at	RC3H2	ring finger and CCCH-type zinc finger domains 2	1.86E-03	0.085	-1.20
1560475_at	LOC100129455	hypothetical protein LOC100129455	1.87E-03	0.085	-1.50
209176_at	SEC23IP	SEC23 interacting protein	1.87E-03	0.085	-1.20
229878_at	KIAA1731	KIAA1731	1.89E-03	0.085	-1.27
225900_at	EXOC6B	exocyst complex component 6B	1.89E-03	0.085	-1.56
229032_at	WSCD2	WSC domain containing 2	1.92E-03	0.085	-1.31
206267_s_at	MATK	megakaryocyte-associated tyrosine kinase	1.96E-03	0.086	-1.33
210758_at	PSIP1	PC4 and SFRS1 interacting protein 1	1.96E-03	0.086	-1.16
215596_s_at	ZNF294	zinc finger protein 294	1.97E-03	0.086	-1.34
214656_x_at	MYO1C	myosin IC	1.97E-03	0.086	-1.19
35179_at	B3GAT3	beta-1,3-glucuronyltransferase 3 (glucuronosyltransferase I)	2.01E-03	0.087	-1.22
228397_at	TUG1	taurine upregulated gene 1	2.03E-03	0.087	-1.27
201047_x_at	RAB6A	RAB6A, member RAS oncogene family	2.03E-03	0.087	-1.19
217931_at	CNPY3	canopy 3 homolog (zebrafish)	2.06E-03	0.088	-1.21
201025_at	EIF5B	eukaryotic translation initiation factor 5B	2.06E-03	0.088	-1.20
218522_s_at	MAP1S	microtubule-associated protein 1S	2.07E-03	0.088	-1.29
226976_at	KPNA6	karyopherin alpha 6 (importin alpha 7)	2.07E-03	0.088	-1.23
237855_at	ZNF777	zinc finger protein 777	2.08E-03	0.088	-1.21
242565_x_at	C21orf57	chromosome 21 open reading frame 57	2.08E-03	0.088	-1.27
221226_s_at	ACCN4	amiloride-sensitive cation channel 4, pituitary	2.09E-03	0.088	-1.46
231836_at	HKR1	GLI-Kruppel family member HKR1	2.10E-03	0.088	-1.24
226045_at	FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2	2.10E-03	0.088	-1.23
226053_at	MAP2K7	mitogen-activated protein kinase kinase 7	2.10E-03	0.088	-1.26
37831_at	SIPA1L3	signal-induced proliferation-associated 1 like 3	2.11E-03	0.088	-1.23
222861_x_at	FBXO2	F-box protein 2	2.11E-03	0.088	-1.24
218981_at	ACN9	ACN9 homolog (S. cerevisiae)	2.12E-03	0.088	-1.42
201455_s_at	NPEPPS	aminopeptidase puromycin sensitive	2.15E-03	0.089	-1.22
216490_x_at	LOC442175	similar to hCG1811681	2.15E-03	0.089	-1.21
1554175_at	CD300LB	CD300 molecule-like family member b	2.17E-03	0.089	-1.26
228677_s_at	FLJ21438	hypothetical protein FLJ21438	2.17E-03	0.089	-1.32
222010_at	ACAT2	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	2.18E-03	0.089	-1.17
1552811_at	WFIKK1	WAP, follistatin/kazal, immunoglobulin, kunitz and netrin domain containing 1	2.19E-03	0.089	-1.19
243309_at	FLJ27352	hypothetical LOC145788	2.20E-03	0.089	-1.20
213530_at	RAB3GAP1	RAB3 GTPase activating protein subunit 1 (catalytic)	2.21E-03	0.089	-1.22
219852_s_at	MORN1	MORN repeat containing 1	2.22E-03	0.089	-1.30
243463_s_at	RIT1	Ras-like without CAAX 1	2.23E-03	0.089	-1.17
202720_at	TES	testis derived transcript (3 LIM domains)	2.23E-03	0.089	-1.23
227621_at	WTAP	Wilms tumor 1 associated protein	2.24E-03	0.089	-1.30
1568986_x_at	PIGT	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class T	2.24E-03	0.090	-1.30
209717_at	EVI5	ecotropic viral integration site 5	2.27E-03	0.090	-1.20
203846_at	TRIM32	tripartite motif-containing 32	2.27E-03	0.090	-1.17
209874_x_at	CNNM2	cyclin M2	2.27E-03	0.090	-1.54
205517_at	GATA4	GATA binding protein 4	2.28E-03	0.090	-1.29
204660_at	GFER	growth factor, augments of liver regeneration (ERV1 homolog, S. cerevisiae)	2.28E-03	0.090	-1.34
243539_at	KIAA1841	KIAA1841	2.28E-03	0.090	-1.18
208336_s_at	GPSN2	glycoprotein, synaptic 2	2.31E-03	0.091	-1.22
217749_at	COPG	coatamer protein complex, subunit gamma	2.31E-03	0.091	-1.16
219096_at	ARMC7	armadillo repeat containing 7	2.31E-03	0.091	-1.20
239246_at	FARP1	FERM, RhoGEF (ARHGEF) and pleckstrin domain protein 1 (chondrocyte-derived)	2.32E-03	0.091	-1.18
236749_at	MNT	MAX binding protein	2.35E-03	0.091	-1.24
211240_x_at	CTNND1	catenin (cadherin-associated protein), delta 1	2.35E-03	0.091	-1.20
234846_at	DKFZp761P0212	hypothetical protein DKFZp761P0212	2.38E-03	0.092	-1.27
217937_s_at	HDAC7	histone deacetylase 7	2.39E-03	0.092	-1.26

1558530_at	LRTM2	leucine-rich repeats and transmembrane domains 2	2.40E-03	0.092	-1.29
222499_at	MRPS16	mitochondrial ribosomal protein S16	2.42E-03	0.092	-1.22
214594_x_at	ATP8B1	ATPase, class I, type 8B, member 1	2.42E-03	0.092	-1.58
202809_s_at	INTS3	integrator complex subunit 3	2.42E-03	0.092	-1.17
226222_at	KIAA1432	KIAA1432	2.42E-03	0.092	-1.21
212212_s_at	INTS1	integrator complex subunit 1	2.44E-03	0.093	-1.18
203871_at	SENP3	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3	2.47E-03	0.094	-1.16
203460_s_at	PSEN1	presenilin 1 (Alzheimer disease 3)	2.48E-03	0.094	-1.20
200945_s_at	SEC31A	SEC31 homolog A (S. cerevisiae)	2.50E-03	0.095	-1.16
220798_x_at	PRG2	plasticity-related gene 2	2.52E-03	0.095	-1.21
1560116_a_at	NEDD1	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1	2.53E-03	0.095	-1.23
202962_at	KIF13B	kinesin family member 13B	2.53E-03	0.095	-1.20
213500_at	COPB2	coatamer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)	2.53E-03	0.095	-1.18
1570241_at	SPATA21	spermatogenesis associated 21	2.54E-03	0.095	-1.29
201620_at	MBTPS1	membrane-bound transcription factor peptidase, site 1	2.59E-03	0.096	-1.18
224659_at	SEPN1	selenoprotein N, 1	2.60E-03	0.096	-1.22
223012_at	UBXD1	UBX domain containing 1	2.61E-03	0.096	-1.16
214077_x_at	MEIS3P1	Meis homeobox 3 pseudogene 1	2.61E-03	0.096	-1.23
235047_x_at	BTBD14B	BTB (POZ) domain containing 14B	2.63E-03	0.096	-1.29
218171_at	VPS4B	vacuolar protein sorting 4 homolog B (S. cerevisiae)	2.64E-03	0.096	-1.16
227546_x_at	CCNL2	cyclin L2	2.64E-03	0.096	-1.24
228084_at	PLA2G12A	phospholipase A2, group X1IA	2.65E-03	0.096	-1.21
205165_at	CELSR3	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 3 (flamingo homolog, Drosophila)	2.67E-03	0.096	-1.24
209610_s_at	SLC1A4	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	2.67E-03	0.096	-1.21
215942_s_at	GTSE1	G-2 and S-phase expressed 1	2.69E-03	0.097	-1.26
204525_at	PHF14	PHD finger protein 14	2.72E-03	0.097	-1.28
208141_s_at	DOHH	deoxyhypusine hydroxylase/monooxygenase	2.73E-03	0.097	-1.22
203419_at	MLL4	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 4	2.74E-03	0.097	-1.22
212782_x_at	POLR2J	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J, 13.3kDa	2.74E-03	0.097	-1.16
226274_at	CLCN5	chloride channel 5 (nephrolithiasis 2, X-linked, Dent disease)	2.75E-03	0.097	-1.18
218114_at	GGA1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1	2.77E-03	0.097	-1.19
202666_s_at	ACTL6A	actin-like 6A	2.78E-03	0.097	-1.22
217040_x_at	SOX15	SRY (sex determining region Y)-box 15	2.78E-03	0.097	-1.46
218446_s_at	FAM18B	family with sequence similarity 18, member B	2.78E-03	0.097	-1.27
241357_at	MAPK15	mitogen-activated protein kinase 15	2.80E-03	0.097	-1.25
227637_at	TFCP2	transcription factor CP2	2.82E-03	0.097	-1.23
200902_at	SEP15	15 kDa selenoprotein	2.82E-03	0.097	-1.26
203080_s_at	BAZ2B	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	2.83E-03	0.097	-1.17
238329_at	M-RIP	myosin phosphatase-Rho interacting protein	2.83E-03	0.097	-1.22
201784_s_at	C11orf58	chromosome 11 open reading frame 58	2.84E-03	0.097	-1.16
212567_s_at	MAP4	microtubule-associated protein 4	2.84E-03	0.097	-1.18
202359_s_at	SNX19	sorting nexin 19	2.85E-03	0.097	-1.22
211142_x_at	HLA-DOA	major histocompatibility complex, class II, DO alpha	2.88E-03	0.098	-1.20
31799_at	COPB2	coatamer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)	2.88E-03	0.098	-1.15
221626_at	ZNF506	zinc finger protein 506	2.91E-03	0.098	-1.21
212146_at	PLEKHM2	pleckstrin homology domain containing, family M (with RUN domain) member 2	2.91E-03	0.098	-1.19
235610_at	ALKBH8	alkB, alkylation repair homolog 8 (E. coli)	2.91E-03	0.098	-1.52
203389_at	KIF3C	kinesin family member 3C	2.91E-03	0.098	-1.17
214590_s_at	UBE2D1	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 1 (UBC4/5 homolog, yeast)	2.91E-03	0.098	-1.27
213251_at	SMARCA5	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5	2.92E-03	0.098	-1.19
209250_at	DEGS1	degenerative spermatocyte homolog 1, lipid desaturase (Drosophila)	2.93E-03	0.098	-1.15
210283_x_at	PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1	2.93E-03	0.098	-1.26
218239_s_at	GTPBP4	GTP binding protein 4	2.95E-03	0.098	-1.18
213348_at	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	2.96E-03	0.098	-1.26
226434_at	C7orf47	chromosome 7 open reading frame 47	2.97E-03	0.098	-1.14
202745_at	USP8	ubiquitin specific peptidase 8	2.97E-03	0.098	-1.18
204355_at	DHX30	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 30	2.98E-03	0.098	-1.17
211953_s_at	RANBP5	RAN binding protein 5	2.98E-03	0.098	-1.28
221992_at	LOC440348	similar to nuclear pore complex interacting protein	2.99E-03	0.098	-1.32
226225_at	MCC	mutated in colorectal cancers	3.01E-03	0.098	-1.45
226549_at	SBK1	SH3-binding domain kinase 1	3.03E-03	0.098	-1.27
222236_s_at	DDEF1	development and differentiation enhancing factor-like 1	3.03E-03	0.098	-1.18
218152_at	HMG20A	high-mobility group 20A	3.04E-03	0.098	-1.17

Resultats capítol 4. Article 5

212449_s_at	LYPLA1	lysophospholipase I	3.05E-03	0.098	-1.28
219488_at	A4GALT	alpha 1,4-galactosyltransferase (globotriaosylceramide synthase)	3.05E-03	0.098	-1.19
206169_x_at	ZC3H7B	zinc finger CCCH-type containing 7B	3.09E-03	0.099	-1.41
213521_at	PTPN18	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 18 (brain-derived)	3.09E-03	0.099	-1.44
201745_at	TWF1	twinfilin, actin-binding protein, homolog 1 (Drosophila)	3.10E-03	0.099	-1.19
229091_s_at	CCNJ	cyclin J	3.11E-03	0.099	-1.21
201519_at	TOMM70A	translocase of outer mitochondrial membrane 70 homolog A (S. cerevisiae)	3.11E-03	0.099	-1.25
203563_at	AFAP1	actin filament associated protein 1	3.13E-03	0.099	-1.20

Supplementary Table 4. Predicted targets for mir-124a in the subset of up-regulated genes 6h after exposure of SH-SY5Y cells differentiated to dopaminergic neurons to cocaine 5 μ M

hsa_TGCCTTA,MIR-124A target site enrichment: C=535; O=22; E=9.46; R=2.32; rawP=0.0002; adjP=0.0015				
User ID	Gene symbol	Gene Name	Entrez Gene	Ensembl
1553106_at 1553107_s_at	C5orf24	chromosome 5 open reading frame 24	134553	ENSG00000181904
217560_at	GGA1	golgi-associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1	26088	ENSG00000100083
214600_at	TEAD1	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	7003	ENSG00000187079
222463_s_at 224335_s_at	BACE1	beta-site APP-cleaving enzyme 1	23621	ENSG00000265969 ENSG00000186318
209127_s_at	SART3	squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells 3	9733	ENSG00000075856
219158_s_at	NAA15	N(alpha)-acetyltransferase 15, NatA auxiliary subunit	80155	ENSG00000164134
222508_s_at	ARGLU1	arginine and glutamate rich 1	55082	ENSG00000134884
1567213_at	PNN	pinin, desmosome associated protein	5411	ENSG00000100941
221734_at	PRRC1	proline-rich coiled-coil 1	133619	ENSG00000164244
239270_at	PLCXD3	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 3	345557	ENSG00000182836
200907_s_at	PALLD	palladin, cytoskeletal associated protein	23022	ENSG00000129116
233559_s_at	WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1	57590	ENSG00000085449
203532_x_at	CUL5	cullin 5	8065	ENSG00000166266
213957_s_at	CEP350	centrosomal protein 350kDa	9857	ENSG00000135837
219393_s_at	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	10000	ENSG00000117020
212307_s_at	OGT	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	8473	ENSG00000147162
230071_at	40787	septin 11	55752	ENSG00000138758
221276_s_at	SYNC	syncoilin, intermediate filament protein	81493	ENSG00000162520
203589_s_at	TFDP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	7029	ENSG00000114126
223984_s_at	NUPL1	nucleoporin like 1	9818	ENSG00000139496
211085_s_at	STK4	serine/threonine kinase 4	6789	ENSG00000101109
206232_s_at	B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6	9331	ENSG00000118276

Supplementary Table 5. Single-marker association study of 23 SNPs in 806 cocaine-dependent patients and 817 sex-matched unrelated controls

Locus	Marker	Predicted effect	Genotypes						Cases N (%)			HWE			Case-control association study		
			Controls N (%)			Cases			Sum	MAF	p-value	p-value	p-value ¹	Adj p-value ²	(OR -95%CI)		
			11	12	22	Sum	11	12								22	Sum
NFA15	rs1437134	miRNA binding	278 (34.2)	384 (47.3)	150 (18.5)	812	325 (40.5)	370 (46.1)	108 (13.4)	803	0.363	0.368	0.879	0.00118 [§]	0.00031 [§]	1.27 (1.10-1.45)*	
	rs7359336	miRNA binding	278 (34.1)	366 (47.3)	152 (18.6)	816	321 (40.2)	369 (46.2)	109 (13.6)	799	0.365	0.369	0.879	0.00141 [§]	0.00035 [§]	1.25 (1.09-1.45)*	
	rs11641233	miRNA binding	516 (63.2)	264 (32.3)	37 (4.5)	817	461 (57.5)	266 (35.7)	55 (6.9)	802	0.227	0.670	0.254	0.00734	0.02599	1.25 (1.06-1.47)	
	rs6499244	miRNA binding	264 (32.4)	360 (47.9)	161 (19.8)	815	293 (36.5)	365 (48.0)	124 (15.5)	802	0.416	0.434	0.941	0.0156	0.00474	1.37 (1.03-1.37)*	
	rs12232410	miRNA binding	516 (63.3)	262 (32.1)	37 (4.5)	815	463 (57.5)	266 (35.8)	54 (6.7)	805	0.226	0.593	0.342	0.00749	0.0351	1.25 (1.06-1.47)	
	rs1043470	miRNA binding	590 (72.3)	216 (26.5)	10 (1.2)	816	584 (73.0)	197 (24.6)	19 (2.4)	800	0.146	0.048	0.575	0.853	0.242	-	
ELF1	rs10507488	TFBS	601 (73.7)	190 (23.3)	25 (3.1)	816	588 (73.0)	195 (24.2)	22 (2.7)	805	0.148	0.049	0.263	0.914	0.172	-	
	rs10507487	TFBS	600 (73.6)	191 (23.4)	24 (2.9)	815	588 (73.0)	195 (24.3)	22 (2.7)	806	0.148	0.070	0.265	0.860	0.181	-	
	rs5594470	TFBS	599 (73.9)	187 (23.1)	25 (3.1)	811	587 (72.9)	195 (24.3)	22 (2.7)	805	0.148	0.034	0.265	0.818	0.818	-	
	rs7799	Non synonymous	413 (50.8)	324 (39.9)	76 (9.3)	813	369 (48.4)	338 (42.1)	76 (9.5)	803	0.259	0.309	0.868	0.448	0.160	-	
	rs3764056	Splicing	394 (48.6)	333 (41.1)	84 (10.4)	811	375 (46.8)	347 (43.3)	80 (10.0)	802	0.312	0.285	1	0.852	0.494	-	
	rs1059820	Non synonymous	394 (48.5)	335 (41.2)	84 (10.3)	813	375 (46.7)	348 (43.3)	80 (10.0)	803	0.313	0.324	1	0.871	0.489	-	
	rs1059824	miRNA	383 (48.0)	328 (41.1)	87 (10.9)	798	370 (46.5)	347 (43.6)	78 (9.8)	795	0.315	0.189	0.870	0.913	0.536	-	
	rs1059835	miRNA	403 (49.4)	324 (39.8)	88 (10.8)	815	387 (48.2)	341 (42.5)	75 (9.3)	803	0.306	0.070	1	0.851	0.586	-	
	rs552092	TFBS	403 (49.5)	324 (39.8)	87 (10.7)	814	388 (48.6)	335 (42.0)	75 (9.4)	798	0.305	0.083	0.867	0.903	0.683	-	
	PPP1R9A	rs10953132	TFBS	244 (29.9)	405 (49.8)	165 (20.6)	815	216 (27.0)	420 (52.4)	165 (20.6)	801	0.460	0.888	0.156	0.336	0.373	-
rs954524		Benign (polyphen)	289 (35.5)	423 (52.0)	102 (12.5)	814	305 (37.9)	377 (46.8)	123 (15.3)	805	0.366	0.006	0.711	-	-	-	
rs954542		miRNA binding	608 (75.0)	188 (23.2)	15 (1.8)	811	571 (71.1)	219 (27.3)	13 (1.6)	803	0.143	0.880	0.134	0.136	0.239	-	
SEMA6D	rs4775708	None / SD GWAS positive	438 (54.1)	318 (39.3)	54 (6.7)	810	455 (57.3)	280 (35.3)	59 (7.4)	794	0.257	0.786	0.089	0.429	0.759	-	
	rs76739	TFBS	267 (33.2)	392 (48.8)	145 (18.0)	804	280 (35.0)	375 (46.9)	145 (18.1)	801	0.420	0.943	0.345	0.834	0.501	-	
	rs3809465	None / SD GWAS positive	205 (25.2)	405 (49.8)	204 (25.1)	814	211 (26.3)	390 (48.7)	200 (25.0)	801	0.456	0.889	0.480	0.724	0.685	-	
	rs532598	Non synonymous	338 (41.5)	373 (45.8)	103 (12.7)	814	369 (44.8)	332 (41.4)	111 (13.8)	802	0.361	1	0.019	0.549	0.856	-	
IGF2BP3	rs10950949	TFBS	291 (35.9)	387 (47.8)	132 (16.3)	810	255 (31.9)	391 (48.9)	153 (19.1)	799	0.419	0.884	0.886	0.0492	0.407	-	

MAF: Minimum Allele Frequency; HWE: Hardy-Weinberg Equilibrium; TFBS: Transcription Factor Binding Site; SD GWAS positive, Substance Dependence Genome Wide Association Study, SNP identified associated by Drgon et al PLoS One. 2010 Jan 21;15(1):e8832. In bold: significant p-values; ¹Log-additive model; ² Adjusted by age; *When OR<1, the inverted score is shown; [§]Overcome Bonferroni correction p<0.0022.

Supplementary Table 6. Study of the effect of *NFAT5* variants on volumes of 7 brain regions involved in addiction using genetic and neuroimaging data from the BIG sample (<http://www.cognomics.nl>).

Brain volumes	SNPs	Discovery sample	Replication	Whole sample
		(1.5 Tesla) N=645	sample (1.5 Tesla) N=645	N=1300
		P-value	P-value	P-value
Prefrontal cortex	rs1437134A	0.1569	0.9645	0.3013
	rs11641233T	0.9895	0.1267	0.259
Insula	rs1437134A	0.6895	0.0536	0.1047
	rs11641233T	0.4842	0.9033	0.6997
Hippocampus	rs1437134A	0.3414	0.023	0.3328
	rs11641233T	0.0188	0.9202	0.1619
Nucleus accumbens	rs1437134A	0.7974	0.488	0.6487
	rs11641233T	0.1451	0.5691	0.605
Caudate nucleus	rs1437134A	0.2306	0.2402	0.9764
	rs11641233T	0.0022	0.9314	0.0709
Putamen	rs1437134A	0.4312	0.2099	0.7661
	rs11641233T	0.0347	0.5935	0.0644
Medial orbitofrontal cortex	rs1437134A	0.923	0.2342	0.4889
	rs11641233T	0.2424	0.8316	0.262

Article 6:

“Els miRNAs miR-9, miR-153 i miR-124 estan regulats a la baixa per l’efecte de la cocaïna en un model cel·lular dopaminèrgic i contribueixen a la dependència de cocaïna”.

Resum:

La cocaïna és una de les drogues psicoestimulants més consumides arreu del món. Els miRNAs són reguladors post-transcripcionals amb una expressió molt elevada al cervell, i diversos estudis han demostrat que la cocaïna pot produir canvis en la seva expressió. En un estudi previ del grup, es va observar que el tractament agut amb cocaïna en un model cel·lular dopaminèrgic produïa canvis en l’expressió gènica. En aquest estudi, hem utilitzat l’eina bioinformàtica de predicció WebGestalt per identificar miRNAs que podrien estar implicats en la regulació d’aquests gens diferencialment expressats. Utilitzant el mateix model cel·lular, hem trobat que set d’aquests miRNAs estan regulats a la baixa per la cocaïna: miR-124-3p, miR-124-5p, miR-137, miR-101-3p, miR-9-5p, miR-369-3p, miR-153-3p. Els tres últims no s’havien relacionat mai amb els efectes de la cocaïna. A més, mitjançant un estudi d’associació cas-control (2.085 casos i 4.293 controls) hem identificat associació entre la dependència de cocaïna i tres gens que codifiquen aquests miRNAs madurs (hsa-miR-9-1, hsa-miR-153-1 i hsa-miR-124-3). En conclusió, hem identificat nous miRNAs que podrien donar lloc als canvis d’expressió gènica induïts per la cocaïna que donen lloc a l’addició. D’altre banda, en tres d’aquest miRNAs, hem identificat variants genètiques que podrien contribuir a la dependència de cocaïna. Aquests resultats recolzen la idea que els gens diferencialment expressats sota l’acció de la cocaïna podrien ser portadors de variants genètiques de predisposició a la dependència.

Referència:

Judit Cabana-Domínguez, Concepció Arenas, Bru Cormand, Noèlia Fernàndez-Castillo. *Mir-9, miR-153 and miR-124 are down-regulated by cocaine in a dopaminergic cell model and contribute to cocaine dependence*. Translational Psychiatry (en revisió)

MiR-9, miR-153 and miR-124 are down-regulated by cocaine in a dopaminergic cell model and contribute to cocaine dependence

Judit Cabana-Domínguez^{1,2,3,4}, Dr. Concepció Arenas¹, Dr. Bru Cormand^{1,2,3,4*}, Dr. Noèlia Fernández-Castillo^{1,2,3,4*}.

¹Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

³Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain

⁴Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR-SJD), Esplugues de Llobregat, Catalonia, Spain

*Equally contributed

CORRESPONDING AUTHORS:

Noèlia Fernández Castillo. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, edifici Prevosti, 3^a planta, 08028, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: (+34) 93 4037082. Fax: (+34) 93 4034420; Email: noefernandez@ub.edu

Bru Cormand. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, edifici Prevosti, 3^a planta, 08028, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: (+34) 93 4021013. Fax: (+34) 93 4034420; Email: bcormand@ub.edu.

RUNING TITLE: Association of miRNAs with cocaine dependence

Abstract

Cocaine is one of the most used psychostimulant drugs worldwide. MicroRNAs are post-transcriptional regulators of gene expression that are highly expressed in brain, and several studies have shown that cocaine can alter their expression. In a previous study, we identified genes differentially expressed in a dopaminergic neuron-like model after an acute exposure to cocaine. Now, we used the prediction tool WebGestalt to identify miRNA molecules potentially involved in the regulation of these genes. Using the same cellular model, we found that seven of these miRNAs are down-regulated by cocaine: miR-124-3p, miR-124-5p, miR-137, miR-101-3p, miR-9-5p, miR-369-3p, miR-153-3p, the last three not identified previously. Furthermore, we found that three of the miRNA genes that are differentially expressed in our model (hsa-miR-9-1, hsa-miR-153-1 and hsa-miR-124-3) are nominally associated with cocaine dependence in a case-control study (2085 cases and 4293 controls). In summary, we highlighted novel miRNAs that may be involved in cocaine-induced changes of gene expression that underlies addiction. Moreover, we identified genetic variants that contribute to cocaine dependence in three of these miRNA genes, supporting the idea that genes differentially expressed under cocaine may play an important role in the susceptibility to cocaine dependence.

Introduction

Cocaine is one of the most used illicit drugs and its use is one of the major public health problems worldwide¹. However, only a subset of individuals exposed to cocaine (around 15-16% of cocaine users) develop an addiction².

Transcriptomic studies performed in animal models and human brain *post-mortem* samples have revealed that both acute and chronic cocaine exposure produce changes in the expression of genes related to diverse functional categories, such as cell adhesion, extracellular matrix, synaptic communication and neuroplasticity, receptors, ion channels and transporters, oligodendrocytes and myelin, mitochondrial function, apoptosis and cell death, transcription factors and signal transduction^{3,4}. Cocaine also produces epigenetic adaptations like changes in DNA methylation, chromatin remodeling or alterations in miRNA regulation⁵⁻⁷. Both epigenetic adaptations and changes in gene expression induced by cocaine trigger molecular and cellular adaptations in the central nervous system (CNS) that may explain the persistence of drug-seeking behavior, even after extended periods of abstinence^{4,8-10}.

The interaction between the individual's genetic background, epigenetic factors and environment¹¹ determine how neuronal circuits adapt to chronic cocaine exposure, establishing the development of addiction in some individuals but not in others¹⁰. Cocaine dependence is one of the most heritable psychiatric disorders (around 65-79%¹²⁻¹⁵), and some of those genetic risk factors may lie in genes that mediate cocaine's effect, conferring initial vulnerability to the establishment of drug-induced neuroadaptations.

MicroRNAs (miRNAs) are post-transcriptional regulators of gene expression that bind to target mRNAs to inhibit translation or promote mRNA degradation. Each miRNA can regulate the expression of hundreds of different mRNAs, and each mRNA species can be targeted by several miRNAs. MiRNA regulation generates a very complex and dynamic system that allows the cells to fine-tune gene expression¹⁶⁻¹⁸. In addition to the canonical cytoplasmic function, there is evidence that miRNAs located in the nucleus can regulate mRNA stability in the nucleolus and modulate alternative splicing, as well as activate or inhibit the transcription of target genes¹⁹.

MiRNAs are very abundant in the central nervous system, especially in the synapto-dendritic compartment, where they control local mRNA translation in response to neuronal activity²⁰, which is essential for synapses development, neuronal plasticity, memory and learning^{21,22}. It is known that cocaine alters miRNA expression profiles in brain²³. Using RNAseq, Eipper-Mains and collaborators inspected cocaine-responsive miRNAs in nucleus accumbens (NAc) and striatal post-synaptic densities

(PSDs) in chronically-cocaine treated mice. They found several differentially expressed miRNAs, most of them belonging to four miRNA families (miR-8, miR-7, miR-142 and Let-7), which suggests that cocaine modulates expression of miRNAs that have similar target genes²⁴. In a subsequent study, they used a list of mRNAs²⁵ found enriched in PSD to identify predicted targets of these miRNAs²⁶, using bioinformatic tools.

In a previous study, we evaluated changes in gene expression induced by acute cocaine exposure in a dopaminergic neuron-like model (differentiated SH-SY5Y cells). We found differences in 756 protein-coding genes involved in several processes with potential relevance to central nervous system function, including regulation of transcription, chromatin modification, focal adhesion and cell projection, and neurotrophin and MAPK signaling pathways²⁷. Furthermore, these genes showed an enrichment of predicted binding sites for several miRNAs, miR-124 among them. Based on these results, we hypothesized that the observed changes in gene expression can be produced, in part, by changes in miRNA expression. Here, we aimed to validate predicted changes in miRNA expression altered by cocaine in new differentiated SH-SY5Y cells. Furthermore, we aimed to evaluate their possible contribution to cocaine dependence susceptibility through a case-control association study with common genetic variants.

Materials and methods

MiRNA selection

In a previous study²⁷ we assessed transcriptomic changes induced by cocaine in a human dopaminergic neuron-like model (differentiated SH-SY5Y cells) at 6h and 24h after an acute 30 minutes exposure to cocaine at 1 and 5 μ M. We identified 756 protein-coding genes differentially expressed only under 5 μ M cocaine after 6h (10% FDR), 337 of them down-regulated and 419 up-regulated²⁷. In the present study we further evaluated the enrichment of miRNA binding sites among the differentially expressed genes. We performed a “miRNAs target analysis” with the online tool WEB-based GENE SeT ANALYSIS Toolkit (WebGestalt, http://www.webgestalt.org/webgestalt_2013)^{28,29} using the default settings and considering up-regulated and down-regulated subsets of genes separately (Supplementary Table 1). We filtered the results obtained using the following criteria: i) miRNAs expressed in brain, according to miRIAD database (<http://bmi.ana.med.uni-muenchen.de/miriad/>), ii) every single miRNA has predicted binding sites in at least 10 target genes, iii) an enrichment p-value < 0.01. We also discarded predictions of miRNA families, due to the difficulty to validate all the different miRNAs. We then prioritized the results based on the biological function of the target genes, according to GO and KEGG, or previous relation of the miRNA with cocaine.

MiRNA expression

Changes in the expression of miRNA genes were tested in new cultures of dopaminergic neuron-like cells exposed to cocaine. SH-SY5Y cells (ATCC, LGC Standards) were differentiated and validated as previously described²⁷. After an exposure to 5 μ M cocaine for 30 minutes, the medium was replaced and cells were retrieved at 3 or 6 hours, performing 10 biological replicates per condition. Total RNA including miRNAs was isolated using the miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA concentration was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, ThermoFisher Scientific Inc., Wilmington, DE, USA) and integrity was evaluated with the Bioanalyzer 2100 platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The averaged RIN values (RNA Integrity Number) was 9.98, being 9.8 the lowest one.

Mature miRNAs were retrotranscribed using miScript II RT Kit (Qiagen) and real-time quantitative PCR (qRT-PCR) experiments were performed with miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen) in the LightCycler 480 II system (Roche Life Sciences, Branford, CT, USA). For primers sequences, see Supplementary Table 2. Relative quantification was performed for each miRNA by normalizing the level of expression to that of miR-3911, which is stable across samples.

A one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test was performed to examine the gene expression changes among groups. Previously, normality and homogeneity of variance were ascertained in our samples using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. A value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Gene networks

The differentially expressed miRNAs were subjected to analysis of gene networks using the Ingenuity Pathway Analysis 8.8 software (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>; Ingenuity Systems, Redwood city, CA, USA).

Gene-based association analysis

We used MAGMA 1.05b³⁰ to perform a gene-based association analysis to test the contribution to cocaine dependence susceptibility of the miRNAs which expression is altered by cocaine. We used the summary statistics from a GWAS meta-analysis of cocaine dependence ($N_{\text{cases}}=2085$; $N_{\text{controls}}=4293$) (manuscript in preparation), considering the SNP-wise mean model, in which the sum of $-\log(\text{SNP } p\text{-value})$ for SNPs located within a gene and its regulatory regions was used as the statistic test. We selected all miRNA genes encoding each differentially expressed mature miRNA and the regulatory regions identified according to histone marks H3K4me1, H3K4me3, H3K27me3, H3K27Ac in UCSC

Genome Browser (assembly GRCh37/hg19)³¹. The gene p-value was calculated using a known approximation of the sampling distribution³². MAGMA accounts for gene size, number of SNPs in a gene and linkage disequilibrium (LD) between markers (estimated using data from 1000Genomes Phase 3, European ancestry samples³³).

Summary statistic used in this analysis is a case-control GWAS meta-analysis of cocaine dependence performed using four datasets from the dbGaP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap>) under the project 10608 (manuscript in preparation):

- Sample 1: Study of Addiction: Genetics and Environment, SAGE (phs000092.v1.p1.)
- Sample 2: Substance Dependence GWAS in European- and African- Americans (phs000952.v1.p1) and Genetic Epidemiology of COPD (phs000179.v5.p2.).
- Sample 3: A GWAS of Heroin Dependence (phs000277.v1.p1.) and eMERGE GWAS on Cataract and Low HDL cholesterol (phs000170.v2.p1.).
- Sample 4: Alcohol Dependence GWAS in European- and African-Americans (phs000425.v1.p1) and Chronic Renal Insufficiency Cohort Study (CRIC) GWAS (phs000524.v1.p1).

All cases used met DSM-IV criteria for cocaine dependence, although most of them are also dependent to other drugs of abuse.

Results

In a previous study we identified 756 protein-coding genes showing differential expression in a dopaminergic neuron-like model after an acute cocaine exposure²⁷. Here we evaluated whether these changes in gene expression might be produced by changes in miRNA expression induced by cocaine.

Using the online prediction tool WebGestalt we tested enrichment for miRNA binding sites in the differentially expressed mRNAs. We found enrichment for 6 miRNAs in the subset of down-regulated target genes, and 84 miRNAs for the up-regulated ones (Supplementary Table 1). After filtering them according to the criteria described above (see Materials and methods), we selected 11 miRNAs (hsa-miR-9-3p, hsa-miR-9-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-105-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-124-5p, hsa-miR-137, hsa-miR-153-3p, hsa-miR-181-5p, hsa-miR-186-5p and hsa-miR-369-3p), all of them predicted to bind up-regulated genes in our previous study. Thus, we expected to find these miRNAs down-regulated, as they are negative regulators of gene expression.

Since the RNA samples used in the previous work did not contain miRNAs, we performed new experiments of cocaine exposure to differentiated SH-SY5Y, to experimentally validate changes in miRNA expression, at 3 and 6 hours after 30 minutes of cocaine treatment at 5 μ M. The results showed

that 6 hours after the 30' cocaine treatment, seven out of the eleven tested miRNAs were down-regulated, as predicted, when compared to untreated control cells: miR-9-5p (FC = -1.49, SE = 0.19, $P = 1.3e-03$), miR-101-3p (FC = -2.00, SE = 0.26, $P = 0.012$), miR-124-3p (FC = -2.17, SE = 0.17, $P = 1.4e-03$), miR-124-5p (FC = -1.54, SE = 0.15, $P = 4e-03$), miR-137 (FC = -1.69, SE = 0.26, $P = 0.015$), miR-153-3p (FC = -2.94, SE = 0.2, $P = 1.3e-03$) and miR-369-3p (FC = -2.22, SE = 0.2, $P = 7.6e-03$) (Figure 1). None of them showed significant changes at 3 hours after treatment, although in some cases a decreasing trend was observed (Figure 1).

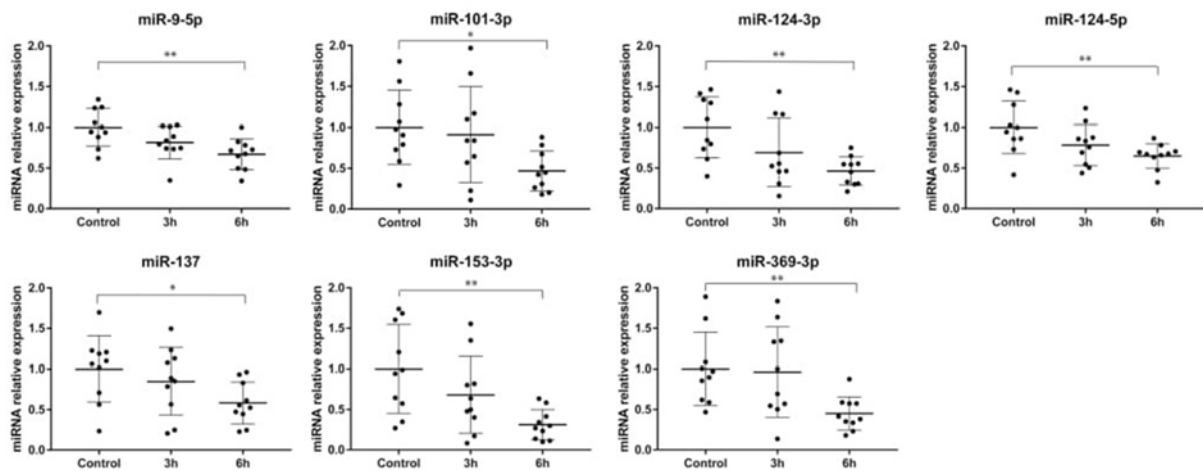


Figure 1. Transcription levels of seven differentially expressed miRNAs determined by qRT-PCR at 3 and 6 hours after a 30-min exposure to 5 μ M cocaine in dopaminergic neuron-like cells. Significant differences compared to control cells (not exposed to cocaine) normalized to miR-3911 are indicated (* p-value < 0.05, ** p-value < 0.01). Mean and standard deviation are shown.

Then, we evaluated the relationship between these miRNAs and other genes by gene network analysis. First, we inspected the connections between the identified down-regulated miRNAs and their up-regulated target mRNA (predicted to contain miRNA binding sites). We found five out of the seven differentially expressed miRNAs connected with seventeen up-regulated genes in a network related to “Developmental Disorder, Ophthalmic Disease, Organismal Injury and Abnormalities” (Score= 41; Figure 2A). Second, we inspected how these differentially expressed miRNAs are connected with the other genes in the genome and found that all seven miRNAs were present and highly connected in a network involved in “Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Inflammatory Disease” (Score = 21; Figure 2B).

Finally, we evaluated the possible contribution of these miRNAs to cocaine dependence susceptibility by assessing the possible presence of common genetic risk variants for cocaine dependence within the genes encoding these miRNAs. Thus, we performed a gene-based association analysis in a sample of 2085 cocaine dependent individuals and 4293 controls. Interestingly, three miRNA genes were found nominally associated with cocaine dependence: *hsa-miR-9-1* ($P = 0.011$), *hsa-miR-153-1* ($P = 0.036$)

and *hsa-miR-124-3* ($P = 0.042$) (Table 1). These genes encode mature miRNAs that are highly connected in the identified networks (Figure 2A and B).

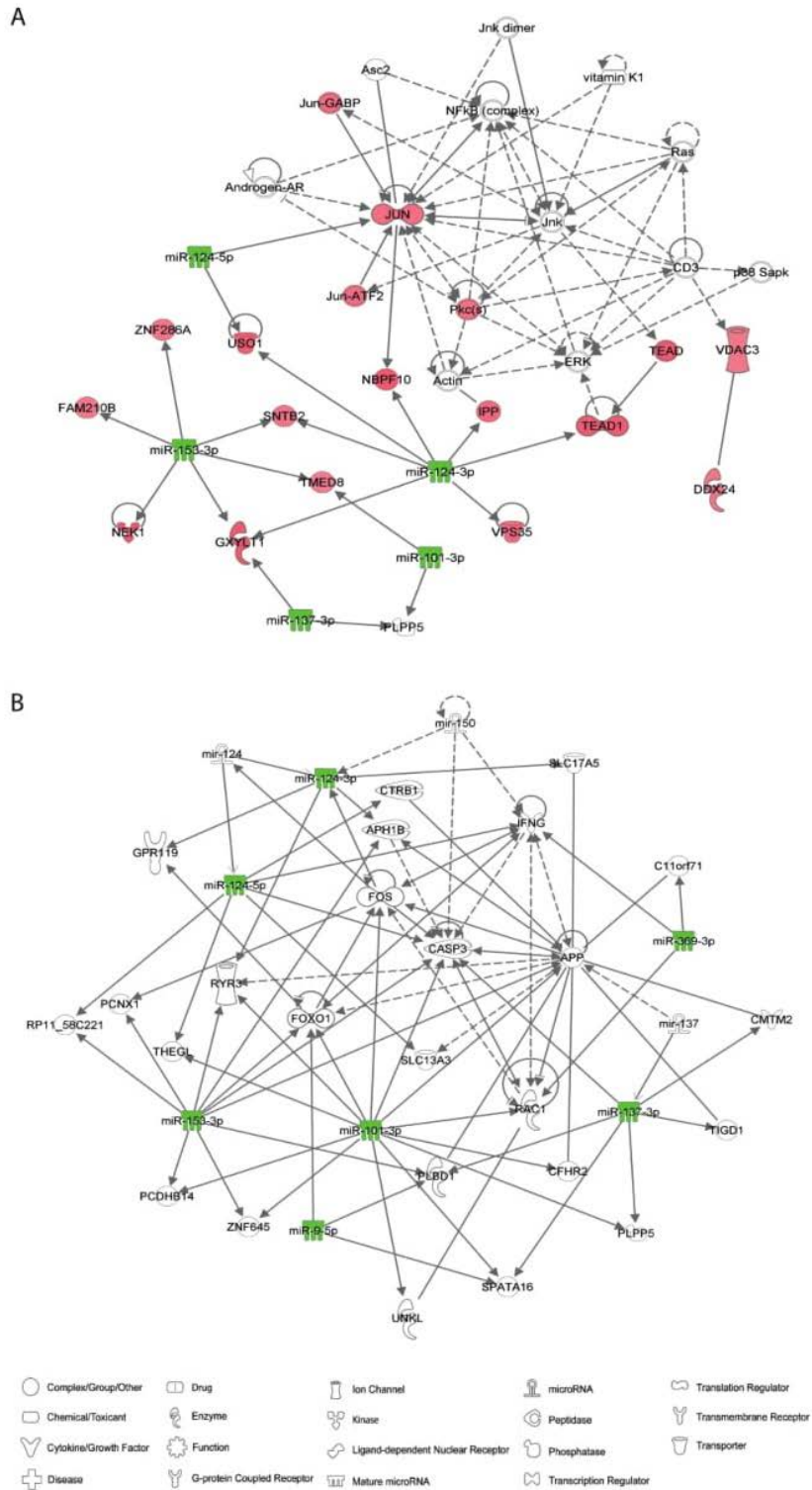


Figure 2. Gene networks involved in A) Developmental disorder, ophthalmic disease, organismal injury and abnormalities (Score = 41) and B) Cell-to-cell signaling and interaction, nervous system development and function, inflammatory disease (Score = 21). The green and red nodes in the pathway indicate the down- and up-regulated genes, respectively.

Table 1. Results of miRNA gene-based association analysis of common genetic variants in a GWAS meta-analysis of cocaine dependence in individuals of European ancestry.

Gene ID	Coordinates*	NSNPs	ZSTAT	p-value
hsa-miR-101-1	chr1:65523406-65534997	19	0.2260	0.4105
hsa-miR-101-2	chr9:4828718-4857394	146	0.4890	0.3123
hsa-miR-124-1	chr8:9760113-9764675	6	-0.8845	0.8117
hsa-miR-124-2	chr8:65283014-65291854	17	0.3783	0.3525
hsa-miR-124-3	chr20:61804035-61811005	18	1.7294	0.0418
hsa-miR-137	chr1:98509277-98521215	30	-0.1075	0.5428
hsa-miR-153-1	chr2:220158748-220161492	8	1.7939	0.0364
hsa-miR-153-2	chr7:157362028-157377114	38	-0.7436	0.7714
hsa-miR-153-2_HG [#]	chr7:158377426-158412766	123	0.6251	0.2659
hsa-miR-369	chr14:101522238-101541542	78	0.8836	0.1884
hsa-miR-9-1	chr1:156389579-156394148	5	2.2778	0.0113
hsa-miR-9-2	chr5:87957415-87991755	57	0.6955	0.2433
hsa-miR-9-3	chr15:89899916-89911697	27	-0.6557	0.7440

Analysis performed using 2085 cases and 4293 controls. *Gene coordinates based on GRCh37/hg19. NSNPs: Number of SNPs per region included in the gene-based analysis. ZSTAT: the Z-value for the gene. [#]Promoter region of miR-153-2 host gene (PTPRN2). In bold, nominally associated genes.

Discussion

In this study, we explored the possibility that cocaine-induced changes in gene expression found in a previous study of our group could be triggered by changes in the expression of miRNA molecules.

We used prediction tools to identify miRNAs that potentially regulate protein-coding genes which expression is altered by cocaine according to a previous study by our group²⁷. Seven of the eleven miRNAs selected were significantly down-regulated after the exposure to cocaine (miR-9-5p, miR-101-3p, miR-124-3p, miR-124-5p, miR-137, miR-153-3p and miR-369-3p), consistent with the predictions and with the up-regulation of their target genes. Moreover, through gene network analyses we correlated down-regulated miRNAs with the up-regulated target genes identified in our previous study. This network includes several genes previously associated with cocaine dependence, such as *PKC*, encoding an enzyme involved in cocaine-induced neuroplasticity³⁴⁻³⁶, or *JUN*, an early immediate gene (EIG) that activates transcription through heterodimerization at *AP-1* sites³⁷⁻⁴⁰. Furthermore, we found interaction between miR-124-3p and its validated target *TEAD1*^{41,42}, coding for a transcription factor regulated by the Hippo pathway that controls proliferation⁴³. On the other hand, we performed a network analysis to test the interaction of the seven down-regulated miRNAs identified with all the genes in the genome. We identified an interesting network involved in “Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function, Inflammatory Disease” in which the seven differentially expressed miRNAs are present and highly interconnected. In this network we highlight

three genes: *FOS*, *CASP3* and *RYR3*. *FOS* is a very important EIG highly associated with cocaine dependence, as recently reviewed elsewhere⁴⁴. *CASP3* encodes a pro-apoptotic protein involved in cocaine-mediated cell death that is very important for both adult and fetal cocaine neurotoxicity^{45,46}. And *RYR3*, a member of RyR family involved in cocaine-induced place preference regulated by dopamine D1 receptor⁴⁷, is a highly confident predicted target of miR-124-3p and miR-153-3p according to different miRNA:mRNA prediction tools. Furthermore, *RYR3* was found up-regulated in dopaminergic-enriched regions from substantia nigra and ventral tegmental area in *post-mortem*-brain samples from cocaine abusers³⁷, as well as in our previous study on dopaminergic neuron-like cells treated with cocaine²⁷.

Some of the miRNAs reported in the present study had also been found down-regulated by cocaine in previous works. For example, miR-124 is down-regulated in the NAc of mice cronicly exposed to cocaine⁴⁸ and in neuronal cell cultures (Be(2)-M17 and SH-SY5Y) treated with cocaine⁴⁹. Moreover, overexpression of this gene in NAc attenuates cocaine-induced place preference in mice⁵⁰. On the other hand, miR-137 and miR-101 are down-regulated in the NAc of cocaine self-administrated rats compared to controls⁵¹. This is the first time that miR-9-5p, miR-369-3p and miR-153-3p are found down-regulated after cocaine treatment. MiR-9 is one of the most highly expressed miRNAs in the adult vertebrate brain and it plays an important role in brain development, neurogenesis, synaptic plasticity and memory⁵²⁻⁵⁶. Furthermore, a recent study associated fetal alcohol exposure (FAE) with an increase of miR-9 in the pituitary, which represses the *D2r* gene and its spliced variant *D2s*⁵⁷. The miR-369 is located in the miR379-410 cluster, which contains 38 miRNAs involved in neuronal development and function⁵⁸. MiR-369-3p regulates the expression of *Ncad*, *Adam19* and *TrappC8*, very important in neurogenesis and neuronal migration⁵⁹. Finally, miR-153 inhibits *Cacna1c* to suppress neuroendocrine secretion (insulin and dopamine)⁶⁰.

Interestingly, three genes encoding differentially expressed mature miRNAs (*hsa-miR-9-1*, *hsa-miR-153-1* and *hsa-miR-124-3*) were found to be nominally associated with cocaine dependence in this study. Previous studies had reported genes which expression is altered by cocaine and that also carry risk variants for cocaine dependence, or viceversa (*NFAT5*, *PLCB1* and *NTNG1*)^{27,61,62}. The findings in the present study, together with the previous ones, support the hypothesis that genes up-regulated or down-regulated by cocaine may also contribute to the susceptibility to cocaine dependence.

Strengths and limitations of the present study should be discussed. Our study was performed in a dopaminergic neuron-like model, from a tumor cell line, which performance may differ from the events that take place in the brain. However, we were able to detect previously described miRNAs that had shown down-regulation by cocaine in mice, and three new miRNAs. On the other hand, three genes

encoding these altered miRNAs were found to carry genetic variants nominally associated with cocaine dependence in human samples, despite the relatively small sample size of the meta-analysis used. Increasing the number of individuals of this study may increase the strength of the associations. Finally, it is important to note that, although many tools/databases are available to predict mRNA:miRNA interactions, the overlap between the outputs is often very low¹⁷, so is important to validate them. Here, we demonstrated that WebGestalt is a very useful tool to identify enrichment of miRNA binding sites in a list of potential target genes, since we could validate changes in the expression of seven out of eleven predicted miRNAs. This strategy was previously used by others with a similar performance^{63,64}.

To sum up, we found seven miRNAs down-regulated in dopaminergic neuron-like cells after an acute cocaine treatment, which might regulate several genes previously reported to be up-regulated in this model. Here we highlighted new miRNAs that may be involved in cocaine-induced changes of gene expression. Furthermore, using a meta-analysis of clinical samples, we found association between cocaine dependence and three genes encoding these differentially expressed miRNAs. All these results support the idea that genes which expression is altered by cocaine might play an important role in the susceptibility to cocaine dependence, and also that miRNAs may play an important role in modulating cocaine effects and dependence.

Acknowledgments

Major financial support for this research was received by BC from the Spanish 'Ministerio de Economía y Competitividad' (SAF2015-68341-R) and AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2017-SGR-738). The research leading to these results has also received funding from the European Union Seventh Framework Program [FP7/2007-2013] under grant agreement n° 602805 (Aggressotype) and from the European Union H2020 Program [H2020/2014-2020] under grant agreement n° 667302 (CoCA). NF-C was supported by a contract from the 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras' (CIBERER) and by an EMBO short-term fellowship (ASTF 573-2016). JC-D was supported by 'Generalitat de Catalunya' (2015 FI_B 00448). We thank Laura Pineda, Noèlia Benetó and Bàrbara Torrico for their support with the cell differentiation experiments.

The authors acknowledge the contribution of data from dbGAP accessed through project number 10608. The Study of Addiction: Genetics and Environment (SAGE), one of the genome-wide association studies funded as part of the Gene Environment Association Studies (GENEVA) under GEI (supported by U01 HG004422, U01 HG004446, U01HG004438, HHSN268200782096C; and support for collection of datasets and samples was provided by the COGA; U10 AA008401, COGEND; P01 CA089392 and FSCD; R01 DA013423). GWAS of Heroin Dependence (supported by R01DA17305); GWAS of Cocaine Dependence in Two Populations (supported by RC2 DA028909, R01 DA12690, R01 DA12849, R01 DA18432, R01 AA11330, and R01 AA017535); GWAS of Heroin Dependence (supported by R01DA17305). CRIC Study (supported by U01DK060990, U01DK060984, U01DK061022, U01DK061021, U01DK061028, U01DK60980, U01DK060963 and U01DK060902). CIDR-Gelernter Study, a genome-

wide association study funded as part of the Genetics of Alcohol Dependence in American Populations (supported by U01HG004438 and HHSN268200782096C). The COPDGene study (supported by U01HL089856 and U01HL089897, and the COPD Foundation through contributions made by an Industry Advisory Board comprised of Pfizer, AstraZeneca, Boehringer Ingelheim, Novartis, and Sunovion). Personalized Medicine Research Project (PMRP) (supported by U01HG004608, U01HG004438 and U01HG004603).

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest or relevant financial interests.

References

- 1 UNDOC. Informe mundial sobre las drogas 2017. 2017.
- 2 O'Brien MS, Anthony JC. Risk of Becoming Cocaine Dependent: Epidemiological Estimates for the United States, 2000–2001. *Neuropsychopharmacology* 2005; **30**: 1006–1018.
- 3 Lull ME, Freeman WM, Vrana KE, Mash DC. Correlating Human and Animal Studies of Cocaine Abuse and Gene Expression. *Ann N Y Acad Sci* 2008; **1141**: 58–75.
- 4 Zhou Z, Enoch MA, Goldman D, Zhifeng Zhou, Mary-Anne Enoch DG, Zhou Z, Enoch MA *et al.* Gene expression in the Addicted Brain. *Int Rev Neurobiol* 2014; **116**: 251–273.
- 5 Vaillancourt K, Ernst C, Mash D, Turecki G. DNA methylation dynamics and cocaine in the brain: Progress and prospects. *Genes*. 2017; **8**.
- 6 Nestler EJ. Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* 2014; **76**: 259–268.
- 7 Kenny PJ. Epigenetics, microRNA, and addiction. *Dialogues Clin Neurosci* 2014; **16**: 335–344.
- 8 Farris SP, Harris RA, Ponomarev I. Epigenetic modulation of brain gene networks for cocaine and alcohol abuse. *Front Neurosci* 2015; **9**: 1–10.
- 9 Schmidt HD, McGinty JF, West AE, Sadri-Vakili G. Epigenetics and psychostimulant addiction. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; **3**: a012047.
- 10 Robison AJ, Nestler EJ. Transcriptional and Epigenetic Mechanisms of Addiction. *Nat Rev Neurosci* 2012; **12**: 623–637.
- 11 Ajonijebu DC, Abboussi O, Russell VA, Mabandla M V., Daniels WMU. Epigenetics: a link between addiction and social environment. *Cell Mol Life Sci* 2017; **74**: 2735–2747.
- 12 Bevilacqua L, Goldman D. Genes and addictions. *Clin Pharmacol Ther* 2009; **85**: 359–361.
- 13 Goldman D, Oroszi G, Ducci F. The genetics of addictions: uncovering the genes. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 521–32.
- 14 Bühler KM, Giné E, Echeverry-Alzate V, Calleja-Conde J, De Fonseca FR, López-Moreno JA. Common single nucleotide variants underlying drug addiction: More than a decade of research. *Addict Biol* 2015; **20**: 845–871.
- 15 Hall FS, Drgonova J, Jain S, Uhl GR. Implications of genome wide association studies for addiction: Are our a priori assumptions all wrong? *Pharmacol Ther* 2013; **140**: 267–279.
- 16 Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; **10**: 126–39.
- 17 Afonso-Grunz F, Müller S. Principles of miRNA–mRNA interactions: beyond sequence complementarity. *Cell Mol Life Sci* 2015; **72**: 3127–3141.
- 18 Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med* 2016; **14**: 143.
- 19 Catalanotto C, Cogoni C, Zardo G. MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions. *Int J Mol Sci* 2016; **17**:1712.
- 20 Most D, Workman E, Harris RA. Synaptic adaptations by alcohol and drugs of abuse: changes in microRNA expression and mRNA regulation. *Front Mol Neurosci* 2014; **7**: 85.
- 21 Wang W, Kwon EJ, Tsai L-H. MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases. *Learn Mem* 2012; **19**: 359–368.

- 22 Kolshus E, Dalton VS, Ryan KM, McLoughlin DM. When less is more-microRNAs and psychiatric disorders. *Acta Psychiatr Scand* 2013; **129**: 241–56.
- 23 Jonkman S, Kenny PJ. Molecular, cellular, and structural mechanisms of cocaine addiction: a key role for microRNAs. *Neuropsychopharmacology* 2013; **38**: 198–211.
- 24 Eipper-Mains JE, Kiraly DD, Palakodeti D, Mains RE, Eipper B a, Graveley BR. microRNA-Seq reveals cocaine-regulated expression of striatal microRNAs. *RNA* 2011; **17**: 1529–1543.
- 25 Suzuki T, Tian QB, Kuromitsu J, Kawai T, Endo S. Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis. *Neurosci Res* 2007; **57**: 61–85.
- 26 Eipper-Mains JE, Eipper BA, Mains RE. Global approaches to the role of miRNAs in drug-induced changes in gene expression. *Front. Genet.* 2012; **3**: 109.
- 27 Fernández-Castillo N, Cabana-Domínguez J, Soriano J, Sánchez-Mora C, Roncero C, Grau-López L *et al.* Transcriptomic and genetic studies identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence. *Transl Psychiatry* 2015; **5**: e667.
- 28 Wang J, Vasaikar S, Shi Z, Greer M, Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res* 2017; **45**: W130–W137.
- 29 Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: W77–83.
- 30 de Leeuw CA, Mooij JM, Heskes T, Posthuma D. MAGMA: Generalized Gene-Set Analysis of GWAS Data. *PLoS Comput Biol* 2015; **11**: e1004219.
- 31 Rosenbloom KR, Sloan CA, Malladi VS, Dreszer TR, Learned K, Kirkup VM *et al.* ENCODE data in the UCSC Genome Browser: year 5 update. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D56–63.
- 32 Hou CD. A simple approximation for the distribution of the weighted combination of non-independent or independent probabilities. *Stat Probab Lett* 2005; **73**: 179–187.
- 33 Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015; **526**: 68–74.
- 34 Ortinski PI, Briand LA, Pierce RC, Schmidt HD. Cocaine-seeking is associated with PKC-dependent reduction of excitatory signaling in accumbens shell D2 dopamine receptor-expressing neurons. *Neuropharmacology* 2015; **92**: 80–89.
- 35 Xue B, Guo ML, Jin DZ, Mao LM, Wang JQ. Cocaine facilitates PKC maturation by upregulating its phosphorylation at the activation loop in rat striatal neurons in vivo. *Brain Res* 2012; **1435**: 146–153.
- 36 Miller BW, Wroten MG, Sacramento AD, Silva HE, Shin CB, Vieira PA *et al.* Cocaine craving during protracted withdrawal requires PKC ϵ priming within vmPFC. *Addict Biol* 2017; **22**: 629–639.
- 37 Bannon MJ, Johnson MM, Michelhaugh SK, Hartley ZJ, Halter SD, David JA *et al.* A molecular profile of cocaine abuse includes the differential expression of genes that regulate transcription, chromatin, and dopamine cell phenotype. *Neuropsychopharmacology* 2014; **39**: 2191–2199.
- 38 Moratalla R, Elibol B, Vallejo M, Graybiel AM. Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron* 1996; **17**: 147–156.
- 39 Malaplate-Armand C, Becuwe P, Ferrari L, Masson C, Dauça M, Visvikis S *et al.* Effect of acute and chronic psychostimulant drugs on redox status, AP-1 activation and pro-enkephalin mRNA in the human astrocyte-like U373 MG cells. *Neuropharmacology* 2005; **48**: 673–684.
- 40 Imam SZ, Duhart HM, Skinner JT, Ali SF. Cocaine induces a differential dose-dependent alteration in the expression profile of immediate early genes, transcription factors, and caspases in PC12 cells: A possible mechanism of neurotoxic damage in cocaine addiction. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1053**: 482–490.
- 41 Mucaj V, Lee SS, Skuli N, Giannoukos DN, Qiu B, Eisinger-Mathason TSK *et al.* MicroRNA-124 expression counteracts pro-survival stress responses in glioblastoma. *Oncogene* 2015; **34**: 2204–2214.
- 42 Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; **433**: 769–773.
- 43 Zhao B, Lei QY, Guan KL. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008; **20**: 638–646.
- 44 Chandra R, Lobo MK. Beyond Neuronal Activity Markers: Select Immediate Early Genes in Striatal Neuron Subtypes Functionally Mediate Psychostimulant Addiction. *Front Behav Neurosci* 2017; **11**: 112.

- 45 Lepsch LB, Planeta CS, Scavone C. Cocaine causes apoptotic death in rat mesencephalon and striatum primary cultures. *Biomed Res Int* 2015; **2015**: 1–7.
- 46 Dey S, Mactutus CF, Booze RM, Snow DM. Cocaine Exposure In Vitro Induces Apoptosis in Fetal Locus Coeruleus Neurons by Altering the Bax/Bcl-2 Ratio and through Caspase-3 Apoptotic Signaling. *Neuroscience* 2007; **144**: 509–521.
- 47 Kurokawa K, Mizuno K, Shibasaki M, Kiyokage E, Toida K, Ohkuma S. Cocaine increases ryanodine receptors via dopamine D1 receptors. *Synapse* 2011; **65**: 1106–1112.
- 48 Chandrasekar V, Dreyer JL. microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate Cocaine-induced Plasticity. *Mol Cell Neurosci* 2009; **42**: 350–362.
- 49 Rodrigues AC, Li X, Radecki L, Pan YZ, Winter JC, Huang M *et al.* MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines. *Biopharm Drug Dispos* 2011; **32**: 355–367.
- 50 Chandrasekar V, Dreyer JL. Regulation of MiR-124, Let-7d, and MiR-181a in the accumbens affects the expression, extinction, and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference. *Neuropsychopharmacology* 2011; **36**: 1149–1164.
- 51 Quinn RK, James MH, Hawkins GE, Brown AL, Heathcote A, Smith DW *et al.* Temporally specific miRNA expression patterns in the dorsal and ventral striatum of addiction-prone rats. *Addict. Biol.* 2017; **23**: 631–642.
- 52 Radhakrishnan B, Alwin Prem Anand A. Role of miRNA-9 in brain development. *J. Exp. Neurosci.* 2016; **2016**: 101–120.
- 53 Sim S-E, Lim C-S, Kim J-I, Seo D, Chun H, Yu N-K *et al.* The Brain-Enriched MicroRNA miR-9-3p Regulates Synaptic Plasticity and Memory. *J Neurosci* 2016; **36**: 8641–8652.
- 54 Madelaine R, Sloan SA, Huber N, Notwell JH, Leung LC, Skariah G *et al.* MicroRNA-9 Couples Brain Neurogenesis and Angiogenesis. *Cell Rep* 2017; **20**: 1533–1542.
- 55 Gu X, Fu C, Lin L, Liu S, Su X, Li A *et al.* miR-124 and miR-9 mediated downregulation of HDAC5 promotes neurite development through activating MEF2C-GPM6A pathway. *J Cell Physiol* 2018; **233**: 673–687.
- 56 Roese-Koerner B, Stappert L, Brüstle O. Notch/Hes signaling and miR-9 engage in complex feedback interactions controlling neural progenitor cell proliferation and differentiation. *Neurogenesis* 2017; **4**: e1313647.
- 57 Gangisetty O, Jabbar S, Wynne O, Sarkar DK. MicroRNA-9 regulates fetal alcohol-induced changes in D2 receptor to promote prolactin production. *J Endocrinol* 2017; **235**: 1–14.
- 58 Winter J. MicroRNAs of the miR379-410 cluster: New players in embryonic neurogenesis and regulators of neuronal function. *Neurogenesis* 2015; **2**: e1004970.
- 59 Rago L, Beattie R, Taylor V, Winter J. miR379-410 cluster miRNAs regulate neurogenesis and neuronal migration by fine-tuning N-cadherin. *EMBO J* 2014; **33**: 906–20.
- 60 Xu H, Abuhatzira L, Carmona GN, Vadrevu S, Satin LS, Notkins AL. The Ia-2 β intronic miRNA, miR-153, is a negative regulator of insulin and dopamine secretion through its effect on the *Cacna1c* gene in mice. *Diabetologia* 2015; **58**: 2298–2306.
- 61 Kelaï S, Ramoz N, Moalic J, Noble F, Mechawar N, Imbeaud S *et al.* Netrin g1: Its downregulation in the nucleus accumbens of cocaine-conditioned mice and genetic association in human cocaine dependence. *Addict Biol* 2017; : 1–13.
- 62 Cabana-Domínguez J, Roncero C, Pineda-Cirera L, Palma-Álvarez RF, Ros-Cucurull E, Grau-López L *et al.* Association of the *PLCB1* gene with drug dependence. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–8.
- 63 Zheng W, Luo Z, Zhang J, Min P, Li W, Xu D *et al.* Identification of key genes in glioma CpG island methylator phenotype via network analysis of gene expression data. *Mol Med Rep* 2017; **15**: 2795–2801.
- 64 Zeng YE, Liu JXIA, Yan ZHIP, Yao XH, Liu XH. Potential microRNA biomarkers for acute ischemic stroke. *Int J Mol Med* 2015; **36**: 1639–1647.

Supplementary information for:

MIR-9, MIR-153 AND MIR-124 ARE DOWN-REGULATED BY COCAINE IN A DOPAMINERGIC CELL MODEL AND CONTRIBUTE TO COCAINE DEPENDENCE

Judit Cabana-Domínguez, Dr. Concepció Arenas, Dr. Bru Cormand, Dr. Noèlia Fernández-Castillo.

Supplementary table 1. List of predicted miRNAs targeting the differentially expressed genes.

microRNA	miRNA seed	Number of genes*	EntrezGene	Statistics	p-value [#]	Adj p-value ^{&}
Down-regulated target genes						
MIR-320	CAGCTTT	15	1627 5756 27125 9868 140775 515712326 4 23162 22859 7534 80031 549522907 940 3 7037	C=243; O=15; E=4.07; R=3.68	1.62E-05	1.50E-03
MIR-200B, MIR-200C, MIR-429	CAGTATT	21	2626 4774 80031 8491 121441 78135495 9 669 11168 57589 3953 5461929994 23164 22858 56965 26190 73217917 846 6048	C=453; O=21; E=7.59; R=2.77	2.87E-05	1.50E-03
MIR-496	CATGTAA	12	9868 4335 29072 7095 9589 8003110605 1 031 1810 9678 7534 7750	C=169; O=12; E=2.83; R=4.24	2.92E-05	1.50E-03
MIR-412	GGTGAAG	6	1184 2309 7812 92305 5500 8720	C=58; O=6; E=0.97; R=6.17	4.00E-04	0.0151
MIR-124A	TGCCTTA	20	55830 60481 10160 10424 23762 2608851 143 26994 80031 5870 5663 464127125 87 63 29994 92305 9441 1129396509 5911	C=535; O=20; E=8.97; R=2.23	8.00E-04	0.0201
MIR-218	AAGCACA	16	1627 60481 1277 51143 23162 587014073 0 131566 7812 27123 8089 22858112939 5 524 22859 5500	C=382; O=16; E=6.40; R=2.50	8.00E-04	0.0201
Up-regulated target genes						
MIR-202	ATAGGAA	15	7798 80155 1997 9887 23389 55740 59338 867 58516 4297 5469 29843 55704 10513 6421	C=100; O=15; E=1.93; R=7.78	8.19E-10	1.48E-07
MIR-17-5P, MIR-20A, MIR-106A, MIR-106B, MIR-20B, MIR-519D	GCACTTT	32	23040 7798 659 55284 80829 10618 4090 80143 5934 10725 10681 7126 800 51465 392 168850 29843 7091 80821 83737 55074 11214 6659 58508 22862 222236 2909 29028 10000 9644 58516 51277	C=574; O=32; E=11.07; R=2.89	8.42E-08	7.62E-06
MIR-93, MIR-302A, MIR-302B, MIR-302C, MIR-302D, MIR-372, MIR-373, MIR-520E, MIR-520A, MIR-526B, MIR-520B, MIR-520C, MIR-520D	AGCACTT	22	23040 55284 80829 10681 7126 7586 51465 4297 168850 29843 7091 80821 10771 55074 58508 22862 222236 4087 29028 81493 51277 58528	C=322; O=22; E=6.21; R=3.54	3.31E-07	2.00E-05
MIR-30A-3P, MIR-30E-3P	ACTGAAA	16	23040 9522 2589 51465 7398 7150 134553 7570 79982 867 1184 8028 83439 6263 51277 5892	C=193; O=16; E=3.72; R=4.30	1.12E-06	4.34E-05
MIR-181A	TGAATGT	26	23321 659 2186 26118 80155 55740 3267 10725 8065 8503 55137 168850 29843 9877 3609 9774 54842 22862 23022 6249 10000 8473 81688 64062 10611 5885	C=462; O=26; E=8.91; R=2.92	1.20E-06	4.34E-05

Resultats capítol 4. Article 6

MIR-200B,MIR-200C,MIR-429	CAGTATT	25	4008 23321 9522 2186 55284 2119 331 3267 22846 55854 5514 6935 3184 7003 55074 9669 51199 6249 9857 8473 51719 81688 23671 9644 151987	C=453; O=25; E=8.73; R=2.86	2.74E-06	8.27E-05
MIR-25,MIR-32,MIR-92,MIR-363,MIR-367	GTGCAAT	19	23077 7798 659 55284 7204 10725 8503 96459 1130 7003 59338 6659 51290 8473 81688 3685 7029 9644 5885	C=298; O=19; E=5.74; R=3.31	5.80E-06	1.00E-04
MIR-199A	CTACTGT	14	26118 80155 5934 4154 6935 9728 7150 27332 80267 867 27436 58517 10000 81688	C=176; O=14; E=3.39; R=4.13	8.44E-06	2.00E-04
MIR-130A,MIR-301, MIR-130B	TTGCACT	22	23321 659 2186 80829 4090 55082 3267 4154 392 4297 168850 55704 91452 9749 6659 54842 1184 23060 8028 2909 6249 8473	C=397; O=22; E=7.65; R=2.87	1.02E-05	2.00E-04
MIR-129	GCAAAAA	14	23040 659 2186 7204 23389 56853 2589 55137 55074 3609 23760 6659 23060 10611	C=183; O=14; E=3.53; R=3.97	1.32E-05	2.00E-04
MIR-29A,MIR-29B, MIR-29C	TGGTGCT	25	7798 5565 80829 9643 10725 57590 7126 8503 10116 4297 29843 6421 134553 55074 59338 11214 27436 23060 79915 6599 10000 57542 7528 9644 254065	C=503; O=25; E=9.70; R=2.58	1.67E-05	3.00E-04
MIR-204,MIR-211	AAAGGGA	15	23451 80829 26118 80155 23389 55082 4154 96459 4297 7430 6659 83439 6249 7799 6749	C=216; O=15; E=4.16; R=3.60	2.07E-05	3.00E-04
MIR-19A,MIR-19B	TTTGAC	25	659 2186 80829 23621 23389 10618 4090 55082 4154 8503 392 168850 55704 91452 23215 10771 6659 54842 22862 23060 6249 9857 8473 11127 51719	C=501; O=25; E=9.66; R=2.59	1.56E-05	3.00E-04
MIR-369-3P	GTATTAT	14	10808 659 23621 26118 2119 4154 96459 6935 4297 7091 6433 55074 6659 64062	C=196; O=14; E=3.78; R=3.71	2.85E-05	4.00E-04
MIR-142-3P	ACACTAC	11	25831 5862 9643 29123 4297 80267 9774 22862 27436 3685 254065	C=128; O=11; E=2.47; R=4.46	3.84E-05	5.00E-04
MIR-330	TGCTTTG	18	7798 659 331 9887 4154 10643 168850 134553 83737 64746 7003 1184 2260 8028 8473 10611 9644 9818	C=319; O=18; E=6.15; R=2.93	5.17E-05	6.00E-04
MIR-137	AAGCAAT	14	659 26118 4297 5469 7091 10771 55074 5339 22862 6651 5903 8473 64062 81493	C=212; O=14; E=4.09; R=3.43	6.72E-05	7.00E-04
MIR-520D	TTTGTAG	18	10163 55284 2119 50810 55740 55082 10643 1997 7003 80267 7570 6651 8028 10521 5903 9857 7799 6789	C=330; O=18; E=6.36; R=2.83	7.98E-05	8.00E-04
MIR-519C,MIR-519B, MIR-519A	TGCACTT	21	659 80829 4090 4154 10725 10643 5514 800 392 55704 83737 7003 11214 6659 54842 2909 10000 6263 8473 9644 58516	C=434; O=21; E=8.37; R=2.51	1.00E-04	9.00E-04
MIR-15A,MIR-16, MIR-15B,MIR-195, MIR-424,MIR-497	TGCTGCT	25	23040 23321 7798 23621 55740 4090 22808 7586 51465 4297 26135 1130 7091 206358 6645 59338 1184 6651 23060 10000 8473 51719 10611 58516 55161	C=574; O=25; E=11.07; R=2.26	1.00E-04	9.00E-04
MIR-9	ACCAAAG	22	23321 23621 56853 10618 3267 4154 10643 7586 1997 8503 96459 29843 10645 80267 9774 6651 25778 10521 5903 4750 9857 57542	C=489; O=22; E=9.43; R=2.33	2.00E-04	1.60E-03
MIR-520F	AAGCACT	14	80829 7586 7126 55137 4297 29843 168850 80821 22862 222236 29028 9857 81493 127933	C=236; O=14; E=4.55; R=3.08	2.00E-04	1.60E-03
MIR-124A	TGCCTTA	23	26088 23621 80155 55082 345557 57590 8065 55752 9331 134553 9733 7003 133619 5411 23022 9857 10000 6263 8473 81493 7029 9818 6789	C=535; O=23; E=10.31; R=2.23	3.00E-04	2.10E-03
MIR-200A	CAGTGTT	16	23040 23621 26118 23389 22809 4154 3725 7150 6421 23271 23760 867 6651 23060 8473 11127	C=304; O=16; E=5.86; R=2.73	3.00E-04	2.10E-03
MIR-30A-5P,MIR-30C, MIR-30D,MIR-30B, MIR-30E-5P	TGTTTAC	24	9522 29855 26057 7072 345557 10725 2589 51465 4297 1130 8819 9331 10645 206358 80267 9749 5411 6659 54842 22862 6651 25778 27436 9644	C=567; O=24; E=10.93; R=2.20	3.00E-04	2.10E-03

Resultats capítol 4. Article 6

MIR-524	CTTTGTA	20	10163 57634 25831 80829 80155 3725 10265 7126 219333 7091 80821 7003 6924 6659 6651 23060 55677 7528 58516 9818	C=427; O=20; E=8.23; R=2.43	3.00E-04	2.10E-03
MIR-18A,MIR-18B	GCACCTT	9	23321 26118 10725 55704 23271 6651 4087 254065 6789	C=114; O=9; E=2.20; R=4.10	4.00E-04	2.70E-03
MIR-186	ATTCTTT	14	23040 331 80155 55082 4154 10725 134553 9877 5411 8507 22862 7175 64062 7528	C=259; O=14; E=4.99; R=2.80	5.00E-04	3.10E-03
MIR-512-3P	CAGCACT	10	23040 23321 80829 331 4154 4297 168850 58508 4087 7029	C=146; O=10; E=2.81; R=3.55	5.00E-04	3.10E-03
MIR-381	CTTGAT	12	29855 23389 5862 55082 10513 55752 1108 83737 10771 6659 51199 10492	C=201; O=12; E=3.87; R=3.10	6.00E-04	3.40E-03
MIR-513	CCTGTGA	9	9887 55737 8555 84922 23524 7091 8507 2260 8473	C=121; O=9; E=2.33; R=3.86	6.00E-04	3.40E-03
MIR-188	AAGGGAT	7	7798 80829 4154 96459 3609 9749 6659	C=74; O=7; E=1.43; R=4.91	6.00E-04	3.40E-03
MIR-380-3P	ATTACAT	8	55082 4154 8065 55137 168850 22862 64062 3685	C=100; O=8; E=1.93; R=4.15	7.00E-04	3.80E-03
MIR-153	CTATGCA	12	659 2186 55284 55752 6421 10645 1184 23060 6263 7029 7799 9818	C=211; O=12; E=4.07; R=2.95	8.00E-04	4.30E-03
MIR-199A,MIR-199B	ACACTGG	10	80829 55082 10513 867 9669 5903 6249 28996 9644 6789	C=155; O=10; E=2.99; R=3.35	9.00E-04	4.40E-03
MIR-205	ATGAAGG	10	2186 9887 10725 55752 5469 168850 9331 7003 23271 23060	C=155; O=10; E=2.99; R=3.35	9.00E-04	4.40E-03
MIR-432	CTCCAAG	7	7798 80829 23621 10725 9878 27436 10611	C=80; O=7; E=1.54; R=4.54	9.00E-04	4.40E-03
MIR-493	ATGTACA	15	26057 23389 55740 51429 3725 8065 5514 96459 55137 168850 7091 54842 8028 29028 23196	C=307; O=15; E=5.92; R=2.53	1.00E-03	4.80E-03
MIR-346	GGCAGAC	5	4154 8503 7536 23060 8473	C=41; O=5; E=0.79; R=6.33	1.10E-03	5.10E-03
MIR-101	GTA CTGT	13	26057 26118 2119 4154 29123 4297 343099 80267 867 25778 8473 9644 6789	C=252; O=13; E=4.86; R=2.68	1.30E-03	5.90E-03
MIR-433	ATCATGA	8	9522 2186 7072 2589 7150 4943 6249 55161	C=111; O=8; E=2.14; R=3.74	1.40E-03	6.20E-03
MIR-105	GCATTTG	10	5862 8082 9643 4297 8861 22862 6651 8473 7799 23196	C=167; O=10; E=3.22; R=3.11	1.50E-03	6.30E-03
MIR-448	ATATGCA	11	5565 55284 23451 23389 10513 1130 26135 1184 5903 64062 6789	C=196; O=11; E=3.78; R=2.91	1.50E-03	6.30E-03
MIR-214	CCTGCTG	12	7798 23621 80155 10618 83737 6433 4943 55074 867 23060 8028 6599	C=228; O=12; E=4.40; R=2.73	1.60E-03	6.60E-03
MIR-9	TAGCTTT	12	55284 55740 51773 3267 800 29843 10771 7021 7003 6659 10000 6789	C=231; O=12; E=4.45; R=2.69	1.80E-03	7.10E-03
MIR-302C	ATGTTAA	12	23451 4154 10725 23008 7398 64746 7003 9749 6651 7528 23196 55161	C=231; O=12; E=4.45; R=2.69	1.80E-03	7.10E-03
MIR-26A,MIR-26B	TACTTGA	14	57634 80155 23389 22808 96459 26135 91452 8507 7915 9857 57542 9644 23196 55161	C=295; O=14; E=5.69; R=2.46	1.90E-03	7.30E-03
MIR-518A-2	TTTGCAG	11	26057 25831 5565 331 23389 3267 7536 83737 5411 58508 58517	C=204; O=11; E=3.93; R=2.80	2.10E-03	7.90E-03
MIR-324-5P	GGGATGC	5	80829 10725 8065 54856 56987	C=48; O=5; E=0.93; R=5.40	2.20E-03	8.00E-03
MIR-506	GTGCCTT	25	29855 26118 80155 55740 4090 345557 10725 55737 8555 7398 4297 7091 3030 7003 5339 79982 134492 867 23022 23060 6263 11127 9644 7799 6789	C=696; O=25; E=13.42; R=1.86	2.20E-03	8.00E-03
MIR-10A,MIR-10B	ACAGGGT	8	23321 80155 10725 10513 2589 55137 10771 6651	C=120; O=8; E=2.31; R=3.46	2.30E-03	8.20E-03
MIR-499	AGTCTTA	6	29855 55082 7150 27436 57542 58516	C=73; O=6; E=1.41; R=4.26	2.80E-03	9.40E-03
MIR-23A,MIR-23B	AATGTGA	17	26118 331 80155 345557 6935 96459 64388 7150 94104 7003 9749 23022 51199 58517 51719 9644 6789	C=412; O=17; E=7.94; R=2.14	2.80E-03	9.40E-03
MIR-320	CAGCTTT	12	80829 9887 55740 10643 800 26135 5927 23271 23022 6651 8473 51719	C=243; O=12; E=4.68; R=2.56	2.80E-03	9.40E-03

Resultats capítol 4. Article 6

MIR-520A,MIR-525	CTCTGGA	9	80829 2119 80155 4297 6651 83439 8473 58516 9818	C=153; O=9; E=2.95; R=3.05	2.90E-03	9.50E-03
MIR-133A,MIR-133B	GGGACCA	10	23077 23321 80829 56853 10725 9728 29843 6433 867 5903	C=186; O=10; E=3.59; R=2.79	3.40E-03	0.011
MIR-520G,MIR-520H	CACTTTG	11	55284 80829 10618 7126 29843 219333 7091 8507 22862 51199 58516	C=220; O=11; E=4.24; R=2.59	3.70E-03	0.0117
MIR-144	ATACTGT	10	7204 80155 10513 168850 55704 64746 22862 6651 51199 58516	C=195; O=10; E=3.76; R=2.66	4.70E-03	0.0147
MIR-511	AAAGACA	10	23321 5862 10643 8503 80267 27436 9857 64062 7528 58516	C=197; O=10; E=3.80; R=2.63	5.00E-03	0.0153
MIR-376A,MIR-376B	TCTATGA	6	2186 56853 55740 5514 10771 9818	C=83; O=6; E=1.60; R=3.75	5.40E-03	0.0163
MIR-338	ATGCTGG	7	23077 26088 26118 55082 9643 9728 23196	C=111; O=7; E=2.14; R=3.27	5.70E-03	0.0166
MIR-496	CATGTAA	9	23040 55284 7072 55186 55752 9331 79982 55161 5885	C=169; O=9; E=3.26; R=2.76	5.60E-03	0.0166
MIR-409-3P	AACATTC	8	51773 3725 51465 168850 1130 80267 8473 51495	C=140; O=8; E=2.70; R=2.96	5.80E-03	0.0167
LET-7A,LET-7B,LET-7C, LET-7D,LET-7E,LET-7F, MIR-98,LET-7G,LET-7I	CTACCTC	15	345557 10643 2589 96459 1108 55137 6433 80267 867 22862 222236 5903 6599 7799 8161	C=379; O=15; E=7.31; R=2.05	7.10E-03	0.0201
MIR-495	GTTTGTT	11	23040 29855 9643 10725 10513 3725 3609 5411 867 27436 8473	C=243; O=11; E=4.68; R=2.35	7.80E-03	0.0217
MIR-370	CAGCAGG	8	80155 9887 4297 84914 10771 3609 8473 373863	C=150; O=8; E=2.89; R=2.77	8.70E-03	0.0238
MIR-324-3P	GGCAGTG	6	10163 26118 2119 23008 6421 7150	C=92; O=6; E=1.77; R=3.38	8.80E-03	0.0238
MIR-342	GTGTGAG	5	659 29855 4297 10645 7029	C=67; O=5; E=1.29; R=3.87	9.40E-03	0.025
MIR-522	ACCATTT	8	23077 4154 3725 51465 7150 9877 8507 10492	C=155; O=8; E=2.99; R=2.68	0.0105	0.0275
MIR-151	AGTCTAG	3	7419 55752 51290	C=24; O=3; E=0.46; R=6.48	0.0107	0.0277
MIR-517	TCTAGAG	4	55082 9728 25820 3609	C=46; O=4; E=0.89; R=4.51	0.0117	0.0298
MIR-221,MIR-222	ATGTAGC	7	3267 22846 10265 51465 4297 22862 8473	C=129; O=7; E=2.49; R=2.81	0.0126	0.0317
MIR-148A,MIR-152,MIR-148B	TGCACTG	12	55284 2119 80155 55082 3267 8065 8503 4297 7003 9749 8028 81688	C=298; O=12; E=5.74; R=2.09	0.0133	0.033
MIR-136	AATGGAG	5	2186 345557 29123 5892 23196	C=75; O=5; E=1.45; R=3.46	0.0149	0.0364
MIR-183	GTGCCAT	8	55740 4154 64388 7091 7430 27436 8473 6749	C=169; O=8; E=3.26; R=2.46	0.017	0.041
MIR-365	GGGCATT	6	26057 29123 6645 8861 10000 58516	C=107; O=6; E=2.06; R=2.91	0.0175	0.0417
MIR-196A,MIR-196B	ACTACCT	7	10643 96459 10771 6433 5903 6599 64062	C=141; O=7; E=2.72; R=2.58	0.0196	0.0461
MIR-142-5P	ACTTTAT	11	55082 51773 10725 10643 55137 7091 80821 206358 22862 25778 6651	C=284; O=11; E=5.47; R=2.01	0.0224	0.0488
MIR-34B	ACTGCCT	9	23077 23321 10725 5514 392 6433 59338 6659 7029	C=211; O=9; E=4.07; R=2.21	0.0216	0.0488
MIR-198	TCTGGAC	5	23389 10618 23008 55137 83439	C=82; O=5; E=1.58; R=3.16	0.0211	0.0488
MIR-202	ATACCTC	8	55284 80155 23389 2589 800 9877 11214 867	C=178; O=8; E=3.43; R=2.33	0.0224	0.0488
MIR-451	AACGGTT	2	8473 51719	C=12; O=2; E=0.23; R=8.65	0.0215	0.0488
MIR-21	ATAAGCT	6	55082 4154 91452 6433 59338 57542	C=113; O=6; E=2.18; R=2.75	0.0223	0.0488
MIR-378	GTCAGGA	4	55284 55704 10645 8473	C=56; O=4; E=1.08; R=3.71	0.0227	0.0489

*Number of predicted target genes; #p-value from hypergeometric test; & Adjusted p-value by Benjamini & Hochberg correction; C: number of reference genes in the category; O: number of genes in the gene set and in the category; E: expected number in the category; R: Ratio of enrichment. In bold miRNAs selected for further analysis.

Supplementary table 2. Primer sequences used in qRT-PCR assays.

miRNA	miRNA sequence	Primer sequence (5'→3')
hsa-124-3p	uaaggcacgcggugaaugcc	taaggcacgcggtgaatgcc
hsa-124-5p	cguguucacagcggaccuugau	cgtgttcacagcggaccttgat
hsa-miR-9-5p	ucuuugguuauacuagcuguauga	tctttggttatctagctgtatg
hsa-miR-9-3p	auaaagcuagauaacgaaagu	ataaagctagataaccgaaagt
hsa-miR-369-3p	aaauuacaugguugaucuuu	gaataatacatggttgatcttt
hsa-miR-137	uuauugcuuaagaauacgcguag	ttattgcttaagaatacgcgta
hsa-miR-186-5p	caaagaauucuccuuuugggcu	caaagaattctcctttgggc
hsa-miR-101-3p	uacaguacugugauaacugaa	tacagtactgtgataactgaa
hsa-miR-153-3p	uugcauagucacaaaagugauc	ttgcatagtcacaaaagtgatc
hsa-miR-105-5p	ucaaaugcucagacuccuguggu	tcaaatgctcagactcctgtg

Article 7:

“Identificació de gens i vies comunes alterades per l’efecte de la cocaïna en estudis de transcriptòmica en humans”.

Resum:

La cocaïna és la segona droga il·legal més consumida a Europa. Diversos estudis realitzats en mostres humanes han avaluat l’efecte de la cocaïna sobre l’expressió gènica, que podria tenir un paper rellevant en els canvis neuroadaptatius que donen lloc a l’addicció. En aquest treball hem combinat dades de diferents estudis realitzats en mostres humanes amb l’objectiu d’identificar gens i vies afectades per la cocaïna. Per això, hem obtingut dades de quatre estudis, tres realitzats en diferents àrees cerebrals *post-mortem* d’individus que han abusat de cocaïna i un en un model cel·lular dopaminèrgic en cultiu. Combinant aquestes dades hem identificat diversos gens que apareixen en més d’un estudi, tres dels quals s’han identificat en tres dels quatre estudis: *SON* (un factor de *splicing* de RNA essencial pel desenvolupament del cervell i el metabolisme), *BEX1* (que codifica una proteïna que relaciona la senyalització de neurotrofines amb el cicle cel·lular) i *ATP50* (una proteïna mitocondrial). A més, en tots els estudis hem pogut identificar enriquiment de gens en tres vies canòniques implicades en funcions cerebrals: *Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP signaling*, Senyalització nNOS en neurones, i Potenciació sinàptica a llarg termini. Els gens i les vies identificades en aquest estudi faciliten la comprensió dels mecanismes genètics subjacents a la dependència de cocaïna, i podrien ser bones dianes per desenvolupar teràpies farmacològiques.

Referència

Noèlia Fernández-Castillo, Judit Cabana-Domínguez, Concepció Arenas, Alejandro Arias-Vàsquez, Bru Cormand. *Common genes and pathways altered by cocaine in transcriptomic studies in humans*. The World Journal of Biological Psychiatry (sotmès).

Common genes and pathways altered by cocaine in transcriptomic studies in humans

Noèlia Fernández-Castillo^{1,2,3,4}, Judit Cabana-Domínguez^{1,2,3,4}, Concepció Arenas¹, Alejandro Arias-Vàsquez⁵, Bru Cormand^{1,2,3,4}

¹Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Spain

³Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Catalonia, Spain

⁴Institut de Recerca Sant Joan de Déu (IR-SJD), Esplugues de Llobregat, Catalonia, Spain

⁵Department of Psychiatry & Human Genetics, Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

CORRESPONDING AUTHOR

Noèlia Fernández Castillo. Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Avinguda Diagonal 643, edifici Prevesti, 3^a planta, 08028, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: (+34) 93 4037082. Fax: (+34) 93 4034420; Email: noefernandez@ub.edu

Keywords: cocaine, transcriptomics, gene expression, postmortem brain, pathways

Abstract

Objectives: Cocaine is the second most used illegal drug in Europe. Different studies have assessed gene expression changes induced by cocaine in human samples, which may play an important role in the stable brain changes that underlie addiction. Here we aim at elucidating human genes and pathways altered by cocaine by combining different sources of data.

Methods: We gathered information from three performed in post-mortem brain samples of cocaine abusers and one in a dopaminergic cellular, and assessed the genes overlaps and enrichment of functions and pathways between them.

Results: We identified several differentially expressed genes that overlap across studies, three of which were found in three studies: *SON* (RNA splicing factor essential for brain development and metabolism), *BEX1* (encodes a protein that links the neurotrophin signaling and cell cycle) and *ATP5O* (encoding a mitochondrial protein). Interestingly, three canonical pathways that are related to brain function were enriched in all four studies: Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP signaling, nNOS Signaling in Neurons, and Synaptic Long Term potentiation.

Conclusions: The genes and pathways identified shed some light into the understanding of the genetic mechanisms underlying this disorder and might be useful for the development of potential pharmacological therapies.

Introduction

Cocaine addiction is a major health problem worldwide and so far, there is no effective treatment available. The effects of cocaine on mood and performance range from euphoria, exhilaration and less fatigue when working, at lower doses, to intense euphoria and feeling “driven”. Its use induces changes in the structure and function of the brain, such as neuronal connectivity and synaptic plasticity. Some of these changes may become stable, contributing to addiction. Gene expression changes are on the basis of these neuroadaptations induced by the drug and help to explain functional alterations (Zhou *et al.* 2014).

In humans, previous studies assessing alterations in gene expression in postmortem samples from cocaine abusers have revealed changes in diverse cellular functions like cell adhesion, transcription factors, ion transport and receptors, chromosome remodelling, stress and immune response, apoptosis and mitochondrial response. However, the results obtained are somewhat divergent, maybe due to the influence of other factors such as the last time of cocaine exposure (Lehrmann *et al.* 2003) or the brain area studied: Prefrontal cortex (Lehrmann *et al.* 2003; Lehrmann *et al.* 2006), Nucleus accumbens (Albertson *et al.* 2004), dopaminergic regions (ventral tegmental area (VTA) and substantia nigra (SN)) (Bannon *et al.* 2014) and Hippocampus (Mash *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2011).

The effects of cocaine on human gene expression has also been evaluated in human cells in vitro. In a dopaminergic neuron-like model changes in gene expression were related to regulation of transcription, cell cycle adhesion, cell projection and neuroadaptations (Fernández-Castillo *et al.* 2015). On the other hand, human neuronal progenitor cells showed alterations in the expression of genes involved in immunomodulation and inflammation when exposed to cocaine (Crawford *et al.* 2006).

In the present study, we aimed at integrating transcriptomic data from different human studies in order to identify common genes and pathways that could help to characterize critical molecular mechanisms that underlie cocaine addiction.

Material and methods

Literature searches

To select studies assessing the effect of cocaine on gene expression at a transcriptomic level we performed a search in PubMed using the terms “cocaine AND microarray” OR “cocaine AND RNA seq”, obtaining 82 articles (until January 2017). We filtered articles assessing gene expression transcriptome-wide, and performed in human samples or cell lines, ending up with 6 studies that fit these criteria

(Albertson *et al.* 2004; Crawford *et al.* 2006; Mash *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2011; Bannon *et al.* 2014; Fernàndez-Castillo *et al.* 2015). We asked the authors of these studies to provide us with the data of genes showing significant differential expression and could finally gather information for a total of four studies, ours among them. Of these, three assessed gene expression using microarrays (Albertson *et al.* 2004; Bannon *et al.* 2014; Fernàndez-Castillo *et al.* 2015) and one with RNAseq (Zhou *et al.* 2011).

Gene lists and bioinformatic analyses

Since each study applied a different false discovery rate threshold (2, 5 or 10% FDR) for obtaining the differentially expressed genes, we considered a common significance threshold for all of them of raw $p < 5e-04$. Gene overlap between the four lists was assessed using one-tailed Fisher's exact tests. Another gene list was built with the genes showing two or more occurrences across the four gene lists of the previous studies. Gene lists were subjected to bioinformatics analyses using Ingenuity Pathway Analyses software (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>; Ingenuity Systems, Redwood city, CA, USA) for canonical pathways enrichment and for gene-gene interaction networks. We compared the canonical pathways enriched in each gene list considering a significance threshold of $p < 0.05$ and reporting only those identified in all lists.

Results

The four gene lists obtained from the different transcriptomic studies included 482 genes showing significant differential expression in Nucleus Accumbens (NAc) (Albertson *et al.* 2004), 1149 in dopamine cell-enriched regions (DA regions, including VTA and SN) (Bannon *et al.* 2014), and 108 in hippocampus (Hipp) (Zhou *et al.* 2011), all of them identified in human postmortem brain samples of cocaine abusers, and 168 genes differentially expressed in dopaminergic neuron-like cells in vitro (DA neuron-like cells) (Fernàndez-Castillo *et al.* 2015).

Comparing the four gene lists, a total of 134 genes were present in two or more lists. The genes *SON*, *BEX1*, *ATP5O* were differentially expressed in three of the lists (Figure 1, Supplementary table 1). *SON* was upregulated in NAc, DA regions and DA neuron-like cells, *BEX1* was downregulated in NAc, DA regions and Hipp, and *ATP5O* was upregulated in NAc and downregulated in DA regions and Hipp. Significant overlaps between gene lists after applying the F-Fisher test included 101 genes in common between NAc and DA regions ($p = 2.2e-16$) and 12 in common between NAc and DA neuron-like cells ($p = 7.9e-04$) (Figure 1, Supplementary Table 1).

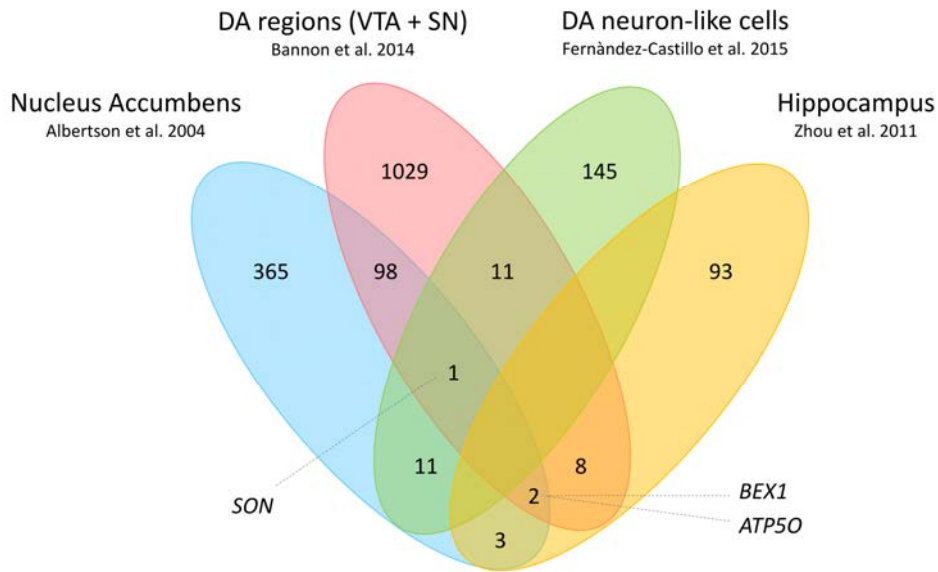


Figure 1. Venn diagram showing gene overlaps among the four gene lists of differentially expressed genes by cocaine. Three genes were differentially expressed in three different studies: *SON*, *BEX1*, *ATP50*. Significant overlaps included 101 genes in common between Nucleus accumbens (NAc) and dopaminergic (DA) regions ($p = 2.2e-16$) and 12 genes in common between NAc and DA neuron-like cells ($p = 7.9e-04$). VTA: ventral tegmental area; SN: substantia nigra.

Bioinformatical analyses, performed in the four lists of differential expressed genes (NAc, DA regions, DA neuron-like cells and Hipp) as well as in the list of two or more occurrences (134 genes), revealed interesting enriched functional networks and canonical pathways. From the top networks obtained for each of the four gene lists, five networks were related to “Neurological Disease”, identified in three different gene lists (NAc, DA regions and DA neuron-like cells), four involved in “Cell death and survival” were identified in three gene lists (NAc, DA regions and Hipp) and three related to “Cell-to-cell signaling” in two gene lists (NAc and Hipp) (Supplementary Table 2). Furthermore, when considering the 134 genes with at least two occurrences, the top networks included two related also to “Neurological Disease” and one related to “Cell-to-cell” signaling. Interestingly, the top network includes the *BEX1* gene (Figure 2).

A total of 31 canonical pathways were significantly enriched for at least three of the four gene sets, being Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Phosphorylation the two top ranked ones in terms of enrichment p-value (Supplementary Table 3). From those 31 canonical pathways, three pathways should be highlighted for being enriched in all four gene lists (NAc, DA regions, DA neuron-like cells and Hipp): Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling, nNOS Signaling in Neurons, and Synaptic Long Term Potentiation (Table 1). Also, these three pathways were also enriched in the set of 134 genes with two or more occurrences.

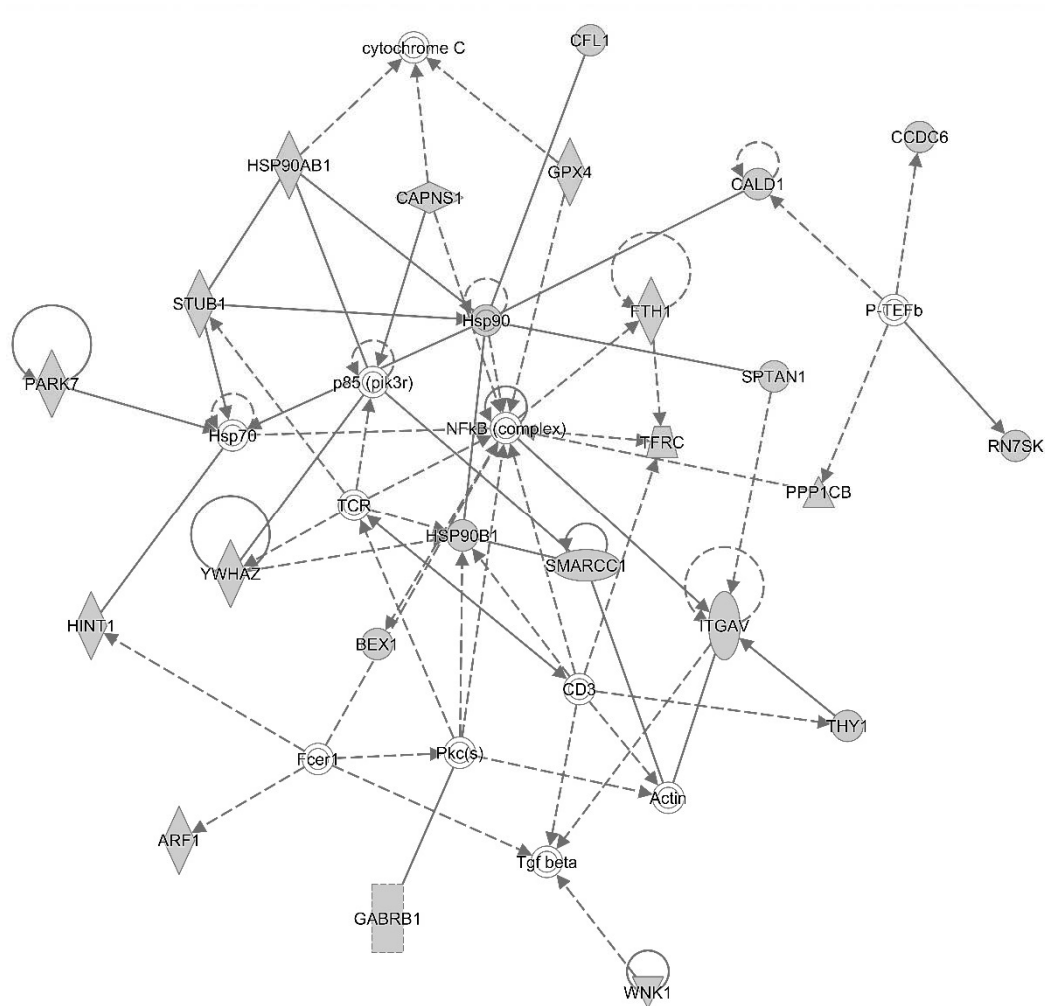


Figure 2. IPA network analysis of the 134 genes with two or more occurrences in the gene lists. The top network identified is involved in Neurological Disease, Skeletal and Muscular Disorders, Organismal Injury and Abnormalities (score 41, 24 genes).

Table 1. Significantly enriched canonical pathways shared by all four cocaine transcriptomic studies.

Canonical Pathways	Nucleus	DA regions	DA neuron-like	Hippocampus
	Accumbens <i>Albertson et al. 2004</i>	<i>Bannon et al. 2014</i>	cells <i>Fernández- Castillo et al. 2015</i>	<i>Zhou et al. 2011</i>
Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling	2.82E-02	7.94E-03	1.48E-03	3.02E-02
nNOS Signaling in Neurons	3.80E-03	9.77E-05	4.90E-02	1.66E-02
Synaptic Long Term Potentiation	1.45E-03	1.82E-02	2.24E-03	1.38E-02

The numbers in the table correspond p-values of enrichment assessed by Fisher’s exact test.

Discussion

We combined data from different studies that assess transcriptomic changes in humans induced by cocaine. We identified common genes and pathways differentially expressed by this drug in different brain regions or cell types.

Three genes were identified to be differentially expressed in three different gene lists: *SON*, *BEX1*, *ATP5O*. The *SON* gene encodes the SON DNA binding protein, which acts as an RNA splicing factor. SON is an essential mediator of constitutive and alternative splicing, involved in cell-cycle progression and normal tissue growth and development (Ahn *et al.* 2011). Defects in this protein result in alterations in neurodevelopment causing intellectual disability (Kim *et al.* 2016; Tokita *et al.* 2016). *BEX1* encodes the brain-expressed X-linked 1 protein that acts as a tumor suppressor. It has been mostly studied in cancer, but little is known about its function in the brain, although it has been reported to be involved in axonal regeneration, neuronal differentiation, and also in linking neurotrophin signaling with cell cycle (Vilar *et al.* 2006; Khazaei *et al.* 2010). Thus, it may participate in cocaine-induced neuroadaptations. *ATP5O* encodes the ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP, present in the mitochondrial matrix. Cocaine induce oxidative stress and mitochondrial dysfunction in multiple tissues (Graziani *et al.* 2017). It has been suggested that oxidative stress induced by cocaine in rats play a relevant role in the cocaine-induced disruption of the CNS (Poon *et al.* 2007). Consistent with the function of *ATP5O*, the two most enriched pathways found in our analysis, which are highlighted in three of the four gene lists, were Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Phosphorylation. Also, in human neuronal progenitor cells, cocaine-induced oxidative stress precedes cell death (Poon *et al.* 2007). Unfortunately, we did not have access to gene expression data of a previous study assessing cocaine effects on human neuronal progenitor cells to assess whether this gene was also differentially expressed (Crawford *et al.* 2006).

Interestingly, nuclear factor kappa B (*NF-κB*) is a hub network gene of the top network obtained with the list of genes showing at least two occurrences (Figure 2). *NF-κB* is a transcription factor best studied for its key role in immune response, but it has also been related to synaptic plasticity that underlies memory, learning and drug addiction (Crews *et al.* 2011; Engelmann and Haenold 2016; Nennig and Schank 2017). Several studies have demonstrated that cocaine activates *NF-κB*, increasing the number of dendritic spines in NAc neurons in rats (Ang *et al.* 2001; Russo *et al.* 2009).

Another interesting result obtained are the three canonical pathways identified enriched in all four gene lists from NAc, DA regions, DA neuron-like cells and Hipp, suggesting common molecular mechanisms of cocaine in different brain regions and cell types.

One of these pathways is crucial in dopaminergic neurotransmission, the Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling pathway. Cocaine blocks the dopamine transporter increasing its levels in the synaptic cleft, and its reward and reinforcing effects are mainly mediated by the dopaminergic neurotransmission (Pettit and Justice 1989; Volkow *et al.* 1997). DARPP-32 plays an important role in mediating and modulating short-term -and maybe also long-term- actions of drugs of abuse

(Svenningsson *et al.* 2005). Previous studies reported the regulation of DARPP-32 by cocaine and other psychoactive drugs in the striatum (Borgkvist and Fisone 2007). DARPP-32, through this signaling pathway, is likely to be involved in transcription changes that are important for the neuroadaptations induced by cocaine and other drugs of abuse (Svenningsson *et al.* 2005).

Long-term potentiation (LTP) is important for memory and learning processes associated with drugs of abuse and with the development of addiction (Wolf *et al.* 2004; Pittenger 2013). Cocaine exposure has been reported to alter long-term potentiation in the VTA and Hipp of rats (Thompson *et al.* 2005; Sarti *et al.* 2007), and our results show that cocaine probably alters LTP also in these two brain regions in humans, as well as in the NAc. Also, cocaine withdrawal has been shown to enhance LTP in the Hipp of rats (Guan *et al.* 2009). Long term potentiation, together with MAPK signaling, were previously highlighted to be altered by cocaine in gene expression studies in human and animal studies (Lull *et al.* 2008).

The last pathway, nNOS signaling in neurons, is involved in modulating different functions, such as synaptic plasticity, learning, memory and neurogenesis (Zhou and Zhu 2009). But also, abnormal nNOS expression seem to contribute to different neurodegenerative pathologies, including Alzheimer's and Parkinson's disease and excitotoxicity following stroke (Steinert *et al.* 2010). It has been reported that this pathway participates in different aspects of cocaine addiction, such as regulation of dopamine transporter (DAT) activity in rat striatum (Volz and Schenk 2004), cocaine sensitization (Itzhak *et al.* 1998), conditioned place preference (Itzhak and Anderson 2007; Itzhak *et al.* 2010) and cocaine self-administration behavior (Collins and Kantak 2002; Orsini *et al.* 2002). Furthermore, a recent study demonstrate the key role of the nNOS pathway in the development of cocaine sensitization and the associated hippocampal alterations in rats (Gabach *et al.* 2013). Also, nNOS interneurons regulate cocaine relapse in the NAc of rodents (Smith *et al.* 2017). All the above pathways altered by cocaine in different brain regions are likely to play a role in mediating the effects of the drug and in the long-term adaptations that occur in the brain of cocaine abusers.

In conclusion, our study highlighted three novel genes and three pathways altered by cocaine in different brain regions of postmortem cocaine abusers and in dopaminergic cells treated with the drug. These may play a relevant role in the neuroadaptations induced by cocaine and in the transition from use to addiction.

Acknowledgements

Major financial support for this research was received from EMBO short-term fellowship (ASTF 573-2016). NF-C was supported by 'Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras' (CIBERER) and JC-D by 'Generalitat de Catalunya' (2015 FI_B 00448). The research leading to these

results has also received funding from the Spanish 'Ministerio de Economía y Competitividad' (SAF2015-68341-R), AGAUR, 'Generalitat de Catalunya' (2017-SGR-738), the European Union Seventh Framework Program [FP7/2007-2013] under grant agreement n° 602805 (Aggressotype) and from the European Union H2020 Program [H2020/2014-2020] under grant agreement n° 667302 (CoCA).

References

- Ahn E-Y, DeKolver RC, Lo M-C, Nguyen TA, Matsuura S, Boyapati A, et al. 2011. SON controls cell-cycle progression by coordinated regulation of RNA splicing. *Mol. Cell* 42:185–198.
- Albertson DN, Pruetz B, Schmidt CJ, Kuhn DM, Kapatos G, Bannon MJ. 2004. Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. *J. Neurochem.* 88:1211–1219.
- Ang E, Chen J, Zagouras P, Magna H, Holland J, Schaeffer E, et al. 2001. Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J. Neurochem.* 79:221–224.
- Bannon MJ, Johnson MM, Michelhaugh SK, Hartley ZJ, Halter SD, David JA, et al. 2014. A molecular profile of cocaine abuse includes the differential expression of genes that regulate transcription, chromatin, and dopamine cell phenotype. *Neuropsychopharmacology* 39:2191–2199.
- Borgkvist A, Fisone G. 2007. Psychoactive drugs and regulation of the cAMP/PKA/DARPP-32 cascade in striatal medium spiny neurons. *Neurosci Biobehav Rev* 31:79–88.
- Collins SL, Kantak KM. 2002. Neuronal nitric oxide synthase inhibition decreases cocaine self-administration behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 159:361–369.
- Crawford FC, Wood ML, Wilson SE, Mathura VS, Hollen TR, Geall F, et al. 2006. Cocaine induced inflammatory response in human neuronal progenitor cells. *J. Neurochem.* 97:662–674.
- Crews FT, Zou J, Qin L. 2011. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav. Immun.* 25 Suppl 1:S4–S12.
- Engelmann C, Haenold R. 2016. Transcriptional Control of Synaptic Plasticity by Transcription Factor NF- κ B. *Neural Plast.* 2016:7027949.
- Fernández-Castillo N, Cabana-Domínguez J, Soriano J, Sánchez-Mora C, Roncero C, Grau-López L, et al. 2015. Transcriptomic and genetic studies identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence. *Transl Psychiatry* 5:e667.
- Gabach LA, Carlini VP, Monti MC, Maglio LE, De Barioglio SR, Perez MF. 2013. Involvement of nNOS/NO/sGC/cGMP signaling pathway in cocaine sensitization and in the associated hippocampal alterations: does phosphodiesterase 5 inhibition help to drug vulnerability? *Psychopharmacology (Berl.)* 229:41–50.
- Graziani M, Sarti P, Arese M, Magnifico MC, Badiani A, Saso L. 2017. Cardiovascular Mitochondrial Dysfunction Induced by Cocaine: Biomarkers and Possible Beneficial Effects of Modulators of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2017:3034245.
- Guan X, Zhang R, Xu Y, Li S. 2009. Cocaine withdrawal enhances long-term potentiation in rat hippocampus via changing the activity of corticotropin-releasing factor receptor subtype 2. *Neuroscience* 161:665–670.
- Itzhak Y, Ali SF, Martin JL, Black MD, Huang PL. 1998. Resistance of neuronal nitric oxide synthase-deficient mice to cocaine-induced locomotor sensitization. *Psychopharmacology (Berl.)* 140:378–386.
- Itzhak Y, Anderson KL. 2007. Memory reconsolidation of cocaine-associated context requires nitric oxide signaling. *Synapse* 61:1002–1005.
- Itzhak Y, Roger-Sánchez C, Kelley JB, Anderson KL. 2010. Discrimination between cocaine-associated context and cue in a modified conditioned place preference paradigm: role of the nNOS gene in cue conditioning. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13:171–180.
- Khazaei MR, Halfter H, Karimzadeh F, Koo JH, Margolis FL, Young P. 2010. Bex1 is involved in the regeneration of axons after injury. *J. Neurochem.* 115:910–920.
- Kim J-H, Shinde DN, Reijnders MRF, Hauser NS, Belmonte RL, Wilson GR, et al. 2016. De Novo Mutations in SON Disrupt RNA Splicing of Genes Essential for Brain Development and Metabolism, Causing an Intellectual-Disability Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 99:711–719.

- Lehrmann E, Colantuoni C, Deep-Soboslay A, Becker KG, Lowe R, Huestis MA, et al. 2006. Transcriptional changes common to human cocaine, cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS ONE* 1:e114.
- Lehrmann E, Oyler J, Vawter MP, Hyde TM, Kolachana B, Kleinman JE, et al. 2003. Transcriptional profiling in the human prefrontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse. *Pharmacogenomics J.* 3:27–40.
- Lull ME, Freeman WM, Vrana KE, Mash DC. 2008. Correlating human and animal studies of cocaine abuse and gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1141:58–75.
- Mash DC, French-Mullen J, Adi N, Qin Y, Buck A, Pablo J. 2007. Gene expression in human hippocampus from cocaine abusers identifies genes which regulate extracellular matrix remodeling. *PLoS ONE* 2:e1187.
- Nennig SE, Schank JR. 2017. The Role of NFkB in Drug Addiction: Beyond Inflammation. *Alcohol Alcohol.* 52:172–179.
- Orsini C, Izzo E, Koob GF, Pulvirenti L. 2002. Blockade of nitric oxide synthesis reduces responding for cocaine self-administration during extinction and reinstatement. *Brain Res.* 925:133–140.
- Pettit HO, Justice JB. 1989. Dopamine in the nucleus accumbens during cocaine self-administration as studied by in vivo microdialysis. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34:899–904.
- Pittenger C. 2013. Disorders of memory and plasticity in psychiatric disease. *Dialogues Clin Neurosci* 15:455–463.
- Poon HF, Abdullah L, Mullan MA, Mullan MJ, Crawford FC. 2007. Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. *Neurochem. Int.* 50:69–73.
- Russo SJ, Wilkinson MB, Mazei-Robison MS, Dietz DM, Maze I, Krishnan V, et al. 2009. Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J. Neurosci.* 29:3529–3537.
- Sarti F, Borgland SL, Kharazia VN, Bonci A. 2007. Acute cocaine exposure alters spine density and long-term potentiation in the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* 26:749–756.
- Smith ACW, Scofield MD, Heinsbroek JA, Gipson CD, Neuhofer D, Roberts-Wolfe DJ, et al. 2017. Accumbens nNOS Interneurons Regulate Cocaine Relapse. *J. Neurosci.* 37:742–756.
- Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. 2010. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 16:435–452.
- Svenningsson P, Nairn AC, Greengard P. 2005. DARPP-32 mediates the actions of multiple drugs of abuse. *AAPS J* 7:E353-360.
- Thompson AM, Swant J, Wagner JJ. 2005. Cocaine-induced modulation of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neuropharmacology* 49:185–194.
- Tokita MJ, Braxton AA, Shao Y, Lewis AM, Vincent M, Küry S, et al. 2016. De Novo Truncating Variants in SON Cause Intellectual Disability, Congenital Malformations, and Failure to Thrive. *Am. J. Hum. Genet.* 99:720–727.
- Vilar M, Murillo-Carretero M, Mira H, Magnusson K, Besset V, Ibáñez CF. 2006. Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *EMBO J.* 25:1219–1230.
- Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, et al. 1997. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386:827–830.
- Volz TJ, Schenk JO. 2004. L-arginine increases dopamine transporter activity in rat striatum via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Synapse* 54:173–182.
- Wolf ME, Sun X, Mangiavacchi S, Chao SZ. 2004. Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:61–79.
- Zhou L, Zhu D-Y. 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20:223–230.
- Zhou Z, Enoch M-A, Goldman D. 2014. Gene expression in the addicted brain. *Int. Rev. Neurobiol.* 116:251–273.
- Zhou Z, Yuan Q, Mash DC, Goldman D. 2011. Substance-specific and shared transcription and epigenetic changes in the human hippocampus chronically exposed to cocaine and alcohol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108:6626–6631.

Supplementary Table 1. Gene overlaps across gene lists.

Gene Overlap (N/p-values)	Nucleus Accumbens Albertson et al. 2004	DA regions (VTA-SN) Bannon et al. 2014	DA neuron- like cells Fernández-Castillo et al. 2015	Hippocampus Zhou et al. 2011
Nucleus Accumbens Albertson et al. 2004				
DA regions (VTA-SN) Bannon et al. 2014	101 P=2.2e-16			
DA neuron-like cells Fernández-Castillo et al. 2015	12 P=7.9e-04	12 P=0.259		
Hippocampus Zhou et al. 2011	5 P=0.12	10 P=0.092	0 P=1.0	

The total numbers of genes in each list and the shared numbers of genes across different lists are tabulated. Fisher's exact test was used to evaluate the lists overlap based on ~20,000 total known protein-coding genes in humans. In bold significant overlaps ($p < 0.05$, uncorrected).

Supplementary Table 2. IPA network analysis. Top networks identified for each of the gene lists

Network number	Associated Network Functions	Score
Nucleus Accumbens (Albertson et al. 2004)		
1	Behavior, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function	38
2	Post-Translational Modification, Protein Folding, Cancer	38
3	Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Psychological Disorders	38
4	Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Psychological Disorders	36
5	Cancer, Cell Death and Survival, Organismal Injury and Abnormalities	33
DA regions (Bannon et al. 2014)		
1	Cell Death and Survival, Cellular Assembly and Organization, Cellular Development	36
2	Protein Synthesis, Gene Expression, Neurological Disease	32
3	Cell Death and Survival, RNA Post-Transcriptional Modification, Cell Cycle	30
4	Neurological Disease, Ophthalmic Disease, Organismal Injury and Abnormalities	30
5	Neurological Disease, Organismal Injury and Abnormalities, Psychological Disorders	30
DA neuron-like cells (Fernández-Castillo et al. 2015)		
1	Cancer, Organismal Injury and Abnormalities, Gastrointestinal Disease	39
2	Cell Death and Survival, Gene Expression, Post-Translational Modification	35
3	Cellular Development, Embryonic Development, Organismal Development	32
4	Connective Tissue Disorders, Developmental Disorder, Neurological Disease	20
5	Cell Death and Survival, Cell Cycle, Gene Expression	18
Hippocampus (Zhou et al. 2011)		
1	Gene Expression, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cell Signaling RNA Post-Transcriptional Modification, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cellular	41
2	Growth and Proliferation	22
3	Cell Cycle, Cancer, Gastrointestinal Disease	20
4	Gene Expression, Lipid Metabolism, Molecular Transport	18
5	Endocrine System Disorders, Gastrointestinal Disease, Immunological Disease	18
List of 134 genes with two or more occurrences		
1	Neurological Disease, Skeletal and Muscular Disorders, Organismal Injury and Abnormalities	41
2	Developmental Disorder, Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Nervous System Development and Function	38
3	Cancer, Gastrointestinal Disease, Hepatic System Disease	27
4	Cellular Function and Maintenance, Molecular Transport, Neurological Disease	25
5	Cancer, Gastrointestinal Disease, Organismal Injury and Abnormalities	21

Supplementary Table 3. Significantly enriched canonical pathways in each of the four studies.

Canonical pathway	Nucleus	DA regions	DA neuron-	Hippocampus
	Accumbens Albertson et al. 2004	Bannon et al. 2014	like cells Fernández-Castillo et al. 2015	Zhou et al. 2011
Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling	2.82E-02	7.94E-03	1.48E-03	3.02E-02
nNOS Signaling in Neurons	3.80E-03	9.77E-05	4.90E-02	1.66E-02
Synaptic Long Term Potentiation	1.45E-03	1.82E-02	2.24E-03	1.38E-02
GM-CSF Signaling	2.29E-02	1.10E-02	-	3.72E-02
Mitochondrial Dysfunction	1.51E-09	3.16E-17	-	5.75E-03
Oxidative Phosphorylation	2.40E-09	1.58E-15	-	1.07E-02
14-3-3-mediated Signaling	6.61E-04	2.40E-03	4.68E-04	-
Aldosterone Signaling in Epithelial Cells	4.07E-03	3.31E-05	8.71E-03	-
Androgen Signaling	3.72E-02	3.98E-03	2.04E-04	-
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	1.17E-03	1.38E-07	4.27E-03	-
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	5.13E-05	4.17E-06	4.57E-03	-
Cardiac β -adrenergic Signaling	3.31E-02	2.14E-02	3.89E-03	-
CCR3 Signaling in Eosinophils	8.51E-03	1.45E-02	3.16E-03	-
CDK5 Signaling	6.61E-03	4.47E-04	3.98E-02	-
fMLP Signaling in Neutrophils	1.86E-02	3.16E-03	2.29E-03	-
G Beta Gamma Signaling	1.35E-02	1.32E-02	2.95E-02	-
Glucocorticoid Receptor Signaling	2.75E-02	1.10E-02	3.55E-04	-
GNRH Signaling	2.51E-02	3.02E-02	1.70E-02	-
G α q Signaling	9.55E-03	4.68E-04	7.59E-03	-
IGF-1 Signaling	2.51E-03	4.17E-02	1.29E-03	-
Neuregulin Signaling	3.47E-03	1.32E-02	5.50E-04	-
PI3K Signaling in B Lymphocytes	5.75E-04	5.25E-03	1.62E-02	-
PI3K/AKT Signaling	6.46E-03	5.13E-05	2.57E-03	-
Prolactin Signaling	3.72E-02	2.40E-02	3.63E-03	-
Protein Kinase A Signaling	6.92E-03	5.37E-03	1.02E-02	-
Protein Ubiquitination Pathway	4.79E-03	2.34E-07	7.41E-04	-
Rac Signaling	4.68E-02	2.63E-04	1.20E-02	-
Thrombin Signaling	1.55E-02	6.31E-04	4.57E-03	-
Virus Entry via Endocytic Pathways	2.00E-03	1.86E-03	4.27E-02	-
Xenobiotic Metabolism Signaling	5.13E-03	6.92E-04	2.24E-02	-
α -Adrenergic Signaling	4.47E-02	3.16E-02	2.82E-02	-
Actin Cytoskeleton Signaling	1.32E-02	2.82E-03	-	-
Amyloid Processing	5.37E-03	4.27E-02	-	-
Axonal Guidance Signaling	5.89E-03	1.29E-02	-	-
Cdc42 Signaling	3.31E-02	1.05E-02	-	-
Chemokine Signaling	1.74E-04	2.88E-03	-	-

Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	1.55E-03	1.02E-03	-	-
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	2.29E-02	1.12E-02	-	-
Dopamine Receptor Signaling	2.82E-02	1.17E-04	-	-
EIF2 Signaling	3.16E-48	7.08E-08	-	-
Ephrin Receptor Signaling	4.07E-02	1.32E-03	-	-
Epithelial Adherens Junction Signaling	1.58E-03	2.95E-03	-	-
GABA Receptor Signaling	3.72E-03	6.31E-03	-	-
Gap Junction Signaling	5.37E-06	1.12E-02	-	-
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	1.35E-04	1.23E-03	-	-
Glioma Invasiveness Signaling	1.95E-02	2.63E-03	-	-
Gluconeogenesis I	1.74E-02	7.41E-03	-	-
Glutathione Redox Reactions I	1.23E-02	2.29E-02	-	-
Glutathione-mediated Detoxification	2.57E-02	2.88E-03	-	-
Glycolysis I	1.74E-02	1.78E-04	-	-
G-Protein Coupled Receptor Signaling	1.91E-02	3.55E-02	-	-
Huntington's Disease Signaling	4.37E-02	9.33E-05	-	-
ILK Signaling	3.16E-02	5.50E-05	-	-
Integrin Signaling	1.29E-03	1.70E-03	-	-
mTOR Signaling	1.26E-20	6.46E-05	-	-
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	2.29E-04	2.95E-02	-	-
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	3.98E-04	1.20E-04	-	-
p70S6K Signaling	2.63E-03	1.51E-02	-	-
Phagosome Maturation	7.76E-07	3.31E-06	-	-
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	7.94E-21	1.26E-05	-	-
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	1.29E-04	5.62E-04	-	-
RhoA Signaling	3.98E-04	4.07E-05	-	-
RhoGDI Signaling	1.55E-02	4.57E-08	-	-
Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	1.82E-04	3.63E-02	-	-
Sumoylation Pathway	2.00E-02	9.12E-05	-	-
Tight Junction Signaling	3.31E-02	1.05E-02	-	-
Unfolded protein response	3.16E-02	5.50E-03	-	-
AMPK Signaling	3.47E-03	-	6.03E-04	-
eNOS Signaling	1.86E-04	-	1.17E-03	-
G Protein Signaling Mediated by Tubby	3.39E-02	-	2.45E-02	-
GPCR-Mediated Nutrient Sensing in Enteroendocrine Cells	4.07E-02	-	2.69E-02	-
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	1.48E-02	-	1.51E-03	-

Insulin Receptor Signaling	3.80E-02	-	7.24E-04	-
Nitric Oxide Signaling in the Cardiovascular System	3.72E-03	-	1.07E-02	-
PPAR α /RXR α Activation	1.82E-02	-	1.07E-06	-
Prostate Cancer Signaling	1.82E-02	-	5.75E-03	-
Telomerase Signaling	3.72E-02	-	1.02E-02	-
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	1.10E-02	-	-	8.51E-03
4-1BB Signaling in T Lymphocytes	-	1.86E-02	2.29E-02	-
Cardiac Hypertrophy Signaling	-	4.07E-03	3.39E-02	-
CCR5 Signaling in Macrophages	-	2.24E-02	1.86E-03	-
CD40 Signaling	-	4.27E-02	2.14E-02	-
Ceramide Signaling	-	6.17E-05	3.39E-02	-
CREB Signaling in Neurons	-	2.45E-02	2.82E-03	-
CXCR4 Signaling	-	9.77E-06	8.51E-03	-
Ephrin B Signaling	-	3.55E-03	1.82E-02	-
ERK/MAPK Signaling	-	2.40E-02	8.13E-04	-
Erythropoietin Signaling	-	1.78E-02	3.39E-04	-
HGF Signaling	-	3.09E-02	1.15E-02	-
HIPPO signaling	-	1.26E-03	4.90E-05	-
IL-1 Signaling	-	6.03E-03	5.13E-03	-
IL-17A Signaling in Fibroblasts	-	2.88E-04	2.88E-02	-
IL-17A Signaling in Gastric Cells	-	3.55E-02	1.51E-02	-
IL-3 Signaling	-	8.91E-03	2.51E-02	-
IL-8 Signaling	-	2.34E-06	3.98E-03	-
iNOS Signaling	-	2.24E-02	4.37E-02	-
JAK/Stat Signaling	-	2.95E-03	3.63E-03	-
LPS-stimulated MAPK Signaling	-	3.98E-03	4.17E-03	-
MIF Regulation of Innate Immunity	-	4.07E-03	3.89E-02	-
Molecular Mechanisms of Cancer	-	4.90E-03	7.76E-03	-
NF- κ B Activation by Viruses	-	2.95E-02	2.75E-02	-
P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	-	3.55E-02	3.31E-03	-
PDGF Signaling	-	3.80E-02	3.09E-02	-
Phospholipase C Signaling	-	4.47E-03	3.47E-02	-
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	-	1.86E-03	3.55E-03	-
PTEN Signaling	-	7.08E-03	1.29E-02	-
RANK Signaling in Osteoclasts	-	3.16E-02	7.24E-03	-
Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes	-	1.78E-02	2.24E-02	-
Relaxin Signaling	-	4.37E-03	6.03E-03	-
Renin-Angiotensin Signaling	-	1.82E-02	1.32E-02	-
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	-	4.79E-02	1.35E-02	-
SAPK/JNK Signaling	-	3.72E-02	4.47E-02	-

Signaling by Rho Family GTPases	-	3.39E-08	1.15E-02	-
T Cell Receptor Signaling	-	4.90E-02	9.55E-03	-
Tec Kinase Signaling	-	5.62E-03	9.55E-03	-
Thrombopoietin Signaling	-	1.62E-02	1.32E-02	-
TNFR2 Signaling	-	1.41E-02	2.04E-02	-
UVB-Induced MAPK Signaling	-	1.78E-02	1.38E-02	-
UVC-Induced MAPK Signaling	-	1.82E-02	4.07E-02	-
B Cell Receptor Signaling	-	1.26E-02	-	4.27E-02
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	2.51E-05	-	-	-
VEGF Signaling	2.09E-03	-	-	-
PXR/RXR Activation	3.16E-03	-	-	-
cAMP-mediated signaling	4.37E-03	-	-	-
Glutamate Degradation III (via 4-aminobutyrate)	4.68E-03	-	-	-
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	4.90E-03	-	-	-
Melatonin Signaling	4.90E-03	-	-	-
Antigen Presentation Pathway	9.77E-03	-	-	-
Paxillin Signaling	1.32E-02	-	-	-
Sucrose Degradation V (Mammalian)	1.58E-02	-	-	-
Leukocyte Extravasation Signaling	1.95E-02	-	-	-
Lipid Antigen Presentation by CD1	1.95E-02	-	-	-
Glutamine Biosynthesis I	2.24E-02	-	-	-
FAK Signaling	2.29E-02	-	-	-
Cellular Effects of Sildenafil (Viagra)	2.63E-02	-	-	-
Oleate Biosynthesis II (Animals)	3.24E-02	-	-	-
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	3.39E-02	-	-	-
Gαs Signaling	3.47E-02	-	-	-
Leptin Signaling in Obesity	4.07E-02	-	-	-
β-alanine Degradation I	4.37E-02	-	-	-
Glutamine Degradation I	4.37E-02	-	-	-
Glutamate Biosynthesis II	4.37E-02	-	-	-
Glutamate Degradation X	4.37E-02	-	-	-
Glutamate Dependent Acid Resistance	4.37E-02	-	-	-
Ephrin A Signaling	4.47E-02	-	-	-
Parkinson's Signaling	4.79E-02	-	-	-
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	4.79E-02	-	-	-
TCA Cycle II (Eukaryotic)	-	1.02E-05	-	-
Regulation of Actin-based Motility by Rho	-	4.79E-05	-	-
Semaphorin Signaling in Neurons	-	2.75E-04	-	-
Apoptosis Signaling	-	5.13E-04	-	-
Putrescine Degradation III	-	7.94E-04	-	-

Tryptophan Degradation X (Mammalian, via Tryptamine)	-	1.26E-03	-	-
HMGB1 Signaling	-	2.95E-03	-	-
Role of Tissue Factor in Cancer	-	3.47E-03	-	-
Glutaryl-CoA Degradation	-	5.62E-03	-	-
Lymphotoxin β Receptor Signaling	-	6.31E-03	-	-
Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	-	6.76E-03	-	-
Inosine-5'-phosphate Biosynthesis II	-	7.41E-03	-	-
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	-	7.59E-03	-	-
Dopamine Degradation	-	7.59E-03	-	-
autophagy	-	1.02E-02	-	-
3-phosphoinositide Degradation	-	1.20E-02	-	-
IL-6 Signaling	-	1.20E-02	-	-
D-myo-inositol (1,4,5,6)- Tetrakisphosphate Biosynthesis	-	1.20E-02	-	-
D-myo-inositol (3,4,5,6)- tetrakisphosphate Biosynthesis	-	1.20E-02	-	-
Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	-	1.29E-02	-	-
Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling	-	1.29E-02	-	-
PAK Signaling	-	1.29E-02	-	-
Histamine Degradation	-	1.38E-02	-	-
Catecholamine Biosynthesis	-	1.41E-02	-	-
Arginine Degradation I (Arginase Pathway)	-	1.41E-02	-	-
G α 12/13 Signaling	-	1.45E-02	-	-
D-myo-inositol-5-phosphate Metabolism	-	1.48E-02	-	-
Purine Nucleotides De Novo Biosynthesis II	-	1.55E-02	-	-
Reelin Signaling in Neurons	-	1.78E-02	-	-
Death Receptor Signaling	-	1.78E-02	-	-
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	-	1.78E-02	-	-
3-phosphoinositide Biosynthesis	-	1.95E-02	-	-
Oxidative Ethanol Degradation III	-	1.95E-02	-	-
IL-10 Signaling	-	2.09E-02	-	-
Polyamine Regulation in Colon Cancer	-	2.29E-02	-	-
Fatty Acid α -oxidation	-	2.29E-02	-	-
Creatine-phosphate Biosynthesis	-	2.29E-02	-	-
Serine Biosynthesis	-	2.29E-02	-	-
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	-	2.40E-02	-	-
PDF Signaling	-	2.57E-02	-	-
STAT3 Pathway	-	3.02E-02	-	-

Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)	-	3.09E-02	-	-
Phenylalanine Degradation IV (Mammalian, via Side Chain)	-	3.09E-02	-	-
Synaptic Long Term Depression	-	3.39E-02	-	-
Ethanol Degradation IV	-	3.55E-02	-	-
Gαi Signaling	-	4.07E-02	-	-
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	-	4.17E-02	-	-
Methylglyoxal Degradation III	-	4.37E-02	-	-
NAD Biosynthesis from 2-amino-3-carboxymuconate Semialdehyde	-	4.47E-02	-	-
Superpathway of Serine and Glycine Biosynthesis I	-	4.47E-02	-	-
Aspartate Degradation II	-	4.47E-02	-	-
tRNA Charging	-	4.57E-02	-	-
CD27 Signaling in Lymphocytes	-	4.57E-02	-	-
Sphingosine-1-phosphate Signaling	-	4.68E-02	-	-
Acute Phase Response Signaling	-	4.79E-02	-	-
RAR Activation	-	-	6.31E-04	-
PPAR Signaling	-	-	7.08E-04	-
Type II Diabetes Mellitus Signaling	-	-	2.82E-03	-
Growth Hormone Signaling	-	-	3.39E-03	-
TGF-β Signaling	-	-	4.37E-03	-
Factors Promoting Cardiogenesis in Vertebrates	-	-	5.25E-03	-
ErbB Signaling	-	-	6.61E-03	-
UVA-Induced MAPK Signaling	-	-	7.59E-03	-
Endoplasmic Reticulum Stress Pathway	-	-	1.10E-02	-
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	-	-	1.15E-02	-
ERK5 Signaling	-	-	1.20E-02	-
Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	-	-	1.38E-02	-
Role of IL-17A in Arthritis	-	-	1.45E-02	-
ErbB2-ErbB3 Signaling	-	-	1.55E-02	-
Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	-	-	1.66E-02	-
ErbB4 Signaling	-	-	1.74E-02	-
IL-15 Production	-	-	1.78E-02	-
Neurotrophin/TRK Signaling	-	-	2.00E-02	-
BMP signaling pathway	-	-	2.00E-02	-
Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling	-	-	2.09E-02	-
VDR/RXR Activation	-	-	2.14E-02	-
5-aminoimidazole Ribonucleotide Biosynthesis I	-	-	2.24E-02	-
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	-	-	2.34E-02	-

IL-12 Signaling and Production in Macrophages	-	-	2.51E-02	-
IL-17 Signaling	-	-	2.69E-02	-
FLT3 Signaling in Hematopoietic Progenitor Cells	-	-	2.69E-02	-
HER-2 Signaling in Breast Cancer	-	-	2.95E-02	-
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	-	-	3.16E-02	-
April Mediated Signaling	-	-	3.39E-02	-
Melanocyte Development and Pigmentation Signaling	-	-	3.55E-02	-
B Cell Activating Factor Signaling	-	-	3.72E-02	-
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	-	-	4.37E-02	-
IL-9 Signaling	-	-	4.57E-02	-
Calcium Signaling	-	-	-	8.91E-04
Coenzyme A Biosynthesis	-	-	-	1.26E-02
Uracil Degradation II (Reductive)	-	-	-	1.66E-02
Thymine Degradation	-	-	-	1.66E-02
Leucine Degradation I	-	-	-	3.72E-02

DISCUSSIÓ

La dependència de drogues és una malaltia neuropsiquiàtrica complexa que s'associa a l'ús persistent, compulsiu i incontrolat de la droga. La interacció entre el fons genètic individual, els factors epigenètics i l'ambient determinen l'adaptació dels circuits neuronals a l'exposició crònica de cocaïna, i permet explicar per què en alguns individus es desenvolupa dependència però no en d'altres. En aquest treball s'ha estudiat la base genètica de la dependència de drogues des de diferents punts de vista començant pels estudis d'associació cas-control que permeten identificar variants de risc, continuant amb estudis d'expressió gènica que permeten avaluar com la cocaïna altera l'expressió de diferents gens, i acabant amb l'avaluació de l'efecte dels gens identificats en els estudis anteriors utilitzant models murins genoanul·lats. Totes les aproximacions utilitzades, malgrat tenir avantatges, presenten també limitacions que es discuteixen a continuació.

1. Variants de susceptibilitat a la dependència de cocaïna

1.1 Estudis d'associació cas-control: consideracions i metodologia emprada

Els estudis d'associació són una de les metodologies més emprades per identificar variants de susceptibilitat genètica en malalties complexes. En el cas de la dependència de cocaïna els més utilitzats són els estudis d'associació cas-control poblacionals, que es basen en la comparació de freqüències genotípiques o al·lèliques de variants genètiques polimòrfiques entre un grup d'individus dependents a cocaïna i un grup de controls no relacionats entre ells. En aquesta Tesi Doctoral s'ha emprat aquesta estratègia per identificar variants de predisposició a la dependència de cocaïna. Un disseny adequat és essencial per tal d'identificar aquestes variants, i per això és important tenir en compte una sèrie de consideracions.

Homogeneïtat en el fenotip estudiat

Un dels aspectes més importants en l'estudi d'una malaltia complexa és la selecció adequada de la mostra d'individus. Per tal de facilitar la identificació dels factors genètics de predisposició, el grup de pacients ha de ser el més homogeni possible. En el cas de les addiccions, el factor de variabilitat més difícil de controlar és la comorbiditat amb l'abús o dependència d'altres drogues, ja que la majoria de consumidors de drogues il·lícites consumeixen més d'una substància a la vegada (EMCDDA, 2014), tal i com s'ha comentat a la Introducció. La mostra de casos dels nostres estudis inclou individus diagnosticats com a dependents de cocaïna en base als criteris descrits al DSM-IV-TR, seguint d'una entrevista estandarditzada (*Structural Clinical Interview, SCID*). Tot i això, una gran proporció d'aquests individus també han estat diagnosticats per dependències d'altres drogues (41.1% alcohol, 35.6% cànnabis, 22.7% opiàcis i 6.8% benzodiazepines).

Discussió

D'altra banda, és important tenir en compte que totes les malalties psiquiàtriques presenten una gran comorbiditat entre elles. Aproximadament el 73.4% dels pacients d'abús o dependència de cocaïna tenen comorbiditats amb altres trastorns psiquiàtrics, com el trastorn depressiu major (TDM), l'esquizofrènia, el dèficit d'atenció i hiperactivitat (TDAH), l'ansietat o els trastorns de la personalitat (Arias *et al*, 2013). Aquestes comorbiditats poden ser un factor diferenciador, i per tant de confusió, quan es pretén comparar els resultats de diferents estudis, tot i que poques vegades es disposa de les dades suficients per a tenir-lo en consideració.

Selecció de la mostra control

Una altra qüestió molt important en els estudis d'associació és la selecció adequada dels controls, i en el cas de la dependència de drogues és un punt especialment controvertit. Alguns autors defensen que els millors controls són aquells individus que han estat exposats a la droga d'interès com a mínim un cop a la seva vida, però no han desenvolupat la dependència (Bierut *et al*, 2010; Gelernter *et al*, 2014). Aquesta postura, però, deixa fora dels estudis els factors de risc a la dependència relacionats amb la impulsivitat i la tendència a les pràctiques de risc, ambdues amb un elevat component genètic (Bevilacqua i Goldman, 2013), que empenyerien els individus a tenir el seu primer contacte amb les drogues (Camchong, Endres i Fein, 2014; Mitchell i Potenza, 2014). Per aquest motiu, altres autors -i nosaltres- som més partidaris de l'ús de controls que no compleixin els criteris de dependència per cap droga d'abús o drogues il·lícites, sense considerar l'exposició a la droga (Ikeda *et al.*, 2013; Johnson *et al.*, 2016).

En els nostres estudis, però, no va ser possible utilitzar una mostra control cribrada, donada la naturalesa dels individus control als quals teníem accés, que són donants de sang del Banc de Sang i Teixits de Barcelona. No obstant això, si que es va poder descartar el consum de drogues injectables ja que és un motiu d'exclusió en la donació de sang. En el cas de la metanàlisi de GWAS (Article 4, Capítol 3) vam emprar controls poblacionals. En qualsevol cas, es calcula que la possible contaminació amb individus dependents de cocaïna a la mostra control és només de l'1,45% (tenint en compte que el 9,1% dels adults espanyols han consumit cocaïna algun cop a la seva vida (EMCDDA, 2017), i que només un 16% d'aquests individus desenvoluparà dependència (Wagner i Anthony, 2002)), i per tant la distorsió sobre els resultats és molt petita. Aquesta contaminació apropa casos i controls i per tant pot ser responsable de la no detecció d'alguna associació existent (fals negatiu), però no de falsos positius.

Estratificació poblacional i factors de confusió

Una mostra presenta estratificació poblacional quan està constituïda per una barreja d'individus que pertanyen a grups diferenciats, en general per raons ètniques, o bé per artefactes tècnics en la genotipació, que es tractarà en el següent apartat. Si aquests subgrups no estan representats de forma

equivalent entre els casos i els controls, poden sorgir falsos positius en els estudis d'associació: les diferències observades en les freqüències al·lèliques o genotípiques entre casos i controls no serien degudes al fenotip sinó al factor que diferencia els subgrups (Freedman *et al*, 2004). Per això és molt important que la mostra de casos i controls sigui genèticament homogènia, constituïda per individus procedents d'una mateixa regió i ètnia. En els estudis presentats en aquest treball s'ha tingut en compte aquest factor, i per això la mostra de casos i controls està integrada exclusivament per individus d'ètnia caucàsica i nacionalitat espanyola que són fills de progenitors també caucàsics i espanyols. A més, en un treball anterior del grup es va descartar la possible presència d'estratificació poblacional en una part de la nostra mostra emprant tres aproximacions estadístiques diferents (Fernández-Castillo *et al.*, 2013).

A més de l'estratificació poblacional, hi ha altres variables de confusió, no relacionades amb el fenotip, que poden donar lloc a falsos positius si no es distribueixen homogèniament entre casos i controls. En el cas de la dependència de cocaïna, el sexe seria un factor important a considerar degut a que el trastorn té una major prevalença en homes. Per això, en els nostres estudis hem mantingut la mateixa proporció de sexes en casos i controls. Una altra variable possible de confusió, l'edat, sí que presentava una distribució diferencial en casos i controls, i per aquest motiu la vam considerar com a covariable en les nostres anàlisis.

En els estudis GWAS aquests factors es poden detectar més fàcilment gràcies a la gran quantitat de genotips disponibles. L'anàlisi de components principals (PCA) ens permet identificar la presència d'estratificació poblacional i les variables de confusió en els estudis GWAS, i les components principals (PC) identificades s'utilitzen com a covariables en l'estudi d'associació cas-control (Price *et al*, 2006). En general s'inclouen les 10 o 20 primeres PC, de manera que no és necessari el coneixement previ de les variables de confusió, reduint el biaix de les anàlisis. A més, aquesta aproximació permet detectar individus emparentats, que podrien esbiaixar els resultats de l'associació (Price *et al.*, 2010). En els quatre estudis GWAS utilitzats en la metanàlisi presentada en aquest treball (Article 4 del Capítol 3) s'ha intentat controlar de la forma més acurada possible l'efecte de l'estratificació poblacional i d'altres variables de confusió mitjançant l'aproximació prèviament descrita.

Errors de genotipació

Els estudis d'associació comporten la genotipació de forma automatitzada d'un elevat nombre de polimorfismes, generalment SNPs, en una gran quantitat de mostres. En aquestes condicions és possible que es produeixin errors en l'assignació de genotips a petita escala. Per tal de controlar la fiabilitat dels resultats obtinguts és habitual incloure mostres duplicades entre plaques, control interns amb genotips coneguts i controls negatius. En alguns casos, els errors de genotipació són deguts a la

Discussió

baixa qualitat o quantitat de DNA de la mostra (Pompanon *et al*, 2005), i per això és important determinar la taxa de genotipació per individu i per variant, i eliminar de l'anàlisi aquells individus o variants que no superin un determinat llindar, per exemple un 80-90%. A més, es poden detectar errors de genotipació sistemàtics mesurant l'equilibri Hardy-Weinberg (HWE) de la mostra control, sota l'assumpció que una elevada taxa d'error genera desequilibri (Nsengimana i Bishop, 2017). Aquests controls de qualitat són especialment importants en els estudis GWAS en què es necessiten dades de gran qualitat, sobretot si l'objectiu és imputar aquestes dades. Tots aquests controls de qualitat s'han implementat en els nostres estudis.

Imputació dels genotips

La imputació és una tècnica que ens permet inferir genotips que no han estat directament genotipats en una mostra, basant-nos en els patrons de desequilibri de lligament (LD) d'una mostra de referència. Per obtenir una bona qualitat d'imputació és molt important que la mostra de referència inclogui el major nombre d'individus possible, que han de ser ètnicament similars a la mostra d'estudi (Zhang *et al*, 2011). A més d'incrementar el nombre de variants a estudiar, la imputació ens permet estandarditzar i homogeneïtzar les dades procedents de diferents estudis, de forma que sigui més fàcil realitzar metanàlisis. Per acabar, la imputació ens permet treballar amb mostres GWAS de casos i controls que no provenen del mateix estudi, com és el cas dels GWAS presentats en aquest treball (Article 4 del Capítol 3). Tot i que és una pràctica habitual, es recomana emprar individus de la mateixa ètnia i genotipats amb la mateixa plataforma per evitar estratificació poblacional. A més, les dades s'han d'agrupar abans de l'imputació per evitar biaixos en els resultats (Zuvich *et al.*, 2011; Uh *et al.*, 2012; Mitchell *et al.*, 2014; Van Iperen *et al.*, 2017). En el nostre estudi vam comprovar que l'agrupació de casos i controls genotipats amb diferents xips dona lloc a greus problemes estratificació poblacional, tot i que provinguin del mateix estudi. Per aquest motiu vam repetir l'anàlisi emprant controls d'altres estudis genotipats amb la mateixa plataforma que els casos, resolent el problema i posant en evidència la importància d'aquest punt.

Mida mostral i poder estadístic

En els estudis d'associació és molt important tenir en compte la mida mostral, de la qual depèn directament el poder estadístic (probabilitat de detectar una associació real). Hi ha diversos factors que influeixen en l'estimació del poder estadístic, com són la prevalença de la malaltia, la mida de la mostra, la freqüència al·lèlica del marcador associat a la malaltia, el risc que aquest confereix (*odds-ratio*, OR) i el seu model d'herència (Nsengimana i Bishop, 2017). La mida mostral dels quatre estudis de gens candidats inclosos en aquest treball ha augmentat successivament, ja que s'han anat reclutant nous pacients i controls durant la Tesi, i amb ella també ho ha fet el poder estadístic, mantenint-se en

rangs adequats que varien en funció de l'OR i del model d'herència utilitzat. En el cas de la metanàlisi presentada, tot i que inclou la mostra de casos dependents de cocaïna d'ascendència europea més gran descrita fins ara, encara no s'ha assolit el poder estadístic suficient per detectar associacions significatives a escala genòmica.

Correccions per tests múltiples

En els estudis d'associació s'acostumen a testar una gran quantitat de variants polimòrfiques i això comporta que el nombre de comparacions estadístiques augmenti, i amb aquest la probabilitat de detectar associacions degudes a l'atzar (falsos positius). Per això és important establir límits de significació més rigorosos que tinguin en compte el nombre de tests realitzats. Tot i que no hi ha un mètode universal, s'han desenvolupat diferents sistemes per establir aquests nous límits. El més rigorosos eviten l'aparició de falsos positius però alhora afavoreixen l'aparició de falsos negatius; en canvi amb les correccions més dèbils es produeix el fenomen contrari.

Les dues metodologies emprades en aquesta Tesi Doctoral han estat:

- Correcció de Bonferroni: S'estableix un nou llindar de significació (α') segons el nombre de tests independents realitzats (n) seguint la relació $\alpha' = \alpha/n$, essent $\alpha=0,05$. Aquest mètode és fàcil d'aplicar i assegura una probabilitat de falsos positius inferior al 5%, però és alhora molt conservador i requereix la independència dels tests, de tal manera que la probabilitat de falsos negatius augmenta considerablement, sobretot quan es realitzen molts tests.
- False Discovery Rate (FDR): Calcula la proporció de falsos positius entre tots els positius obtinguts. El FDR considera la distribució dels nivells de significació assolits (p -valors) i discrimina entre la distribució uniforme (hipòtesis nul·la) i aquells valors que se'n desvien (hipòtesi alternativa), ajustant el nivell de significació. Aquest mètode és més adequat quan es fan una gran quantitat de tests.

En els nostres estudis d'associació hem aplicat la correcció de Bonferroni sempre que ha estat possible (Article 2, 3 i 5, dels Capítols 2, 3 i 4 respectivament), ja que és el mètode més adequat quan s'analitzen poques variants independents entre si, com seria el nostre cas. En el cas de l'Article 1 del Capítol 1 no es van aplicar correccions ja que es va testar una única variant.

D'altra banda, els estudis GWAS (Article 4, Capítol 3) utilitzen un llindar de significació preestablert que es basa en la correcció de Bonferroni per un milió de tests independents (tot i que no sempre s'ha genotipat un milió de SNPs i que els SNPs genotipats no sempre són independents en termes de desequilibri de lligament). Així, aquest llindar queda en 5×10^{-8} ($0,05/10^6$). A més, s'ha establert un segon llindar a 1×10^{-5} per a les variants amb una associació suggestiva (Johnson *et al*, 2010). Pels altres

Discussió

anàlisis incloses en aquest mateix estudi hem utilitzat el mètode de correcció més adient en cada cas, en general Bonferroni però també FDR.

Selecció de gens candidats i polimorfismes

En els estudis d'associació basats en hipòtesis, que constitueixen la primera estratègia d'anàlisi de variants genètiques comunes de susceptibilitat, se seleccionen gens o sistemes funcionals candidats relacionats amb el fenotip a estudiar a partir d'evidències que sorgeixen en estudis clínics, farmacològics, genètics, fisiològics, bioquímics o de models murins. Les variants a genotipar en aquests gens es poden seleccionar en base a criteris de cobertura genètica, saturant el gen amb polimorfismes que no estiguin en LD entre ells, o en base a criteris funcionals mitjançant l'ús de dades preexistents i eines bioinformàtiques que senyalen variants que poden tenir un impacte sobre la funció del gen. En els nostres estudis vam utilitzar la segona estratègia per seleccionar les variants d'interès: es van utilitzar variants prèviament associades amb la dependència de drogues (Article 1 i 3, dels Capítols 1 i 3 respectivament), basant-nos en dades d'estudis de seqüenciació d'alt rendiment (*high throughput*) que senyalin el possible efecte funcional d'aquestes variants (Article 2 del Capítol 2) o utilitzant eines de predicció funcional com el portal *SNP Function Prediction* (<https://snpinfo.niehs.nih.gov/snpinfo/snpfunc.html>) (Article 5 del Capítol 4).

Els avenços de les tecnologies de genotipació massiva estan deixant enrere els gens candidats per donar pas a l'abordatge a escala genòmica (GWAS), que permet analitzar sistemàticament milers o milions de SNPs distribuïts al llarg de tot el genoma sense una hipòtesi prèvia. Aquesta estratègia té l'avantatge que s'analitza tot el genoma, i això permet identificar gens o vies funcionals inesperades que tenen una relació causal amb la patologia. Els estudis de gens candidats es basen en coneixements previs sovint molt limitats o basats en idees preconcebudes sobre l'etiologia del trastorn, i per tant poden conduir a vegades a carrerons sense sortida.

Ús de rèpliques o metanàlisi

Les rèpliques dels estudis d'associació permeten avaluar en una mostra independent un resultat positiu obtingut prèviament, per confirmar que l'associació identificada sigui realment vàlida i no un fals positiu. Alguns estudis d'associació utilitzen el disseny en dues etapes: una part de la mostra s'utilitza com a descoberta per genotipar una gran quantitat de variants, i només aquelles que presenten associació amb el trastorn es genotipen en una mostra de rèplica independent. Aquest tipus de disseny, utilitzat en alguns dels nostres treballs (Article 1 i 2 dels Capítols 1 i 2, respectivament), permeten validar les senyals identificades i reduir els costos de genotipació. Moltes vegades aquestes senyals no es repliquen, i això podria ser degut a diferències en la composició ètnica de les poblacions estudiades, la variabilitat a l'hora de definir el fenotip o de seleccionar els controls, limitacions en la

mida de la mostra tant en l'estudi de rèplica com en l'estudi inicial, mala qualitat de les dades o de les anàlisis de la mostra original, així com l'ús de llindars de significació massa permissius (Bühler *et al*, 2015; Greene *et al*, 2009). Degut a la baixada dels costos de genotipació, actualment s'opta més per l'anàlisi conjunt de la mostra o metanàlisi, de forma que s'augmenta el poder estadístic per detectar associacions significatives (McCarthy *et al*, 2008).

1.2 Identificació de variants associades en els nostres estudis

En les últimes dècades s'han realitzat una gran quantitat d'estudis d'associació entre variants genètiques comunes i la dependència de drogues però, tot i que moltes de les associacions identificades s'han testat en una mostra independent, tant sols una petita part s'han pogut replicar (Bühler *et al*, 2015).

A causa de l'elevada comorbiditat de la dependència de cocaïna amb la resta d'addiccions és difícil tenir una mostra d'individus que consumeixin una sola substància. Diversos estudis han demostrat que totes les addiccions tenen un substrat biològic compartit. Per exemple, totes les drogues d'abús actuen de forma directa o indirecta sobre el sistema de recompensa del cervell (Wise, 1996; MacNicol, 2017). I, a més, cada substància pot activar vies específiques (Graziane *et al*, 2016; Russo *et al*, 2009; Zhou *et al*, 2011). Atesa la dificultat d'obtenir individus dependents a una sola substància, molts estudis d'associació consideren totes les dependències de drogues com un conjunt homogeni (*substance dependence*, SD). En d'altres estudis s'intenta identificar variants específiques per a la dependència a una droga en concret, i en aquests casos es procura enriquir la mostra amb individus dependents de la droga d'interès. En els nostres estudis hem utilitzat totes dues aproximacions.

1.2.1 Estudis basats en hipòtesis

Variants genètiques situades en microRNAs o en els seus llocs d'unió

Els microRNAs són reguladors postranscripcionals de l'expressió gènica que s'uneixen per complementarietat de bases als RNA missatgers (mRNA), majoritàriament a la regió 3'UTR, per inhibir la seva traducció o induir la seva degradació (Bartel, 2004). Aproximadament un 11% dels SNPs coneguts estan localitzats a les regions 3'UTR de 16.810 gens. Aquestes variants podrien, potencialment, alterar el lloc d'unió de microRNAs, que a la vegada alteraria la regulació de l'expressió del gen diana donant lloc a una variació fenotípica (Moszyńska *et al*, 2017).

A l'estudi que es presenta a l'Article 5 del Capítol 4 vam identificar cinc variants localitzades a la regió 3'UTR del gen *NFAT5* associades a la dependència de cocaïna, dues de les quals superen la correcció de Bonferroni per tests múltiples. Segons diferents programes bioinformàtics totes aquestes variants

Discussió

alterarien llocs d'unió de microRNAs. Mitjançant un estudi amb un gen reporter que codifica la luciferasa vam poder validar funcionalment en dos models cel·lulars (HeLa i SH-SY5Y) que l'al·lel A de la variant rs1437234 dificulta la unió del miR-509 a la regió 3'UTR del gen *NFAT5*, alterant els seus nivells d'expressió. El gen *NFAT5* codifica un factor de transcripció que podria tenir un paper important en la mediació dels efectes de la cocaïna sobre l'expressió gènica. La variant identificada podria alterar els nivells d'expressió de *NFAT5* tot produint canvis en l'expressió d'una gran quantitat de gens, contribuint així a la predisposició a la dependència de cocaïna.

En base als resultats obtinguts a l'estudi anterior vam decidir fer una cerca més ampla de variants associades a la dependència de drogues, i en concret de cocaïna, que podrien alterar el lloc d'unió de microRNAs (Article 2, Capítol 2). Es va partir dels resultats d'un estudi a gran escala que va identificar variants localitzades en llocs d'unió de microRNAs en mostres de cervell humà (Boudreau *et al*, 2014). Mitjançant un estudi d'associació en dues etapes vam avaluar uns 60 SNPs i vam identificar, i replicar en una mostra independent, una associació amb la variant rs1047383 localitzada a la regió 3'UTR del gen *PLCB1*, la qual està associada tant a la dependència de drogues en general, com a la dependència de cocaïna. A més, aquesta variant està en elevat desequilibri de lligament amb el SNP rs708910, que també alteraria llocs d'unió de microRNAs segons diverses prediccions. Com en el treball anterior, vam realitzar un estudi funcional per validar l'efecte d'aquestes variants sobre la unió de microRNAs. Malauradament, no vam observar diferències entre els al·lells dels SNPs en cap dels microRNAs testats, tot i que podria ser que aquesta variant afectés la regulació d'altres microRNAs que no es van estudiar. Tot i que actualment hi ha moltes eines bioinformàtiques de predicció que permeten estimar l'efecte d'una variant al lloc d'unió d'un microRNA, moltes vegades els resultats que ofereixen cadascuna d'elles són força divergents (Afonso-Grunz i Müller, 2015). Aquest fet emfatitza la dificultat de la selecció de microRNAs que hom vol testar funcionalment, i també posa en evidència la importància de la validació funcional d'aquestes prediccions.

D'altra banda, es va explorar el paper dels microRNAs a la predisposició a la dependència de cocaïna. Mitjançant un estudi d'associació basat en gens (*gene-based analysis*) es va identificar associació amb la dependència de cocaïna dels gens *hsa-miR-9-1*, *hsa-miR-153-1* i *hsa-miR-124-3*, que codifiquen microRNAs diferencialment expressats per efecte de la cocaïna.

Variació en el nombre de còpies (CNV) del gen *NSF* i relació amb la dependència de drogues

La cocaïna duu a terme els seus efectes actuant de forma directa o indirecta sobre diversos sistemes de neurotransmissió (Han i Gu, 2006). Per això els gens implicats en la formació i alliberament de les vesícules sinàptiques són uns bons candidats a participar en la susceptibilitat a la dependència de cocaïna. En un estudi anterior del grup es van analitzar variants de tipus SNP en aquests gens i es va

identificar associació entre el gen *NSF* i la dependència de cocaïna, tant en l'estudi de marcadors individuals com en l'estudi de marcadors múltiples o haplotips. A més, es va observar que l'haplotip de risc estava restringit al grup de pacients que desenvolupaven la dependència de cocaïna de forma ràpida (Fernández-Castillo *et al*, 2012). Al treball presentat al Capítol 1 (Article 1) s'ha valorat l'efecte d'un CNV molt llarg i polimòrfic que inclou part del gen *NSF* (fins l'exó 13). Mitjançant un estudi d'associació en dues etapes vam identificar i replicar l'associació del CNV amb la dependència de cocaïna, sent més prevalent el baix nombre de còpies en casos que en controls. A més, com en el cas de l'haplotip de risc prèviament identificat, vam observar que la variant de risc (baix nombre de còpies del CNV) està sobrerepresentada en el grup de casos que desenvolupen ràpidament la dependència de cocaïna. Finalment, vam determinar que aquesta variant altera els nivells d'expressió de dos dels transcrits del gen *NSF* que estan completament inclosos al CNV, la qual cosa podria tenir un impacte funcional. El gen *NSF* codifica el factor sensible a N-etilmaleimida, que participa en el reciclatge del complex SNARE (complex proteic que controla i regula la secreció sinàptica) per garantir el manteniment del tràfic de membrana intracel·lular i l'alliberament de neurotransmissors a l'espai sinàptic (Barszczewski *et al.*, 2008; Baker i Hughson, 2016). D'acord amb la hipòtesi de la síndrome de deficiència de recompensa (Comings i Blum, 2000; Blum *et al.*, 2015), un mal funcionament de *NSF* podria comportar un defecte en el recanvi i disponibilitat de les vesícules sinàptiques de dopamina, alterant l'alliberament d'aquest neurotransmissor i donant lloc a una disminució de l'activitat dopaminèrgica que predisposi a la dependència.

La majoria d'estudis d'associació se centren en el paper dels SNPs perquè són fàcils de genotipar de forma automatitzada, però no són l'única font de variació del genoma. Alguns autors defensen que les variants estructurals, que solen tenir un impacte més gran sobre l'expressió gènica del que es pot atribuir als SNPs (Gamazon i Stranger, 2015), podrien ajudar a explicar "l'heretabilitat perduda" de les malalties complexes (Manolio *et al*, 2009; Nagao, 2015). Alguns estudis han començat a analitzar la contribució dels CNVs a la dependència d'alcohol (Bae *et al.*, 2012; Boutte *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Ulloa *et al.*, 2014; Sulovari *et al.*, 2017) i d'opiacis (Li *et al.*, 2015), però fins ara cap en la dependència de cocaïna.

1.2.2 Estudis lliures d'hipòtesis

Els estudis lliures d'hipòtesis permeten testar una gran quantitat de polimorfismes distribuïts per tot el genoma a la vegada, sense necessitat d'un coneixement previ sobre els gens i vies potencialment implicades en el fenotip estudiat. Aquesta aproximació ens permet identificar gens nous, i a la vegada recolzar els resultats identificats en els estudis de gens candidats, com ha estat, per exemple, el cas de l'alcohol deshidrogenasa 1B en relació al consum d'alcohol (Clarke *et al*, 2017). El principal

Discussió

inconvenient és que es necessita una mida mostral molt més gran per detectar associacions significatives després d'aplicar les correccions per tests múltiples. En el cas dels GWAS de dependència de drogues publicats fins ara pot ser que tinguin un poder estadístic massa baix per detectar variants associades a la malaltia, possiblement perquè s'utilitzen llindars de p-valors molt estrictes tenint en compte la mida mostral d'aquests estudis, encara molt petita (Li *et al.*, 2012, 2016). Si agafem com a referència les metanàlisis de la resta de malalties psiquiàtriques publicades, observem que en totes elles ha estat necessari arribar a les desenes de milers de casos per obtenir els primers resultats significatius a escala genòmica, per exemple l'esquizofrènia (Ripke *et al.*, 2014), el TDAH (Demontis *et al.*, 2017), l'autisme (Grove *et al.*, 2017) i el TDM (Wray *et al.*, 2018).

Rèplica de variants prèviament identificades en estudis GWAS

D'acord amb el catàleg de GWAS del NHGRI-EBI (MacArthur *et al.*, 2017, <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>), que recull totes les associacions significatives identificades en estudis GWAS, s'han realitzat fins ara 3.395 GWAS que descriuen un total de 62.156 associacions significatives ($P < 5 \times 10^{-8}$) per diferents malalties. Per la metodologia estadística emprada en aquests estudis no es pot descartar la possibilitat que alguns d'ells siguin falsos positius, de manera que és molt important verificar que aquestes associacions són reals tot testant-les en una mostra de rèplica independent (Chanock *et al.*, 2007; Kraft *et al.*, 2009). Aquest és precisament un dels objectius d'aquesta Tesi.

S'han publicat fins ara només tres GWAS d'abús o dependència de qualsevol droga amb resultats significatius, que han permès identificar quatre senyals significatives: tres en individus d'ascendència europea i una en individus d'ascendència africana (Johnson *et al.*, 2016; McGue *et al.*, 2013; Wetherill *et al.*, 2015). En el cas de la dependència de cocaïna s'ha pogut identificar associació amb una variant, rs2629540, mitjançant una metanàlisi d'individus de diferents poblacions (Gelernter *et al.*, 2014). En el nostre estudi (Article 3 el Capítol 3) vam intentar replicar a la nostra mostra espanyola les associacions amb dependència de drogues identificades en individus europeus (amb els SNPs rs1868152 i rs2952621), i l'associació amb la variant rs2629540 en el subgrup d'individus dependents de cocaïna. No vam incloure al nostre estudi de rèplica la variant rs2567261 perquè prèviament ja s'havia intentat replicar sense èxit (Wetherill *et al.*, 2015). En la nostra mostra únicament vam detectar associació significativa entre la variant rs2952621 i la dependència de drogues, sota el model dominant, essent l'al·lel de risc (T) el mateix que s'havia identificat en els estudis anteriors (Wetherill *et al.*, 2015). Aquesta variant està pròxima al gen encara no ben caracteritzat *LINC01854*, amb la qual cosa és difícil determinar el seu paper en la predisposició a la dependència.

Com s'ha comentat anteriorment, la capacitat de replicar senyals identificades en estudis d'associació es veu afectada per molts factors, com ara les característiques de les mostres (ètnia, mida mostral,

definició de casos i controls, etc.) o el disseny i l'anàlisi de les dades (covariables considerades, mètode de correcció per tests múltiples, model d'herència considerat, etc.), tant de l'estudi original com de la mostra de rèplica (McCarthy *et al.*, 2008). En el cas del GWAS de dependència de cocaïna, podria ser que les diferències de disseny experimental entre els dos estudis hagin interferit en la possibilitat de replicar la variant estudiada. En el treball original es combinen mostres d'individus americans d'origen europeu (EA) i d'americans d'origen africà (AA), sent les segones les que tenen un pes més gran en l'associació. En canvi, en el nostre estudi s'utilitzen mostres espanyoles d'origen europeu. D'altra banda, al disseny original la proporció de casos i controls no és balancejada, sent quatre vegades més gran el nombre de casos que de controls. Per incrementar el poder estadístic i evitar l'aparició de falsos positius, es recomana que la proporció de controls en els estudis d'associació sigui més gran o igual que la de casos, tal i com hem fet en el nostre estudi. Finalment, els controls emprats en aquest estudi són individus que han estat exposats a la cocaïna, com a mínim un cop a la seva vida, i no han desenvolupat addicció. En canvi, en els nostres estudis utilitzem individus de la població general, sense tenir en compte si han estat en contacte amb la droga d'estudi. Els avantatges i inconvenients d'aquestes estratègies han estat discutits prèviament.

En el cas que una variant pugui ser replicada en una o més mostres independents amb poder estadístic suficient, queda molt reforçada la seva associació amb el fenotip d'interès. En cas contrari, és difícil determinar si és degut al fet que aquesta variant és un fals positiu o a diferències/limitacions dels estudis de descoberta i de rèplica.

Metanàlisi de GWAS de dependència de cocaïna

En general, els estudis GWAS individuals només tenen poder estadístic suficient per detectar les variants amb efectes més grans, a causa de la dificultat d'assolir mides mostrals grans amb subjectes procedents d'un únic centre. L'anàlisi conjunta de diferents GWAS mitjançant la realització d'una metanàlisi permet incrementar el poder estadístic, afavorint la detecció de noves variants associades al fenotip d'interès, a la vegada que es validen les variants identificades en els estudis independents (Evangelou i Ioannidis, 2013).

Les metanàlisis ens permeten analitzar conjuntament estudis independents tot ponderant la mida mostral de cada estudi. El mètode més emprat és el de l'inversa de la variància (*inverse variance weighting method*), que utilitza la inversa de l'error estàndard al quadrat per ponderar l'efecte de cada estudi (Evangelou i Ioannidis, 2013; Lee *et al.*, 2016). Aquest mètode s'aplica sota l'assumpció del model d'efectes fixes (*fixed effects*), que assumeix que les diferències entre estudis són degudes a l'atzar (Ioannidis, Patsopoulos i Evangelou, 2007), i per tant únicament es pot emprar si no hi ha heterogeneïtat entre estudis. Aquesta heterogeneïtat pot ser deguda a diferències en la definició dels

Discussió

casos, en les mides mostrals, en la proporció de sexes o en l'etnicitat entre estudis, entre d'altres factors. En cas contrari, s'ha d'emprar el model d'efectes aleatoris (*random effects*), que té en consideració les diferències entre estudis (Han i Eskin, 2011). El mètode més emprat és el de DerSimonian (DerSimonian i Laird, 1986), tot i que s'estan desenvolupant nous mètodes que tenen un poder estadístic més gran i que, per tant, faciliten la identificació d'associacions sota el model d'efectes aleatoris (Lee, Eskin i Han, 2017).

En el nostre estudi (Article 4 del Capítol 3) vam realitzar una metanàlisi de quatre estudis GWAS de dependència de cocaïna, emprant dades de genotips preexistents del repositori de dades dbGaP (*The database of Genotypes and Phenotypes*, www.ncbi.nlm.nih.gov/gap). Es va descartar heterogeneïtat entre estudis, amb la qual cosa es va ponderar l'efecte de cada estudi emprant la inversa de la variància, sota el model d'efectes fixes. Tot i agrupar totes les dades disponibles en aquesta base de dades, vam obtenir una mida mostral molt modesta que no té poder estadístic suficient per identificar associacions que superin el nivell de significació dels GWAS ($P < 5 \times 10^{-8}$).

La dependència de cocaïna és una de les malalties psiquiàtriques amb més heretabilitat, entre el 65 i el 79% (Ducci i Goldman, 2012). En base als resultats de la metanàlisi que es presenten aquest treball es pot determinar que l'heretabilitat deguda a SNPs és del 30% (considerant una freqüència de l'al·lel menor, MAF, més gran del 5%), semblant a l'observat prèviament per a la dependència d'alcohol (Mbarek *et al.*, 2015) i altres malalties psiquiàtriques (Mitchell *et al.*, 2014; Anttila *et al.*, 2016). Tot i això, caldria repetir aquesta anàlisi amb una mostra més gran per obtenir resultats més fiables. Aquest valor és aproximadament la meitat de l'heretabilitat total que s'ha calculat a partir dels estudis familiars i de bessons, i per tant quedaria encara pendent explicar una part substancial del substrat genètic de la patologia, que podria ser degut a altres formes de variació genètica tant comunes (p.ex. variants estructurals) com rares.

Com s'ha descrit anteriorment, totes les malalties psiquiàtriques tenen un elevat grau de co-ocurrència (Docherty, Moscati i Fanous, 2016). Concretament, en el cas dels pacients amb abús o dependència de cocaïna, el 73,4% presenten comorbiditats amb altres condicions psiquiàtriques (Arias *et al.*, 2013). Mitjançant dades GWAS es poden emprar diferents aproximacions per determinar si aquesta co-existència fenotípica és deguda a una base genètica compartida. Utilitzant les dades de la metanàlisi hem pogut determinar que hi ha correlació genètica entre la dependència de cocaïna i altres condicions psiquiàtriques o trets de personalitat (TDAH, esquizofrènia, TDM i tendència a assolir riscos), tot suggerint que una part de les variants de risc són compartides en les dues patologies comparades. A més, hem demostrat que aquests trets comòrbids poden predir en part la dependència de cocaïna, tot suggerint que la dependència de cocaïna és més probable en els individus que tenen

més al·lels de risc per les condicions testades (TDAH, esquizofrènia, TDM, agressivitat, personalitat antisocial i personalitat amb tendència a assolir riscos) que els que tenen menys al·lels de risc. Estudis previs han obtingut resultats similars entre dependència de cocaïna i esquizofrènia o TDM (Carey *et al.*, 2016; Hartz *et al.*, 2017; Reginsson *et al.*, 2018), però tots ells tenien una mida mostral més petita que la nostra. Aquestes correlacions genètiques indiquen que hi ha un percentatge elevat de variants genètiques pleiotròpiques en els trastorns psiquiàtrics, és a dir, canvis que estan relacionats causalment amb més d'una patologia, i que podrien explicar, almenys en part, la comorbiditat. També podria contribuir a l'elevada comorbiditat que s'observa entre diferents trastorns psiquiàtrics el fet que un dels fenotips sigui causant de l'altre, i en aquest cas les variants de susceptibilitat al primer fenotip estarien associades al segon fenotip de forma indirecta.

Tot i que en la nostra metanàlisi de dependència de cocaïna no s'ha obtingut cap resultat que superi correccions múltiples ($P < 5 \times 10^{-8}$), hem identificat 22 regions independents que contenen, com a mínim, una variant amb associació suggestiva ($P < 1 \times 10^{-5}$). La regió que presenta més associacions suggestives es correspon amb la regió associada a esquizofrènia que té més suport estadístic (6p22.1). Aquesta regió està altament enriquida en gens que codifiquen histones i proteïnes del sistema immunològic, ambdós grups funcionals prèviament associats a les malalties psiquiàtriques (O'Dushlaine *et al.*, 2015). Aquest resultat, juntament amb les dades de correlació genètica, posen de manifest que la co-ocurrència clínica entre l'esquizofrènia i la dependència de cocaïna podria ser deguda a una base genètica compartida.

2. Canvis d'expressió gènica induïts per la cocaïna

Diversos estudis realitzats en mostres humanes i en models animals demostren que la cocaïna produeix canvis a nivell epigenètic i d'expressió gènica que donen lloc a adaptacions moleculars i cel·lulars al sistema nerviós central, les quals podrien explicar la persistència de la cerca compulsiva de la droga, fins i tot després de llarg períodes d'abstinència (Robison i Nestler, 2012; Schmidt *et al.*, 2013; Zhou, Enoch i Goldman, 2014; Farris, Harris i Ponomarev, 2015).

2.1 Microarrays i seqüenciació massiva (RNAseq)

Gràcies a les noves tecnologies d'anàlisi a escala genòmica és possible estudiar a la vegada els canvis d'expressió de tots els gens (transcriptoma) i els mecanismes de regulació epigenètics (epigenoma), ja siguin microRNAs, metilació del DNA o modificacions d'histones. Inicialment s'utilitzaven els microxips de DNA (o *microarrays*), que contenen una extensa col·lecció de sondes que permeten l'anàlisi de l'expressió diferencial de gens predeterminats a gran escala. Tot i que aquestes tècniques han evolucionat molt des de que es van començar a implementar, tenen certes limitacions, com ara la

Discussió

dificultat per detectar transcrits amb baixos nivells d'expressió, o la impossibilitat de detectar nous transcrits o isoformes no conegudes. Per superar aquestes limitacions s'han desenvolupat noves tècniques basades en la seqüenciació massiva (*Next Generation Sequencing*, NGS), que permeten detectar amb elevada sensibilitat no només els transcrits de gens coneguts sinó també transcrits nous o específics de teixit (Mutz *et al.*, 2013). Per contra, les noves tecnologies NGS suposen un repte tant a nivell analític com en relació a l'emmagatzematge de grans quantitats de dades, tot i que s'han desenvolupat moltes eines bioinformàtiques per facilitar-ne l'anàlisi (Costa-Silva, Domingues i Lopes, 2017). Tot i les diferències entre aquestes dues tecnologies, s'ha vist que hi ha una gran correlació ($\rho=0,8$) en relació a la quantificació de transcrits coneguts (Guo *et al.*, 2013). En funció de l'objectiu de l'estudi serà més adequat emprar un eina o una altra.

2.2 Estudis transcriptòmics en humans i ratolins

El ratolí és el model animal més utilitzat per estudiar la biologia humana i les malalties que se'n deriven. Tot i que la majoria de processos biològics i elements genètics estan conservats entre les dues espècies, s'ha de tenir en compte que algunes característiques han divergit significativament. No obstant això, el perfil d'expressió gènica entre humans i ratolins està altament conservat, sobretot en els teixits en què predomina l'expressió de gens específics de teixit com el cervell, el cor, el fetge, els ronyons o els testicles (Breschi, Gingeras i Guigó, 2017).

Les mostres *post-mortem* de cervell d'individus que han abusat de la cocaïna són una eina molt útil per estudiar els canvis d'expressió gènica que donen lloc a l'addicció. No obstant això, hi ha una sèrie de limitacions inherents en aquests estudis i en el fenotip estudiat (discutit prèviament a la Introducció d'aquest Tesi Doctoral) que dificulten tant l'obtenció de resultats individuals fiables, com la identificació de gens i vies convergents entre estudis. En qualsevol cas, molts estudis recorren a models animals i cel·lulars que, tot i que no mimetitzen tots els aspectes de l'addicció, tenen el gran avantatge que permeten controlar millor les variables. A més, els models animals ens permeten identificar vies molecular implicades en la diferents etapes de l'addicció: resposta aguda i crònica a les drogues, efecte de l'administració de diferents dosis de droga, canvis produïts durant l'abstinència i la recaiguda en el consum.

L'estudi dels gens identificats en mostres humanes i models animals permet incrementar el coneixement sobre l'efecte de la cocaïna al cervell i les bases neurobiològiques que donen lloc a les addiccions. Tot i que és difícil trobar vies comunes per les diferències entre espècies i també pel patró d'exposició a la cocaïna, s'ha vist que tant en models animals com en mostres *post-mortem* humanes la cocaïna actua sobre la via de les MAPK i els gens associats a LTP sinàptica (Lull *et al.*, 2008), ambdues

molt importants en processos de neuroplasticitat, memòria i aprenentatge (Peng *et al.*, 2010; Giese i Mizuno, 2013).

2.3 Gens i vies identificades en els nostres estudis d'expressió

Canvis d'expressió de mRNAs i de microRNAs induïts per cocaïna en neurones dopaminèrgiques

Els efectes addictius i de recompensa de la cocaïna estan mediatos principalment per la dopamina, un neurotransmissor clau del sistema de recompensa. La cocaïna s'uneix al transportador de dopamina (DAT) incrementant els nivells de dopamina a la sinapsis que estimula les neurones de les regions cerebrals implicades en el sistema de reforç i recompensa.

Al nostre grup vam realitzar un estudi en cèl·lules dopaminèrgiques en cultiu tractades de forma aguda amb cocaïna 1µM o 5µM (Article 5 del Capítol 4). Únicament el tractament amb cocaïna 5µM produeix un gran increment de l'activitat neuronal (potencials d'acció) juntament amb canvis d'expressió de centenars de gens, la majoria relacionats amb la regulació de la transcripció, el cicle cel·lular, adhesió i projecció cel·lular, així com també gens implicats en les vies de senyalització MAPK, CREB, neurotrofina i neuregulina. Mitjançant anàlisis bioinformàtiques predictives vam detectar un enriquiment de llocs d'unió de microRNAs en aquests gens, i vam plantejar la hipòtesi que els microRNAs serien responsables, en part, dels canvis d'expressió gènica induïts per la cocaïna (Article 6 del Capítol 4). Utilitzant el mateix model cel·lular vam testar onze microRNAs que presumiblement regulaven gens activats per la cocaïna, i vam confirmar que set d'ells estaven regulats a la baixa per la cocaïna: miR-124-3p, miR-124-5p, miR-137, miR-101-3p, miR-9-5p, miR-369-3p, miR-153-3p. Els tres últims no s'havien relacionat prèviament amb la cocaïna i per tant constitueixen noves troballes. A més, entre alguns dels gens i microRNAs diferencialment expressats hi ha algunes interaccions microRNA:mRNA prèviament descrites a la literatura: per exemple, *TEAD-1* és una diana validada del miR-124-3p, de la mateixa manera que *Ryr3*, el qual també pot estar regulat pel miR-153 (Lim *et al.*, 2005; Mucaj *et al.*, 2015). Aquests resultats, conjuntament amb estudis previs, posen de manifest la importància dels microRNAs com a mediadors dels canvis d'expressió gènica induïts per cocaïna.

És important destacar que aquest treball s'ha realitzat en neurones dopaminèrgiques en cultiu diferenciades a partir d'una línia tumoral, i per tant els resultats obtinguts podrien no correspondre's amb els canvis que s'esdevenen en vies dopaminèrgiques del cervell. No obstant això, la majoria de vies identificades en aquest estudi es corresponen amb vies prèviament identificades en estudis en mostres humanes i de ratolins. De la mateixa manera, la disminució de l'expressió induïda per cocaïna en quatre dels microRNAs del nostre estudi s'havia identificat prèviament en ratolins (Chandrasekar i

Discussió

Dreyer, 2009; Quinn *et al.*, 2017). Aquestes evidències donen suport als resultats que hem obtingut i validen el model de cara a la realització d'estudis posteriors.

Gens i vies comunes en estudis d'expressió en humans

Els estudis realitzats per d'altres autors en mostres de cervell *post-mortem* d'individus que han abusat de la cocaïna han permès identificar alteracions en els perfils d'expressió de gens implicats en moltes funcions, com adhesió cel·lular, factors de transcripció, canals iònics i receptors, remodeladors de la cromatina, resposta immune i estrès, etc. Tot i això, resulta difícil trobar gens i vies comunes entre estudis, possiblement a causa de les diferències interindividuais, com el moment en què va tenir lloc l'última exposició a la cocaïna (Lehrmann *et al.*, 2003), o l'àrea cerebral estudiada: escorça prefrontal (Lehrmann *et al.*, 2003, 2006), nucli accumbens (NAc, Albertson *et al.*, 2004), regions dopaminèriques (Bannon *et al.*, 2014) o hipocamp (Mash *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2011).

La identificació d'alteracions convergents entre estudis podria facilitar la comprensió dels mecanismes i vies subjacents a l'addicció i facilitar la identificació de dianes terapèutiques. En el nostre treball (Article 7 del Capítol 4) vam analitzar dades de quatre estudis realitzats en mostres humanes: tres estudis en mostres *post-mortem* d'individus amb abús de cocaïna a nivell de NAc (Albertson *et al.*, 2004), regions dopaminèrgiques (Bannon *et al.*, 2014) i hipocamp (Zhou *et al.*, 2011), i un estudi nostre realitzat en neurones dopaminèrgiques en cultiu tractades amb cocaïna (Fernández-Castillo *et al.*, 2015). En tres dels quatre estudis analitzats vam identificar tres gens comuns: *BEX1* i *SON*, implicats en diferenciació neuronal i desenvolupament del cervell (Vilar *et al.*, 2006; Khazaei *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016), i *ATP50*, implicat en el metabolisme energètic (Chen *et al.*, 1995). També vam detectar tres vies canòniques comunes en tots quatre estudis: "Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP signaling", "Senyalització nNOS en neurones" i "Potenciació sinàptica a llarg termini". Donada la poca freqüència de resultats convergents entre estudis transcriptòmics, el fet que totes tres vies apareguin en tots els estudis s'ha d'interpretar com una forta evidència a favor del seu paper com a mediadores dels efectes de la cocaïna i possiblement també en el desenvolupament de l'addicció.

Cal remarcar que s'ha observat una convergència de gens diferencialment expressats (DE) significativa (12 gens, $P=7,9 \times 10^{-4}$) entre l'estudi en mostres *post-mortem* de nucli accumbens (482 gens DE; Albertson *et al.*, 2004) i el de neurones dopaminèrgiques en cultiu (145 gens DE; Fernández-Castillo *et al.*, 2015). El nucli accumbens és un àrea essencial en la transició del consum a la dependència (Han i Lu, 2016; Cooper, Robison i Mazei-Robison, 2017). La convergència de gens DE entre aquests dos sistemes reforça l'ús d'aquest model cel·lular dopaminèrgic en estudis d'expressió gènica.

3. Gens amb expressió alterada per cocaïna que tenen variants de risc

En aquesta Tesi Doctoral hem utilitzat dues aproximacions per identificar gens i variants genètiques que contribueixen a la dependència de cocaïna: els estudis d'associació cas-control i els estudis d'expressió gènica. Aquests estudis ens han permès identificar un conjunt de gens que podrien contribuir a la dependència de cocaïna: *NFAT5*, *PLCB1*, *NSF*, *hsa-miR-9-1*, *hsa-miR-153-1* i *hsa-miR-124-3*. En tots aquests gens hem pogut identificar variants genètiques de susceptibilitat a la dependència de cocaïna i, a la vegada, hem vist que la cocaïna altera els seus nivells d'expressió en diferents estudis realitzats en mostres humanes. Aquesta coincidència és interessant perquè obre una via per identificar possibles gens candidats a la dependència de cocaïna, que poden sorgir d'estudis transcriptòmics.

Primerament, hem identificat al gen *NSF* diversos factors genètics de risc a la dependència i al desenvolupament ràpid d'aquesta dependència: un SNP, un haplotip format per diversos SNPs i una CNV. En paral·lel, altres autors havien observat que aquest gen presentava alteracions en la seva expressió en mostres *post-mortem* d'escorça prefrontal d'individus amb problemes d'abús o dependència de cocaïna (Lehrmann *et al.*, 2003). En segon lloc, hem observat que l'expressió dels gens *NFAT5* i *PLCB1* és més elevada en neurones dopaminèrgiques en cultiu tractades amb cocaïna que en controls. En el cas del gen *PLCB1*, altres autors també han constatat un increment de l'expressió en mostres *post-mortem* de NAc d'individus amb abús o dependència de cocaïna (Albertson *et al.*, 2004). A més, en tots dos gens hem pogut identificar variants de susceptibilitat a la dependència de cocaïna, les quals a la seva vegada podrien alterar llocs d'unió a microRNAs. D'altra banda, hem identificat tres microRNAs (*hsa-miR-9-1*, *hsa-miR-153-1* i *hsa-miR-124-3*) l'expressió dels quals disminueix sota l'acció de la cocaïna, i que a més presenten associacions nominals amb la dependència a cocaïna en estudis cas-control.

Finalment, un altre estudi publicat recentment (Kelaii *et al.*, 2017) apuntaria en la mateixa direcció: el gen *NTNG1*, en el qual s'ha identificat un haplotip de risc a la dependència de cocaïna, està regulat a la baixa al NAc de ratolins exposats a cocaïna.

En resum, alguns dels gens l'expressió dels quals es veu alterada per la cocaïna podrien tenir variants genètiques de susceptibilitat a la dependència de cocaïna. Això recolza la idea de l'adaptació dels circuits neuronals produïda en resposta a l'exposició crònica a la cocaïna, que depèn de la interacció de factors genètics, epigenètics i ambientals, i ens permet explicar per què en alguns individus es desenvolupa dependència però no en d'altres.

4. Models animals genoanul·lats (*knock-out*)

Els models animals són una eina molt potent que ens permet estudiar la base neurobiològica d'una patologia i identificar potencials dianes terapèutiques. El principal avantatge d'aquest sistema és que ens permet controlar molt finament variables experimentals com l'edat i el sexe dels animals, la dosi administrada, el temps d'exposició a la droga, etc. No obstant això, és molt important tenir present que en animals no es pot modelar perfectament cap trastorn psiquiàtric degut a la seva complexitat i els models animals son per definició models parcials. En el cas del trastorn addictiu descrit en humans segons els criteris del DSM-4 (o DSM-5), es poden modelar aspectes concrets de l'addicció com el reforç, la persistència, la motivació, la pèrdua de control i la recaiguda (García *et al*, 2017).

Actualment es disposa de diversos paradigmes que ens permeten estudiar diferents aspectes de la conducta addictiva. Un dels més emprats és l'autoadministració de la droga, en el qual els animals són entrenats per obtenir la droga mitjançant una resposta operant (p.ex. pressionar una palanca o introduir el musell en un forat). Aquest paradigma està molt relacionat amb l'abús en humans tant en la forma d'administració de la droga com en la resposta conductual que es genera per obtenir-la (O'Connor *et al*, 2011). El principal inconvenient és que a causa de la seva complexitat només es pot utilitzar amb substàncies que tinguin un elevat potencial addictiu, com la cocaïna. A través de modificacions del sistema podem estudiar molts aspectes de la conducta addictiva com l'adquisició, el manteniment, l'extinció i la reinstauració de la resposta operant.

Els models genoanul·lats (KO) ens permeten determinar la implicació d'un gen concret en l'establiment de l'addicció. L'eliminació completa de l'expressió del gen pot donar lloc a fenotips molt incapacitants que limitin l'adquisició de l'addicció, i a més no representen el que succeeix en humans, ja que rarament es produeix la deleció sencera del gen. Per això molts estudis opten per utilitzar animals KO heterozigots, que en general expressen el 50% de la proteïna, per simular millor les variacions que trobem en humans (Hall *et al*, 2013). Aquesta aproximació és la que hem emprat per testar l'efecte del gen *PLCB1* sobre la dependència de cocaïna (Annex I de l'Article 2 del Capítol 2).

El gen *PLCB1* codifica la Fosfolipasa C beta 1, que s'expressa majoritàriament a l'escorça cerebral, l'hipocamp i l'amígdala. La seva activació s'indueix pels neurotransmissors dopamina, serotonina i glutamat, desencadenant l'alliberació de calci intracel·lular i activant així els enzims cel·lulars sensibles a calci (Wallace i Claro, 1990a, 1990b; Kim *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 2005). Es considera un mediador de la plasticitat sinàptica, el comportament i les emocions (Caricasole *et al.*, 2000; McOmish *et al.*, 2008), i s'ha relacionat prèviament amb altres trastorns psiquiàtrics com l'esquizofrènia, el trastorn bipolar, l'autisme o l'epilèpsia (Yang *et al.*, 2016). Aquestes dades, juntament amb els resultats dels estudis

d'associació i expressió gènica, assenyalaven el gen *PLCB1* com un bon candidat per ésser estudiat en un model animal.

En la caracterització fenotípica dels ratolins heterozigots *Plcb1*^{+/-} (HZ), vam poder observar un increment de l'activitat exploratòria i ansietat, així com alteracions en la memòria i l'aprenentatge dependent de l'hipocamp en comparació amb els ratolins de la soca salvatge *Plcb1*^{+/+} (WT). En relació als resultats d'autoadministració de cocaïna, la fase inicial de l'adquisició (FR1) indicava que els ratolins HZ tenen un consum més gran de cocaïna respecte els ratolins WT, i això es podria explicar tant per un efecte reforçant més gran de la droga en els HZ com pel fet que potser en necessiten una dosi més elevada per obtenir els mateixos efectes que els WT. No obstant això, a l'hora de valorar el reforç augmentant l'esforç (FR3) i la motivació per la droga (PR) vam veure que no hi ha diferències entre WT i HZ, igual que en l'extinció de la resposta operant. On vam poder observar les diferències més interessants va ser en la fase de restabliment de la resposta, que simula la situació de recaiguda dels humans. En aquesta etapa vam observar que tant els ratolins WT com els HZ recorden que l'estímul condicionat està associat als efectes reforçants de la cocaïna, en comparació amb els ratolins controls que reben una solució salina. Però els ratolins HZ interrompen abans que els WT la cerca de la droga, fet que es podria interpretar com una disminució de la probabilitat de recaiguda. Aquests resultats podrien indicar que el gen *PLCB1* està implicat en la recaiguda del consum de cocaïna, i per tant podria ser una diana terapèutica molt interessant per al tractament de la dependència de cocaïna en humans.

Un aspecte important a considerar en aquests animals és la disminució de la memòria i l'aprenentatge dependent de l'hipocamp detectada en el test de reconeixement d'un objecte nou (*Novel Object Recognition*, NOR), donat que podria ser una de les causes per les quals aquests ratolins recauen menys. Tot i això, el fet de que la resposta dels ratolins HZ sigui més gran en els animals que s'han autoadministrat cocaïna que en els HZ controls (reben una solució salina) ens indica que s'ha associat correctament l'estímul condicionat a l'efecte reforçant de la cocaïna. A més, els resultats obtinguts en l'estudi de transcriptòmica ens mostra que les principals diferències entre ratolins WT i HZ que s'han autoadministrat cocaïna es troben a l'escorça prefrontal, i en canvi pràcticament no hi ha diferències en l'hipocamp. L'hipocamp està implicat en la generació de records associats a la droga, molt important en l'inici del procés addictiu, però a mesura que es consolida l'addicció s'estableix l'habitució de la resposta que depèn del nucli estriat (Goodman i Packard, 2016). En canvi, l'escorça prefrontal, implicada el control inhibitori dels impulsos, té un paper fonamental en el consum compulsiu de la droga i la recaiguda (Goldstein i Volkow, 2011; Volkow i Morales, 2015), recolzant la idea que la disminució de la recaiguda en aquests animals podria ser independent de la pèrdua de memòria hipocampal. En qualsevol cas, s'hauran de realitzar més estudis per confirmar els resultats obtinguts. Una possible aproximació seria tractar ratolins WT amb un inhibidor de *PLCB1*, ja sigui un

fàrmac o un shRNA, i determinar si es reproduïx el fenotip observat als animals HZ, és a dir, una disminució del nombre de respostes operants per la cerca de droga.

5. Perspectives de futur

El consum de drogues és un gran problema de salut pública que té un gran impacte socio-sanitari. Tot i que l'experimentació inicial amb les drogues és voluntària, el seu consum continuat produeix canvis en la funció cerebral que alteren la capacitat d'auto-control respecte la droga. Les diferències genètiques, epigenètiques i ambientals determinen com es produeix aquesta transició que dona lloc a la dependència. Tot i que el coneixement sobre les bases neurobiològiques i genètiques de la dependència de cocaïna ha augmentat considerablement en els últims anys, encara no s'ha pogut desenvolupar cap tractament efectiu (Pierce *et al.*, 2012, 2018), i per això calen més estudis per tal de comprendre més bé els mecanismes subjacents i dissenyar noves teràpies.

Per poder aprofundir en la base genètica de la dependència de cocaïna és necessari incrementar la mida mostral dels estudis GWAS, encara molt limitats en aquest trastorn, amb l'objectiu d'assolir els nivells de significació necessaris per identificar variants comunes de susceptibilitat. Per això el *Psychiatric Genomics Consortium* (PGC) està començant a recopilar i genotipar una gran quantitat de mostres d'individus de dependents de diferents drogues (60.000 casos) amb els quals realitzaran metanàlisis per dependència de cocaïna, opiàcis, cànnabis i alcohol (Franzcp i Ole, 2017).

Aquests estudis ens permeten identificar gens candidats que poden ser testats en models animals per determinar la seva contribució a la dependència de cocaïna, ja sigui mitjançant l'ús d'animals genoanul·lats, o emprant inhibidors de l'expressió gènica (per exemple shRNAs per bloquejar mRNAs o antagonistes de microRNAs, com els antagomiRs). D'altra banda, aquests models ens permeten testar noves teràpies, ja que diversos estudis demostren que els resultats obtinguts amb models animals d'autoadministració de la cocaïna són els que més èxit tenen als estudis clínics posteriors (Haney i Spealman, 2008), tot i que fins ara no s'ha trobat cap medicament completament efectiu. L'ús de fàrmacs que actuen sobre els gens i les vies identificades en els nostres estudis podrien donar lloc a noves teràpies per tractar la dependència de cocaïna i evitar les recaigudes en el consum. En el cas del gen *PLCB1*, estem iniciant una aproximació terapèutica per disminuir les recaigudes en el consum de cocaïna emprant un fàrmac inhibidor de la via en ratolins de la soca salvatge.

Una altra àrea emergent de recerca en relació a la dependència és l'efecte de l'epigenètica, incloent-hi modificacions d'histones, metilació del DNA i també els microRNAs. Diversos estudis han demostrat que la cocaïna, com altres drogues, pot alterar els mecanismes de regulació epigenètica tot produint canvis en l'expressió gènica i neuroadaptacions que condueixen a l'addicció (Kenny, 2014; Nestler,

2014; Pierce *et al.*, 2018; Vaillancourt *et al.*, 2017). Aquests mecanismes epigenètics poden estar influenciats per variants genètiques de susceptibilitat. En aquest Tesi Doctoral hem explorat el paper de variants comunes en microRNAs i en els seus llocs d'unió en relació a la predisposició a la dependència de cocaïna (Articles 2, 5 i 6 dels Capítols 2 i 4, respectivament). D'altra banda, el grup de recerca està explorant també el paper dels al·lells sensibles a metilació (ASM), variants genètiques de tipus SNP que produeixen canvis en els nivells de metilació d'un lloc CpG en funció de l'al·lel present, tot alterant els nivells d'expressió dels gens regulats per aquests llocs CpG. En aquest sentit, alguns autors han explorat la relació entre aquestes variants i els nivells de metilació en mostres *post-mortem* de cervell humà (Gibbs *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). Emprant aquestes dades per inspeccionar dades GWAS de dependència de cocaïna, es podrien identificar variants associades al trastorn. Una altra aproximació per identificar factors epigenètics de risc és l'ús de models animals. En general, els estudis en models animals es realitzen en soques pures o endogàmiques (*inbred strains*), és a dir, en animals genèticament homogenis. Tot i la identitat genètica, una part dels animals no adquireixen el comportament operant per la cocaïna (és a dir, la cocaïna no actua com un reforç del seu comportament en relació a la cerca i obtenció de la droga), la qual cosa suggereix que hi ha factors de susceptibilitat diferencials en aquests animals que no estan determinats en la seqüència de nucleòtids, per exemple diferències en la metilació del DNA. Aquestes aproximacions ens podrien donar nova informació sobre regions i gens importants en l'adquisició de la dependència des d'una altra perspectiva, ampliant el nostre coneixement sobre aquesta patologia.

CONCLUSIONS

Estudi de la possible associació entre una variant de nombre de còpies (CNV) al gen *NSF* i la dependència de cocaïna.

1. El CNV del gen *NSF* està associat a la dependència de cocaïna.
2. Un baix nombre de còpies del CNV està associat a l'aparició ràpida de la dependència (1 any o menys des del primer consum de cocaïna).
3. El nombre de còpies del CNV presenta correlació positiva amb els nivells d'expressió de dos transcrits del gen *NSF*, suggerint un efecte funcional.

Contribució del gen *PLCB1* a la dependència de drogues en general, i a la cocaïna en particular.

4. L'estudi de variants localitzades al lloc d'unió de microRNAs al gen *diana* ha permès identificar, i replicar, l'associació de la variant rs1047383 del gen *PLCB1* amb la dependència de drogues i de cocaïna.
5. L'expressió del gen *PLCB1* està incrementada en neurones dopaminèrgiques tractades amb cocaïna i en mostres *post-mortem* de cervell d'individus amb abús de cocaïna.
6. Els ratolins *Plcb1 +/-* mostren un patró d'autoadministració de la cocaïna similar als ratolins WT, però presenten una disminució en el restabliment de la cerca de la droga després d'un període d'abstinència respecte els ratolins WT. Això es podria relacionar amb una menor possibilitat de recaiguda en el consum.

Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS) amb la dependència de cocaïna.

7. Només una de les tres associacions descrites en GWAS previs amb dependència de drogues o cocaïna, rs2952621, s'ha replicat a la nostra mostra.
8. En la metanàlisi de GWAS de dependència de cocaïna no s'ha obtingut cap associació significativa a escala genòmica, probablement pel limitat poder estadístic de la mostra. S'han identificat associacions suggestives amb 22 segments del genoma independents, entre les quals destaca la regió 6p22.1, prèviament associada a l'esquizofrènia.
9. L'heretabilitat estimada de la dependència de cocaïna deguda a SNPs és aproximadament del 30%, caldria una mostra més gran per confirmar aquest resultat.
10. S'ha identificat correlació genètica entre la dependència de cocaïna i TDAH, esquizofrènia, trastorn depressiu major, personalitat amb tendència a assolir riscos, tot suggerint una base genètica compartida entre patologies.
11. L'anàlisi de risc poligènic mostra que tots els trets comòrbids analitzats (TDAH, esquizofrènia, trastorn depressiu major, agressivitat, personalitat antisocial o amb tendència a assolir riscos) poden predir la dependència de cocaïna.

Efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica: estudis en models neuronals en cultiu i en mostres de cervell *post-mortem* humanes.

12. Els resultats en neurones dopaminèrgiques tractades amb cocaïna suggereixen que els canvis transcriptòmics són concomitants als d'activitat neuronal i succeeixen a partir d'un llindar de concentració de cocaïna.
13. La majoria dels 756 gens diferencialment expressats en el model anterior estan relacionats amb la regulació de la transcripció, cicle cel·lular, adhesió i projecció cel·lular i vies de senyalització.
14. L'estudi de variants en cinc dels gens diferencialment expressats, ha revelat associació amb cinc variants del gen *NFAT5* que podrien alterar la unió de microRNAs.
15. L'estudi funcional de la variant rs1437134 al gen *NFAT5*, identificada en l'estudi anterior, mostra que el miR-509 produeix una disminució significativa de l'activitat del gen diana en presència de l'al·lel de risc (G).
16. En el mateix model dopaminèrgic s'ha confirmat que set microRNAs estan regulats a la baixa per la cocaïna.
17. Tres gens que codifiquen per aquests microRNAs (*hsa-miR-9-1*, *hsa-miR-153-1* i *hsa-miR-124-3*) estan nominalment associats a la dependència de cocaïna.
18. L'anàlisi conjunt d'estudis de transcriptòmica en mostres humanes exposades a cocaïna ha permès identificar gens (*SON*, *BEX1* i *ATP5O*) i tres vies comunes potencialment rellevants per l'addicció.

Els nostres estudis han permès identificar variants de susceptibilitat a la dependència en gens diferencialment expressats per l'acció de la cocaïna. Aquests resultats recolzen la idea de que els factors de risc genètics, epigenètics i ambientals determinen l'adaptació dels circuits neuronals produïda per la cocaïna, i això permetria explicar les diferències interindividuais en relació al desenvolupament de l'addicció.

BIBLIOGRAFIA

- Afonso-Grunz, F. i Müller, S. (2015) «Principles of miRNA–mRNA interactions: beyond sequence complementarity», *Cell. Mol. Life Sci.*, 72(16), p. 3127-3141.
- Agrawal, A. *et al.* (2006) «Association of GABRA2 with drug dependence in the collaborative study of the genetics of alcoholism sample», *Behav. Genet.*, 36(5), p. 640-650.
- Al-Eitan, L. N. *et al.* (2014) «Characterization of serotonin transporter gene (SLC6A4) polymorphisms and its association with drug dependence in a Jordanian Arab population», *Toxicol. Ind. Health*, 30(7), p. 598-610.
- Albertson, D. N. *et al.* (2004) «Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin.», *J. Neurochem.*, 88(5), p. 1211-9.
- Albertson, D. N. *et al.* (2006) «Distinctive profiles of gene expression in the human nucleus accumbens associated with cocaine and heroin abuse», *Neuropsychopharmacology*, 31(10), p. 2304-2312.
- Allan, A. M. *et al.* (2001) «Conditioned place preference for cocaine is attenuated in mice over-expressing the 5-HT3 receptor», *Psychopharmacol.*, 158(1), p. 18-27.
- Alterman, A. I. *et al.* (1996) «Prediction of attrition from day hospital treatment in lower socioeconomic cocaine-dependent men.», *Drug Alcohol Depend.*, 40(3), p. 227-33.
- Alving, C. R. *et al.* (2014) «Adjuvants for vaccines to drugs of abuse and addiction», *Vaccine*, p. 5382-5389.
- Ambrose-Lanci, L. M. *et al.* (2012) «Association study of the β -arrestin 2 gene (ARRB2) with opioid and cocaine dependence in a European-American population», *Psychiatr. Genet.*, 22(3), p. 141-145.
- Ameri, A. (1999) «The effects of cannabinoids on the brain», *Prog. Neurobiol.*, p. 315-348.
- American Psychiatric Association (2013) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 5th ed.
- Anttila, V. *et al.* (2016) «Analysis of shared heritability in common disorders of the brain», *bioRxiv*, p. 48991.
- Aoki, M. *et al.* (2014) «Identification of possible downstream genes required for the extension of peripheral axons in primary sensory neurons», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 445(2), p. 357-362.
- Arias, F. *et al.* (2013) «Abuso o dependencia a la cocaína y otros trastornos psiquiátricos. Estudio Madrid sobre la prevalencia de la patología dual», *Rev. Psiquiatr. Salud Ment.*, 6(3), p. 121-128.
- Arroyo, M., Baker, W. A. i Everitt, B. J. (2000) «Cocaine self-administration in rats differentially alters mRNA levels of the monoamine transporters and striatal neuropeptides», *Mol. Brain Res.*, 83(1-2), p. 107-120.
- Ashby, C. R. *et al.* (2015) «The selective dopamine D3 receptor antagonist SB-277011A attenuates drug- or food-deprivation reactivation of expression of conditioned place preference for cocaine in male sprague-dawley rats», *Synapse*, 69(6), p. 336-345.
- Aston-Jones, G. *et al.* (2010) «Lateral hypothalamic orexin/hypocretin neurons: A role in reward-seeking and addiction», *Brain Res.*, 1314, p. 74-90.
- Bae, J. S. *et al.* (2012) «The genetic effect of copy number variations on the risk of alcoholism in a Korean population», *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 36(1), p. 35-42.
- Baker-Andresen, D. *et al.* (2015) «Persistent variations in neuronal DNA methylation following cocaine self-administration and protracted abstinence in mice», *Neuroepigenetics*, 4, p. 1-11.
- Baker, R. W. i Hughson, F. M. (2016) «Chaperoning SNARE assembly and disassembly», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, p. 465-479.
- Bannon, M. J. *et al.* (2002) «Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine abusers.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99(9), p. 6382-5.
- Bannon, M. J. *et al.* (2014) «A molecular profile of cocaine abuse includes the differential expression of genes that regulate transcription, chromatin, and dopamine cell phenotype», *Neuropsychopharmacology*, 39(9), p. 2191-2199.
- Bannon, M., Kapatos, G. i Albertson, D. (2005) «Gene expression profiling in the brains of human cocaine abusers.», *Addict. Biol.*, 10(1), p. 119-26.
- Barszczewski, M. *et al.* (2008) «A novel site of action for alpha-SNAP in the SNARE conformational cycle controlling membrane fusion.», *Mol. Biol. Cell*, 19(3), p. 776-784.
- Bartel, D. P. (2004) «MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function», *Cell*, p. 281-297.
- Belzung, C. *et al.* (2000) «Absence of cocaine-induced place conditioning in serotonin 1B receptor knock-out mice», *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 66(1), p. 221-225.

Bibliografia

- Benevento, M. *et al.* (2015) «The role of chromatin repressive marks in cognition and disease: A focus on the repressive complex GLP/G9a», *Neurobiol. Learn. Mem.*, p. 88-96.
- Berrettini, W. *et al.* (2008) « α -5/ α -3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking», *Mol. Psychiatry*, 13(4), p. 368-373.
- Beveridge, T. J. *et al.* (2006) «Chronic cocaine self-administration is associated with altered functional activity in the temporal lobes of non human primates», *Eur J Neurosci*, 23(11), p. 3109-3118.
- Bevilacqua, L. i Goldman, D. (2013) «Genetics of impulsive behaviour», *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 368(1615), p. 20120380.
- Bierut, L. J. *et al.* (2008) «Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence», *Am. J. Psychiatry*, 165(9), p. 1163-1171.
- Bierut, L. J. *et al.* (2010) «A genome-wide association study of alcohol dependence.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(11), p. 5082-7.
- Bijata, M. *et al.* (2017) «Synaptic Remodeling Depends on Signaling between Serotonin Receptors and the Extracellular Matrix», *Cell Rep.*, 19(9), p. 1767-1782.
- Bird, A. P. i Wolffe, A. P. (1999) «Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin», *Cell*, 99(5), p. 451-454.
- Bisaga, A. *et al.* (2010) «A placebo-controlled trial of memantine for cocaine dependence with high-value voucher incentives during a pre-randomization lead-in period», *Drug Alcohol Depend.*, 111(1-2), p. 97-104.
- Bisagno, V., González, B. i Urbano, F. J. (2016) «Cognitive enhancers versus addictive psychostimulants: The good and bad side of dopamine on prefrontal cortical circuits», *Pharmacol. Res.*, 109, p. 108-118.
- Blomqvist, O., Gelernter, J. i Kranzler, H. R. (2000) «Family-based study of DRD2 alleles in alcohol and drug dependence», *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.*, 96(5), p. 659-664.
- Blum, K. *et al.* (2015) «Clinically Combating Reward Deficiency Syndrome (RDS) with Dopamine Agonist Therapy as a Paradigm Shift: Dopamine for Dinner?», *Mol. Neurobiol.*, 52(3), p. 1862-1869.
- Boeckers, T. M. (2006) «The postsynaptic density», *Cell Tissue Res.*, p. 409-422.
- Borel, C. i Antonarakis, S. E. (2008) «Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences», *Mamm. Genome*, 19(7-8), p. 503-509.
- Boudreau, R. L. *et al.* (2014) «Transcriptome-wide discovery of microRNA binding sites in human brain.», *Neuron*, 81(2), p. 294-305.
- Boutte, D. *et al.* (2012) «Association of genetic copy number variations at 11 q14.2 with brain regional volume differences in an alcohol use disorder population.», *Alcohol*, 46(6), p. 519-527.
- Boyson, C. O. *et al.* (2011) «Prevention of social stress-escalated cocaine self-administration by CRF-R1 antagonist in the rat VTA», *Psychopharmacology (Berl.)*, 218(1), p. 257-269.
- Bremer, P. T. i Janda, K. D. (2017) «Conjugate Vaccine Immunotherapy for Substance Use Disorder.», *Pharmacol. Rev.*, 69(3), p. 298-315.
- Breschi, A., Gingeras, T. R. i Guigó, R. (2017) «Comparative transcriptomics in human and mouse», *Nat. Rev. Genet.*, 18(7), p. 425-440.
- Broderick, P. A. *et al.* (2004) «Clozapine and cocaine effects on dopamine and serotonin release in nucleus accumbens during psychostimulant behavior and withdrawal», *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, 28(1), p. 157-171.
- Brown, T. E. *et al.* (2007) «Role of matrix metalloproteinases in the acquisition and reconsolidation of cocaine-induced conditioned place preference», *Learn. Mem.*, 14(3), p. 214-223.
- Bühler, K. M. *et al.* (2015) «Common single nucleotide variants underlying drug addiction: More than a decade of research», *Addict. Biol.*, 20(5), p. 845-871.
- Caine, S. B. *et al.* (2002) «Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists.», *J. Neurosci.*, 22(7), p. 2977-2988.
- Caine, S. B. *et al.* (2007) «Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice.», *J. Neurosci.*, 27(48), p. 13140-13150.
- Caine, S. B. *et al.* (2012) «Cocaine self-administration in dopamine D₃ receptor knockout mice.», *Exp. Clin.*

Psychopharmacol., 20(5), p. 352-363.

Calipari, E. S. *et al.* (2013) «Methylphenidate amplifies the potency and reinforcing effects of amphetamines by increasing dopamine transporter expression», *Nat. Commun.*, 4, p. 2720.

Camchong, J., Endres, M. i Fein, G. (2014) «Decision making, risky behavior, and alcoholism», en *Handb. Clin. Neurol.*, p. 227-236.

Camí, J. i Farré, M. (2003) «Drug Addiction», *N. Engl. J. Med.*, 349(10), p. 975-986.

Carey, C. E. *et al.* (2016) «Associations between Polygenic Risk for Psychiatric Disorders and Substance Involvement.», *Front. Genet.*, 7, p. 149.

Caricasole, A. *et al.* (2000) «Cloning and characterization of the human phosphoinositide-specific phospholipase C-beta 1 (PLCβ1)», *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1517, p. 63-72.

Carta, A. R., Gerfen, C. R. i Steiner, H. (2000) «Cocaine effects on gene regulation in the striatum and behavior: Increased sensitivity in D3 dopamine receptor-deficient mice», *Neuroreport*, 11(11), p. 2395-2399.

Cason, A. M., Kohtz, A. i Aston-Jones, G. (2016) «Role of corticotropin releasing factor 1 signaling in cocaine seeking during early extinction in female and male rats», *PLoS One*, 11(6), p. e0158577.

Castilla-Ortega, E. *et al.* (2016) «A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult hippocampal neurogenesis», *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 66, p. 15-32.

Castilla-Ortega, E. *et al.* (2017) «The impact of cocaine on adult hippocampal neurogenesis: Potential neurobiological mechanisms and contributions to maladaptive cognition in cocaine addiction disorder», *Biochem. Pharmacol.*, 141, p. 100-117.

Catalanotto, C., Cogoni, C. i Zardo, G. (2016) «MicroRNA in Control of Gene Expression: An Overview of Nuclear Functions.», *Int. J. Mol. Sci.*, 17(10), p. 1712.

Celentano, M. *et al.* (2009) «Drug context differently regulates cocaine versus heroin self-administration and cocaine- versus heroin-induced Fos mRNA expression in the rat», *Psychopharmacology (Berl.)*, 204(2), p. 349-360.

Chandra, R. i Lobo, M. K. (2017) «Beyond Neuronal Activity Markers: Select Immediate Early Genes in Striatal Neuron Subtypes Functionally Mediate Psychostimulant Addiction.», *Front. Behav. Neurosci.*, 11, p. 112.

Chandrasekar, V. i Dreyer, J. L. (2009) «microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate Cocaine-induced Plasticity», *Mol. Cell. Neurosci.*, 42(4), p. 350-362.

Chandrasekar, V. i Dreyer, J. L. (2010) «The brain-specific neural zinc finger transcription factor 2b (NZF-2b/7ZFMyt1) suppresses cocaine self-administration in rats», *Front. Behav. Neurosci.*, 4, p. 14.

Chandrasekar, V. i Dreyer, J. L. (2011) «Regulation of miR-124, let-7d, and miR-181a in the accumbens affects the expression, extinction, and reinstatement of cocaine-induced conditioned place preference», *Neuropsychopharmacology*, 36(6), p. 1149-1164.

Chanock, S. J. *et al.* (2007) «Replicating genotype–phenotype associations», *Nature*, 447(7145), p. 655-660.

Chausmer, A. L. *et al.* (2002) «Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D2 receptor mutant mice», *Psychopharmacology (Berl.)*, 163(1), p. 54-61.

Chen, A. C. H. *et al.* (2002) «Potentially functional polymorphism in the promoter region of prodynorphin gene may be associated with protection against cocaine dependence or abuse», *Am. J. Med. Genet.*, 114(4), p. 429-435.

Chen, C.-L., Liu, H. i Guan, X. (2013) «Changes in microRNA expression profile in hippocampus during the acquisition and extinction of cocaine-induced conditioned place preference in rats», *J. Biomed. Sci.*, 20(1), p. 96.

Chen, H. *et al.* (1995) «Cloning of the cDNA for the human ATP synthase OSCP subunit (ATP50) by exon trapping and mapping to chromosome 21q22.1-q22.2», *Genomics*, 28(3), p. 470-476.

Chen, L. *et al.* (1999) «Dopamine transporter mRNA in autopsy studies of chronic cocaine users.», *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 73(1-2), p. 181-5.

Chen, L. i Xu, M. (2010) «Dopamine D1 and D3 receptors are differentially involved in cue-elicited cocaine seeking», *J. Neurochem.*, 114(2), p. 530-541.

Chen, R. *et al.* (2006) «Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(24), p. 9333-9338.

Bibliografia

- Chen, X. *et al.* (2016) «Effects of a cocaine hydrolase engineered from human butyrylcholinesterase on metabolic profile of cocaine in rats», *Chem. Biol. Interact.*, 259(Pt B), p. 104-109.
- Chen, Y. A. i Scheller, R. H. (2001) «Snare-mediated membrane fusion», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, p. 98-106.
- Di Chiara, G. (2002) «Nucleus accumbens shell and core dopamine: Differential role in behavior and addiction», *Behav. Brain Res.*, 137(1-2), p. 75-114.
- Di Chiara, G. *et al.* (2004) «Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection», *Neuropharmacology*, 47, p. 227-241.
- Choi, S.-Y. *et al.* (2005) «Multiple receptors coupled to phospholipase C gate long-term depression in visual cortex.», *J. Neurosci.*, 25(49), p. 11433-11443.
- Clarke, T.-K. *et al.* (2012) «Genetic association analyses of PDYN polymorphisms with heroin and cocaine addiction», *Genes, Brain Behav.*, 11(4), p. 415-423.
- Clarke, T.-K. *et al.* (2013) «Further evidence for association of polymorphisms in the CNR1 gene with cocaine addiction: confirmation in an independent sample and meta-analysis.», *Addict. Biol.*, 18(4), p. 702-8.
- Clarke, T.-K. *et al.* (2017) «Genome-wide association study of alcohol consumption and genetic overlap with other health-related traits in UK Biobank (N=112 117)», *Mol. Psychiatry*, 22(10), p. 1376-1384.
- Cohen-Barak, O. *et al.* (2015) «Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of TV-1380, a novel mutated butyrylcholinesterase treatment for cocaine addiction, after single and multiple intramuscular injections in healthy subjects», *J. Clin. Pharmacol.*, 55(5), p. 573-583.
- Collins, G. T. *et al.* (2009) «Cocaine esterase prevents cocaine-induced toxicity and the ongoing intravenous self-administration of cocaine in rats.», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 331(2), p. 445-455.
- Comings, D. E. *et al.* (1994) «The dopamine D2 receptor gene: a genetic risk factor in substance abuse.», *Drug Alcohol Depend.*, 34(3), p. 175-80.
- Comings, D. E. i Blum, K. (2000) «Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders.», *Prog. Brain Res.*, 126, p. 325-341.
- Compton, W. M. *et al.* (2007) «Prevalence, correlates, disability, and comorbidity of DSM-IV drug abuse and dependence in the United States: Results from the national epidemiologic survey on alcohol and related conditions», *Arch. Gen. Psychiatry*, 64(5), p. 566-576.
- Cooper, S., Robison, A. J. i Mazei-Robison, M. S. (2017) «Reward Circuitry in Addiction», *Neurotherapeutics*, 14(3), p. 687-697.
- Cooper, Z. D. *et al.* (2006) «Rapid and robust protection against cocaine-induced lethality in rats by the bacterial cocaine esterase.», *Mol. Pharmacol.*, 70(6), p. 1885-91.
- Costa-Silva, J., Domingues, D. i Lopes, F. M. (2017) «RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool.», *PLoS One*, 12(12), p. e0190152.
- Covault, J., Gelernter, J. i Kranzler, H. (2001) «Association study of cannabinoid receptor gene (CNR1) alleles and drug dependence [2]», *Mol. Psychiatry*, p. 501-502.
- Crawford, F. C. *et al.* (2006) «Cocaine induced inflammatory response in human neuronal progenitor cells», *J. Neurochem.*, 97(3), p. 662-674.
- Dahl, J. P. *et al.* (2006) «Analysis of variations in the tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) gene in cocaine dependence», *Addict. Biol.*, 11(1), p. 76-83.
- Davidson, C. *et al.* (2004) «Ondansetron, given during the acute cocaine withdrawal, attenuates oral cocaine self-administration.», *Eur. J. Pharmacol.*, 503(1-3), p. 99-102.
- Davidson, C. (2016) «Developing Treatments for Stimulant Abuse: A Brief Overview.», *East Asian Arch. psychiatry Off. J. Hong Kong Coll. Psychiatr. = Dong Ya jing shen ke xue zhi Xianggang jing shen ke yi xue yuan qi kan*, 26(2), p. 52-59.
- Dean, O., Giorlando, F. i Berk, M. (2011) «N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action.», *J. Psychiatry Neurosci.*, 36(2), p. 78-86.
- Degenhardt, L. *et al.* (2011) «What data are available on the extent of illicit drug use and dependence globally? Results of four systematic reviews», *Drug Alcohol Depend.*, 117(2-3), p. 85-101.
- Delis, F. *et al.* (2017) «Attenuation of cocaine-induced conditioned place preference and motor activity via

- cannabinoid CB2 receptor agonism and cb1 receptor antagonism in rats», *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 20(3), p. 269-278.
- Demontis, D. *et al.* (2017) «Discovery Of The First Genome-Wide Significant Risk Loci For ADHD», *bioRxiv*, p. 145581.
- DerSimonian, R. i Laird, N. (1986) «Meta-analysis in clinical trials.», *Control. Clin. Trials*, 7(3), p. 177-88.
- Dey, S. *et al.* (2007) «Cocaine Exposure In Vitro Induces Apoptosis in Fetal Locus Coeruleus Neurons by Altering the Bax/Bcl-2 Ratio and through Caspase-3 Apoptotic Signaling», *Neuroscience*, 144(2), p. 509-521.
- Diederichs, S. i Haber, D. A. (2007) «Dual Role for Argonautes in MicroRNA Processing and Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Expression», *Cell*, 131(6), p. 1097-1108.
- Dobin, A. *et al.* (2013) «STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner», *Bioinformatics*, 29(1), p. 15-21.
- Docherty, A. R., Moscati, A. A. i Fanous, A. H. (2016) «Cross-Disorder Psychiatric Genomics.», *Curr. Behav. Neurosci. reports*, 3(3), p. 256-263.
- Domcke, S. *et al.* (2015) «Competition between DNA methylation and transcription factors determines binding of NRF1», *Nature*, 528(7583), p. 575-579.
- Doura, M. B. i Unterwald, E. M. (2016) «MicroRNAs Modulate Interactions between Stress and Risk for Cocaine Addiction», *Front. Cell. Neurosci.*, 10, p. 125.
- Drouin, C. *et al.* (2002) «Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates», *J. Neurosci.*, 22(7), p. 2873-2884.
- Duailibi, M. S. *et al.* (2017) «N-acetylcysteine in the treatment of craving in substance use disorders: Systematic review and meta-analysis», *Am. J. Addict.*, 26(7), p. 660-666.
- Ducci, F. i Goldman, D. (2012) «The Genetic Basis of Addictive Disorders», *Psychiatr. Clin. North Am.*, p. 495-519.
- Dworkin, S. I., Co, C. i Smith, J. E. (1995) «Rat brain neurotransmitter turnover rates altered during withdrawal from chronic cocaine administration», *Brain Res.*, 682(1-2), p. 116-126.
- Eipper-Mains, J. E. *et al.* (2011) «microRNA-Seq reveals cocaine-regulated expression of striatal microRNAs.», *RNA*, 17, p. 1529-1543.
- Eipper-Mains, J. E., Eipper, B. A. i Mains, R. E. (2012) «Global approaches to the role of miRNAs in drug-induced changes in gene expression», *Front. Genet.*, p. 109.
- Elliot, E. E., Sibley, D. R. i Katz, J. L. (2003) «Locomotor and discriminative-stimulus effects of cocaine in dopamine D5 receptor knockout mice.», *Psychopharmacology (Berl.)*, 169(2), p. 161-168.
- EMCDDA (2014) *National report to the EMCDDA by the Reitox National Focal Point 2014, Heal. (San Fr.*
- EMCDDA (2017) *Informe Europeo sobre Drogas 2017: Tendencias y novedades.*
- Enoch, M. A. *et al.* (2012) «GABAergic gene expression in postmortem hippocampus from alcoholics and cocaine addicts; corresponding findings in alcohol-naïve P and NP rats», *PLoS One*, 7(1), p. 1-11.
- Evangelou, E. i Ioannidis, J. P. A. (2013) «Meta-analysis methods for genome-wide association studies and beyond», *Nat. Rev. Genet.*, 14(6), p. 379-389.
- Everitt, B. J. i Robbins, T. W. (2005) «Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion», *Nat. Neurosci.*, 8(11), p. 1481-1489.
- Farris, S. P., Harris, R. A. i Ponomarev, I. (2015) «Epigenetic modulation of brain gene networks for cocaine and alcohol abuse», *Front. Neurosci.*, 9, p. 176.
- Feng, J. *et al.* (2015) «Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action», *Nat. Neurosci.*, 18(4), p. 536-544.
- Ferguson, S. M. *et al.* (2006) «Knockout of ERK1 Enhances Cocaine-Evoked Immediate Early Gene Expression and Behavioral Plasticity», *Neuropsychopharmacology*, 31(12), p. 2660-2668.
- Fernández-Castillo, N. *et al.* (2010) «Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample.», *Psychiatr. Genet.*, 20(6), p. 317-20.
- Fernández-Castillo, N. *et al.* (2012) «Candidate pathway association study in cocaine dependence: The control of neurotransmitter release», *World J. Biol. Psychiatry*, 13(2), p. 126-134.
- Fernández-Castillo, N. *et al.* (2013) «Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine

Bibliografia

- neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence», *Genes, Brain Behav.*, 12(1), p. 39-46.
- Fernández-Castillo, N. *et al.* (2015) «Transcriptomic and genetic studies identify NFAT5 as a candidate gene for cocaine dependence.», *Transl. Psychiatry*, 5(August), p. e667.
- Fernández-Espejo, E. (2006) «The neurobiology of psychostimulant addiction.», *Rev. Neurol.*, 43(3), p. 147-154.
- Ferrante, M. i Conti, G. O. (2017) «Environment and Neurodegenerative Diseases: An Update on miRNA Role», *MicroRNA*, 6(3), p. 157-165.
- Filip, M. *et al.* (2005) «The serotonergic system and its role in cocaine addiction», *Pharmacol. Reports*, p. 685-700.
- Filip, M. *et al.* (2010) «Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5-HT) receptors in cocaine addiction», *Addict. Biol.*, 15(3), p. 227-249.
- Fonteneau, M. *et al.* (2017) «Inhibition of DNA methyltransferases regulates cocaine self-administration by rats: a genome-wide DNA methylation study», *Genes, Brain Behav.*, 16(3), p. 313-327.
- Forman, J. J. i Coller, H. A. (2010) «The code within the code: MicroRNAs target coding regions», *Cell Cycle*, p. 1533-1541.
- Foroud, T. *et al.* (2008) «The tachykinin receptor 3 is associated with alcohol and cocaine dependence», *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 32(6), p. 1023-1030.
- Franzcp, P. F. S. i Ole, A. (2017) «Psychiatric Genomics : An Update and an Agenda American Journal of Psychiatry (Review)», *bioRxiv*, p. 115600.
- Freedman, M. L. *et al.* (2004) «Assessing the impact of population stratification on genetic association studies», *Nat. Genet.*, 36(4), p. 388-393.
- Freimer, M. *et al.* (1996) «No association between D3 dopamine receptor (DRD3) alleles and cocaine dependence», *Addict. Biol.*, 1(3), p. 281-287.
- Friedman, R. C. *et al.* (2009) «Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs», *Genome Res.*, 19(1), p. 92-105.
- Gamazon, E. R. i Stranger, B. E. (2015) «The impact of human copy number variation on gene expression», *Brief. Funct. Genomics*, 14(5), p. 352-357.
- Gao, J. *et al.* (2010) «A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134», *Nature*, 466(7310), p. 1105-1109.
- García, M. P. *et al.* (2017) «Animal Models of Drug Addiction», *Adicciones*, 29(4), p. 278-292.
- Gardner, E. . (1997) «Brain reward mechanisms», en *Subst. Abus. a Compr. Textb.*, p. 48-61.
- Gawin, F. H. (1991) «Cocaine addiction: psychology and neurophysiology.», *Science (80-.)*, 251(5001), p. 1580-1586.
- Gawin, F. H. i Kleber, H. D. (1985) «Cocaine use in a treatment: population: patterns and diagnostic distinctions», *NIDA Res. Monogr.*, 61, p. 182-192.
- Gelernter, J. *et al.* (2014) «Genome-wide association study of cocaine dependence and related traits: FAM53B identified as a risk gene», *Mol. Psychiatry*, 19(6), p. 717-723.
- Ghasemzadeh, M. B., Mueller, C. i Vasudevan, P. (2009) «Behavioral sensitization to cocaine is associated with increased glutamate receptor trafficking to the postsynaptic density after extended withdrawal period», *Neuroscience*, 159(1), p. 414-426.
- Gibbs, J. R. *et al.* (2010) «Abundant quantitative trait loci exist for DNA methylation and gene expression in Human Brain», *PLoS Genet.*, 6(5), p. 29.
- Giese, K. P. i Mizuno, K. (2013) «The roles of protein kinases in learning and memory.», *Learn. Mem.*, 20(10), p. 540-52.
- Giros, B. *et al.* (1996) «Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter», *Nature*, 379(6566), p. 606-612.
- Goldman, D., Oroszi, G. i Ducci, F. (2005) «The genetics of addictions: uncovering the genes.», *Nat. Rev. Genet.*, 6(7), p. 521-32.
- Goldstein, R. Z. i Volkow, N. D. (2011) «Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: Neuroimaging findings and clinical implications», *Nat. Rev. Neurosci.*, p. 652-669.

- Goodman, J. i Packard, M. G. (2016) «Memory systems and the addicted brain», *Front. Psychiatry*, 7, p. 1-9.
- Gorelick, D. A. (1997) «Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy», *Drug Alcohol Depend.*, p. 159-165.
- Graziane, N. M. *et al.* (2016) «Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses», *Nat. Neurosci.*, 19(7), p. 915-925.
- Greene, C. S. *et al.* (2009) «Failure to replicate a genetic association may provide important clues about genetic architecture.», *PLoS One*, 4(6), p. e5639.
- Grove, J. *et al.* (2017) «Common risk variants identified in autism spectrum disorder», *bioRxiv*.
- Grucza, R. A. *et al.* (2008) «A Risk Allele for Nicotine Dependence in CHRNA5 Is a Protective Allele for Cocaine Dependence», *Biol. Psychiatry*, 64(11), p. 922-929.
- Guan, X. *et al.* (2009) «Cocaine withdrawal enhances long-term potentiation in rat hippocampus via changing the activity of corticotropin-releasing factor receptor subtype 2», *Neuroscience*, 161(3), p. 665-670.
- Gulyaeva, L. F. i Kushlinskiy, N. E. (2016) «Regulatory mechanisms of microRNA expression.», *J. Transl. Med.*, 14(1), p. 143.
- Guo, Y. *et al.* (2013) «Large Scale Comparison of Gene Expression Levels by Microarrays and RNAseq Using TCGA Data», *PLoS One*, 8(8), p. e71462.
- Gurkovskaya, O. i Goeders, N. E. (2001) «Effects of CP-154,526 on responding during extinction from cocaine self-administration in rats.», *Eur. J. Pharmacol.*, 432(1), p. 53-6.
- Hägele, C. *et al.* (2015) «Dimensional psychiatry: reward dysfunction and depressive mood across psychiatric disorders», *Psychopharmacology (Berl.)*, 232(2), p. 331-341.
- Hall, F. S. *et al.* (2002) «Cocaine mechanisms: Enhanced cocaine, fluoxetine and nisoxetine place preferences following monoamine transporter deletions», *Neuroscience*, 115(1), p. 153-161.
- Hall, F. S. *et al.* (2006) «Molecular Mechanisms Underlying the Rewarding Effects of Cocaine», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1025(1), p. 47-56.
- Hall, F. S. *et al.* (2013) «Implications of genome wide association studies for addiction: Are our a priori assumptions all wrong?», *Pharmacol. Ther.*, 140(3), p. 267-279.
- Hammond, S. M. *et al.* (2001) «Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi», *Science (80-.)*, 293(5532), p. 1146-1150.
- Han, B. i Eskin, E. (2011) «Random-effects model aimed at discovering associations in meta-analysis of genome-wide association studies.», *Am. J. Hum. Genet.*, 88(5), p. 586-98.
- Han, D. D. i Gu, H. H. (2006) «Comparison of the monoamine transporters from human and mouse in their sensitivities to psychostimulant drugs», *BMC Pharmacol.*, 6, p. 1-7.
- Han, J. *et al.* (2010) «Effect of 5-aza-2-deoxycytidine microinjecting into hippocampus and prelimbic cortex on acquisition and retrieval of cocaine-induced place preference in C57BL/6 mice», *Eur. J. Pharmacol.*, 642(1-3), p. 93-98.
- Han, Y. i Lu, L. (2016) «The Other Face of the Nucleus Accumbens: Aversion.», *Neurosci. Bull.*, 32(6), p. 569-571.
- Haney, M. i Spealman, R. (2008) «Controversies in translational research: Drug self-administration», *Psychopharmacology (Berl.)*, p. 403-419.
- Hartz, S. M. *et al.* (2017) «Association Between Substance Use Disorder and Polygenic Liability to Schizophrenia.», *Biol. Psychiatry*, 82(10), p. 709-715.
- Heidbreder, C. (2008) «Selective antagonism at dopamine D3 receptors as a target for drug addiction pharmacotherapy: a review of preclinical evidence.», *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 7(5), p. 410-421.
- Henry, L. K. *et al.* (2006) «Tyr-95 and Ile-172 in transmembrane segments 1 and 3 of human serotonin transporters interact to establish high affinity recognition of antidepressants», *J. Biol. Chem.*, 281(4), p. 2012-2023.
- Herman, A. I. *et al.* (2006) «Association study of the CNR1 gene exon 3 alternative promoter region polymorphisms and substance dependence», *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.*, 141(5), p. 499-503.
- Heyward, F. D. i Sweatt, J. D. (2015) «DNA Methylation in Memory Formation: Emerging Insights», *Neuroscientist*,

Bibliografia

p. 475-489.

Hodge, C. W., Bratt, A. M. i Kelley, S. P. (2008) «Deletion of the 5-HT3A-receptor subunit blunts the induction of cocaine sensitization», *Genes, Brain Behav.*, 7(1), p. 96-102.

Hoehe, M. R. *et al.* (2000) «Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence», *Hum. Mol. Genet.*, 9(19), p. 2895-2908.

Hollander, J. A. *et al.* (2010) «Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling», *Nature*, 466(7303), p. 197-202.

Homberg, J. R. *et al.* (2008) «Adaptations in pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats», *Psychopharmacology (Berl.)*, 200(3), p. 367-380.

Hope, B. T. (1998) «Cocaine and the AP-1 Transcription Factor Complex», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 844, p. 1-6.

Howell, L. L. *et al.* (2014) «A thermostable bacterial cocaine esterase rapidly eliminates cocaine from brain in nonhuman primates», *Transl. Psychiatry*, 4(7), p. e407.

Howell, L. L. i Cunningham, K. A. (2015) «Serotonin 5-HT2 receptor interactions with dopamine function: implications for therapeutics in cocaine use disorder.», *Pharmacol. Rev.*, 67(1), p. 176-197.

Hu, S. S. J., Liu, Y. W. i Yu, L. (2015) «Medial prefrontal cannabinoid CB1 receptors modulate consolidation and extinction of cocaine-associated memory in mice», *Psychopharmacology (Berl.)*, 232(10), p. 1803-1815.

Huang, C.-C., Lin, H.-J. i Hsu, K.-S. (2007) «Repeated Cocaine Administration Promotes Long-Term Potentiation Induction in Rat Medial Prefrontal Cortex», *Cereb. Cortex*, 17(8), p. 1877-1888.

Huang, Y. *et al.* (2011) «Biological functions of microRNAs: A review», *J. Physiol. Biochem.*, p. 129-139.

Huntley, G. W., Gil, O. i Bozdagi, O. (2002) «The Cadherin Family of Cell Adhesion Molecules: Multiple Roles in Synaptic Plasticity», *Neurosci.*, 8(3), p. 221-233.

Hussain, S. i Davanger, S. (2011) «The discovery of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor complex and the molecular regulation of synaptic vesicle transmitter release: The 2010 Kavli Prize in neuroscience», *Neuroscience*, p. 12-20.

Hyatt, C. J. *et al.* (2012) «Reward-related dorsal striatal activity differences between former and current cocaine dependent individuals during an interactive competitive game», *PLoS One*, 7(5), p. e34917.

Ikeda, M. *et al.* (2013) «Evidence for Shared Genetic Risk Between Methamphetamine-Induced Psychosis and Schizophrenia», *Neuropsychopharmacology*, 38(10), p. 1864-1870.

Im, H.-I. *et al.* (2010) «MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212», *Nat. Neurosci.*, 13(9), p. 1120-1127.

Ioannidis, J. P. A., Patsopoulos, N. A. i Evangelou, E. (2007) «Heterogeneity in Meta-Analyses of Genome-Wide Association Investigations», *PLoS One*, 2(9), p. e841.

Van Iperen, E. P. A. *et al.* (2017) «Extending the use of GWAS data by combining data from different genetic platforms», *PLoS One*, 12(2), p. e0172082.

Jacobs, E. H. *et al.* (2003) «Neuroadaptive effects of active versus passive drug administration in addiction research», *Trends Pharmacol. Sci.*, p. 566-573.

James, M. H. *et al.* (2014) «MTORC1 inhibition in the nucleus accumbens “protects” against the expression of drug seeking and “relapse” and is associated with reductions in GluA1 AMPAR and CAMKII levels», *Neuropsychopharmacology*, 39(7), p. 1694-1702.

James, M. H. *et al.* (2016) «Rapamycin reduces motivated responding for cocaine and alters GluA1 expression in the ventral but not dorsal striatum», *Eur. J. Pharmacol.*, 784, p. 147-154.

Jensen, K. P. (2016) «A Review of Genome-Wide Association Studies of Stimulant and Opioid Use Disorders.», *Mol. neuropsychiatry*, 2(1), p. 37-45.

Jenuwein, T. i Allis, C. D. (2001) «Translating the Histone Code», *Science (80-)*, 293(5532), p. 1074-1080.

Jia, X. *et al.* (2016) «miR-137 and miR-491 Negatively Regulate Dopamine Transporter Expression and Function in Neural Cells», *Neurosci. Bull.*, 32(6), p. 512-522.

Johanson, C. E. i Fischman, M. W. (1989) «The pharmacology of cocaine related to its abuse.», *Pharmacol. Rev.*, 41(1), p. 3-52.

Johnson, B. A. *et al.* (2006) «A preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and

- efficacy of ondansetron in the treatment of cocaine dependence», *Drug Alcohol Depend.*, 84(3), p. 256-263.
- Johnson, E. O. *et al.* (2016) «KAT2B polymorphism identified for drug abuse in African Americans with regulatory links to drug abuse pathways in human prefrontal cortex», *Addict. Biol.*, 21(6), p. 1217-1232.
- Johnson, R. C. *et al.* (2010) «Accounting for multiple comparisons in a genome-wide association study (GWAS)», *BMC Genomics*, 11(1), p. 724.
- Jones, J. D. *et al.* (2010) «Dopamine, norepinephrine and serotonin transporter gene deletions differentially alter cocaine-induced taste aversion.», *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 94(4), p. 580-7.
- Jones, S. R. *et al.* (1999) «Loss of autoreceptor functions in mice lacking the dopamine transporter», *Nat. Neurosci.*, 2(7), p. 649-655.
- Jonkman, S. i Kenny, P. J. (2013) «Molecular, cellular, and structural mechanisms of cocaine addiction: a key role for microRNAs.», *Neuropsychopharmacology*, 38(1), p. 198-211.
- Kalivas, P. W. i Volkow, N. D. (2005) «The Neural Basis of Addiction: A Pathology of Motivation and Choice», *Am. J. Psychiatry*, 162(8), p. 1403-1413.
- Kampman, K. M. *et al.* (1999) «Open trials as a method of prioritizing medications for inclusion in controlled trials for cocaine dependence», *Addict. Behav.*, 24(2), p. 287-291.
- Kampman, K. M. *et al.* (2001) «Effectiveness of propranolol for cocaine dependence treatment may depend on cocaine withdrawal symptom severity», *Drug Alcohol Depend.*, 63(1), p. 69-78.
- Kampman, K. M. *et al.* (2006) «A double-blind, placebo-controlled trial of amantadine, propranolol, and their combination for the treatment of cocaine dependence in patients with severe cocaine withdrawal symptoms», *Drug Alcohol Depend.*, 85(2), p. 129-137.
- Karasinska, J. M. *et al.* (2005) «Deletion of dopamine D1 and D3 receptors differentially affects spontaneous behaviour and cocaine-induced locomotor activity, reward and CREB phosphorylation», *Eur. J. Neurosci.*, 22(7), p. 1741-1750.
- Karlsson, R. M. *et al.* (2008) «Comparison of dopamine D1 and D5 receptor knockout mice for cocaine locomotor sensitization», *Psychopharmacology (Berl.)*, 200(1), p. 117-127.
- Katz, J. L. *et al.* (2003) «Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D4receptor mutant mice», *Psychopharmacology (Berl.)*, 170(1), p. 108-114.
- Kelai, S. *et al.* (2017) «Netrin g1: Its downregulation in the nucleus accumbens of cocaine-conditioned mice and genetic association in human cocaine dependence.», *Addict. Biol.*, p. 1-13.
- Kendler, K. S. *et al.* (2000) «Illicit Psychoactive Substance Use, Heavy Use, Abuse, and Dependence in a US Population-Based Sample of Male Twins», *Arch. Gen. Psychiatry*, 57, p. 261-269.
- Kendler, K. S. i Prescott, C. A. (1998) «Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins.», *Br. J. Psychiatry*, 173, p. 345-350.
- Kenny, P. J. (2014) «Epigenetics, microRNA, and addiction», *Dialogues Clin. Neurosci.*, 16(3), p. 335-344.
- Khazaei, M. R. *et al.* (2010) «Bex1 is involved in the regeneration of axons after injury», *J. Neurochem.*, 115(4), p. 910-920.
- Kim, D. *et al.* (1997) «Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors.», *Nature*, 389(6648), p. 290-293.
- Kim, J. H. *et al.* (2016) «De Novo Mutations in SON Disrupt RNA Splicing of Genes Essential for Brain Development and Metabolism, Causing an Intellectual-Disability Syndrome», *Am. J. Hum. Genet.*, 99(3), p. 711-719.
- Kim, V. N., Han, J. i Siomi, M. C. (2009) «Biogenesis of small RNAs in animals.», *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10(2), p. 126-39.
- Kimishima, A. *et al.* (2016) «Cocaine Vaccine Development: Evaluation of Carrier and Adjuvant Combinations That Activate Multiple Toll-Like Receptors», *Mol. Pharm.*, 13(11), p. 3884-3890.
- Klose, R. J. i Bird, A. P. (2006) «Genomic DNA methylation: The mark and its mediators», *Trends Biochem. Sci.*, p. 89-97.
- Kolshus, E. *et al.* (2013) «When less is more--microRNAs and psychiatric disorders.», *Acta Psychiatr. Scand.*, 129(4), p. 241-56.
- Kong, H. *et al.* (2011) «Activation of dopamine D3 receptors inhibits reward-related learning induced by cocaine»,

Bibliografia

Neuroscience, 176, p. 152-161.

Konova, A. B. *et al.* (2012) «Structural and behavioral correlates of abnormal encoding of money value in the sensorimotor striatum in cocaine addiction», *Eur. J. Neurosci.*, 36(7), p. 2979-2988.

Koob, G. F. (1992) «Neural Mechanisms of Drug Reinforcement», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 654(1), p. 171-191.

Koob, G. F. (2009) «Brain stress systems in the amygdala and addiction.», *Brain Res.*, 1293, p. 61-75.

Koob, G. F. (2013) «Negative reinforcement in drug addiction: The darkness within», *Curr. Opin. Neurobiol.*, p. 559-563.

Koob, G. F. i Le Moal, M. (2001) «Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis», *Neuropsychopharmacology*, 24(2), p. 97-129.

Koob, G. F. i Le Moal, M. (2008) «Addiction and the Brain Antireward System», *Annu. Rev. Psychol.*, 59(1), p. 29-53.

Koob, G. F. i Volkow, N. D. (2010) «Neurocircuitry of addiction», *Neuropsychopharmacology*, p. 217-238.

Koob, G. F. i Volkow, N. D. (2016) «Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis», *The Lancet Psychiatry*, 3(8), p. 760-773.

Kosten, T. R. *et al.* (2014) «Vaccine for cocaine dependence: A randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial», *Drug Alcohol Depend.*, 140, p. 42-47.

Kovalevich, J. *et al.* (2012) «Cocaine-induced loss of white matter proteins in the adult mouse nucleus accumbens is attenuated by administration of a β -lactam antibiotic during cocaine withdrawal», *Am. J. Pathol.*, 181(6), p. 1921-1927.

Kraft, P., Zeggini, E. i Ioannidis, J. P. A. (2009) «Replication in genome-wide association studies.», *Stat. Sci.*, 24(4), p. 561-573.

Krämer, A. *et al.* (2014) «Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis», *Bioinformatics*, 30(4), p. 523-530.

Kranzler, H. R. *et al.* (1998) «Association of alcohol or other drug dependence with alleles of the mu opioid receptor gene (OPRM1).», *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 22(6), p. 1359-1362.

Kristiansen, L. V., Bannon, M. J. i Meador-Woodruff, J. H. (2009) «Expression of transcripts for myelin related genes in postmortem brain from cocaine abusers», *Neurochem. Res.*, 34(1), p. 46-54.

Kumar, A. *et al.* (2005) «Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum», *Neuron*, 48(2), p. 303-314.

Kundu, T. K. i Rao, M. R. (1999) «CpG islands in chromatin organization and gene expression.», *J. Biochem.*, 125(2), p. 217-22.

Kuryatov, A., Berrettini, W. i Lindstrom, J. (2011) «Acetylcholine Receptor (AChR) 5 Subunit Variant Associated with Risk for Nicotine Dependence and Lung Cancer Reduces (4 2)2 5 AChR Function», *Mol. Pharmacol.*, 79(1), p. 119-125.

Kutlu, M. G. i Gould, T. J. (2016) «Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development and maintenance of addiction», *Learn. Mem.*, 23(10), p. 515-533.

Lachman, H. M. (1997) «High-activity catechol-O-methyltransferase allele is more prevalent in polysubstance abusers», *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.*, 74(4), p. 439-442.

Laplant, Q. *et al.* (2010) «Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens», *Nat. Neurosci.*, 13(9), p. 1137-1143.

Lee, C. *et al.* (2002) «Ondansetron Given in the Acute Withdrawal from a Repeated Cocaine Sensitization Dosing Regimen Reverses the Expression of Sensitization and Inhibits Self-administration», *Neuropsychopharmacology*, 27(4), p. 542-553.

Lee, C.-T. *et al.* (2009) «Gene expression profiling reveals distinct cocaine-responsive genes in human fetal CNS cell types.», *J. Addict. Med.*, 3(4), p. 218-26.

Lee, C. H. *et al.* (2016) «Comparison of Two Meta-Analysis Methods: Inverse-Variance-Weighted Average and Weighted Sum of Z-Scores.», *Genomics Inform.*, 14(4), p. 173-180.

Lee, C. H., Eskin, E. i Han, B. (2017) «Increasing the power of meta-analysis of genome-wide association studies

- to detect heterogeneous effects», *Bioinformatics*, 33(14), p. i379-i388.
- Lee, I. *et al.* (2009) «New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites», *Genome Res.*, 19(7), p. 1175-1183.
- Lee, J. L. C. *et al.* (2005) «Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior.», *Neuron*, 47(6), p. 795-801.
- Lee, J. L. C., Milton, A. L. i Everitt, B. J. (2006) «Cue-Induced Cocaine Seeking and Relapse Are Reduced by Disruption of Drug Memory Reconsolidation», *J. Neurosci.*, 26(22), p. 5881-5887.
- Lehrmann, E. *et al.* (2003) «Transcriptional profiling in the human prefrontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse.», *Pharmacogenomics J.*, 3(1), p. 27-40.
- Lehrmann, E. *et al.* (2006) «Transcriptional changes common to human cocaine cannabis and phencyclidine abuse», *PLoS One*, 1(1), p. e114.
- Lepeta, K. *et al.* (2016) «Synaptopathies: synaptic dysfunction in neurological disorders – A review from students to students», *J. Neurochem.*, p. 785-805.
- Lepsch, L. B. *et al.* (2009) «Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-b in pc12 cells», *Mol. Brain*, 2(1), p. 3.
- Lever, C., Burton, S. i O'Keefe, J. (2006) «Rearing on Hind Legs, Environmental Novelty, and the Hippocampal Formation», *Rev. Neurosci.*, 17(1-2).
- Levine, A. A. *et al.* (2005) «CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(52), p. 19186-19191.
- Li, C. Y., Mao, X. i Wei, L. (2008) «Genes and (common) pathways underlying drug addiction», *PLoS Comput. Biol.*, 4(1), p. 0028-0034.
- Li, D. *et al.* (2015) «Genome-Wide Association Study of Copy Number Variations (CNVs) with Opioid Dependence», *Neuropsychopharmacology*, 40(4), p. 1016-1026.
- Li, M. J. *et al.* (2012) «GWASdb: a database for human genetic variants identified by genome-wide association studies.», *Nucleic Acids Res.*, 40(Database issue), p. D1047-54.
- Li, M. J. *et al.* (2016) «GWASdb v2: an update database for human genetic variants identified by genome-wide association studies.», *Nucleic Acids Res.*, 44(D1), p. D869-76.
- Lim, K. O. *et al.* (2002) «Reduced frontal white matter integrity in cocaine dependence: A controlled diffusion tensor imaging study», *Biol. Psychiatry*, 51(11), p. 890-895.
- Lim, L. P. *et al.* (2003) «Vertebrate microRNA genes», *Science (80-.)*, p. 1540.
- Lim, L. P. *et al.* (2005) «Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs», *Nature*, 433(7027), p. 769-773.
- Lin, P. *et al.* (2012) «Copy number variations in 6q14.1 and 5q13.2 are associated with alcohol dependence.», *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 36(9), p. 1512-8.
- Little, K. Y. *et al.* (1998) «Brain dopamine transporter messenger RNA and binding sites in cocaine users: a postmortem study», *Arch. Gen. Psychiatry*, 55(9), p. 793-799.
- Liu, J. *et al.* (2004) «Argonaute2 is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi», *Science (80-.)*, 305(5689), p. 1437-1441.
- Liu, J. *et al.* (2013) «Effect of homozygous deletions at 22q13.1 on alcohol dependence severity and cue-elicited BOLD response in the precuneus», *Addict. Biol.*, 18(3), p. 548-558.
- Lohoff, F. W., Weller, A. E., *et al.* (2008) «Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence», *Neuropsychopharmacology*, 33(13), p. 3078-3084.
- Lohoff, F. W., Bloch, P. J., *et al.* (2008) «Genetic variants in the cocaine- and amphetamine-regulated transcript gene (CARTPT) and cocaine dependence», *Neurosci. Lett.*, 440(3), p. 280-283.
- Lohoff, F. W. *et al.* (2010) «Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1) genes with cocaine dependence», *Neurosci. Lett.*, 473(2), p. 87-91.
- London, E. D. *et al.* (1990) «Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose.», *Arch. Gen. Psychiatry*, 47(6), p. 567-74.
- López-Moreno, J. A., Echeverry-Alzate, V. i Bühler, K. M. (2012) «The genetic basis of the endocannabinoid system

Bibliografia

- and drug addiction in humans», *J. Psychopharmacol.*, p. 133-143.
- Love, M. I., Huber, W. i Anders, S. (2014) «Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2», *Genome Biol.*, 15(12), p. 550.
- Lu, L. *et al.* (2006) «Role of ERK in cocaine addiction.», *Trends Neurosci.*, 29(12), p. 695-703.
- Lull, M. E. *et al.* (2008) «Correlating Human and Animal Studies of Cocaine Abuse and Gene Expression», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1141(1), p. 58-75.
- Luo, X. *et al.* (2003) «Haplotypes at the OPRM1 locus are associated with susceptibility to substance dependence in European-Americans.», *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 120B(1), p. 97-108.
- Luo, X. *et al.* (2005) «CHRM2 gene predisposes to alcohol dependence, drug dependence and affective disorders: Results from an extended case-control structured association study», *Hum. Mol. Genet.*, 14(16), p. 2421-2434.
- Luo, X. *et al.* (2006) «ADH4 Gene Variation is Associated with Alcohol Dependence and Drug Dependence in European Americans : Results from HWD Tests and Case – Control Association Studies», *Pharmacogenet. Genomics*, 15(11), p. 1085-1095.
- Lytle, J. R., Yario, T. A. i Steitz, J. A. (2007) «Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(23), p. 9667-9672.
- MacArthur, J. *et al.* (2017) «The new NHGRI-EBI Catalog of published genome-wide association studies (GWAS Catalog).», *Nucleic Acids Res.*, 45(D1), p. D896-D901.
- MacNicol, B. (2017) «The biology of addiction.», *Can. J. Anesth. Can. d'anesthésie*, 64, p. 141-148.
- Malvaez, M. *et al.* (2011) «CBP in the Nucleus Accumbens Regulates Cocaine-Induced Histone Acetylation and Is Critical for Cocaine-Associated Behaviors», *J. Neurosci.*, 31(47), p. 16941-16948.
- Manning, E. E. *et al.* (2012) «Increased adult hippocampal neurogenesis and abnormal migration of adult-born granule neurons is associated with hippocampal-specific cognitive deficits in phospholipase C-β1 knockout mice», *Hippocampus*, 22(2), p. 309-319.
- Manolio, T. A. *et al.* (2009) «Finding the missing heritability of complex diseases.», *Nature*, 461(7265), p. 747-753.
- Marie-Claire, C. *et al.* (2007) «Rnd family genes are differentially regulated by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine acute treatment in mice brain», *Brain Res.*, 1134(1), p. 12-17.
- Marinho, E. A. V. *et al.* (2015) «Effects of rimonabant on the development of single dose-induced behavioral sensitization to ethanol, morphine and cocaine in mice», *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, 58, p. 22-31.
- Marinho, E. A. V. *et al.* (2017) «Post-sensitization treatment with rimonabant blocks the expression of cocaine-induced behavioral sensitization and c-Fos protein in mice», *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 156, p. 16-23.
- Mash, D. C. *et al.* (2007) «Gene expression in human hippocampus from cocaine abusers identifies genes which regulate extracellular matrix remodeling.», *PLoS One*, 2(11), p. e1187.
- Maze, I. *et al.* (2010) «Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity», *Science (80-.)*, 327(5962), p. 213-216.
- Mbarek, H. *et al.* (2015) «The genetics of alcohol dependence: Twin and SNP-based heritability, and genome-wide association study based on AUDIT scores», *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.*, 168(8), p. 739-748.
- McCarthy, M. I. *et al.* (2008) «Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges», *Nat. Rev. Genet.*, 9(5), p. 356-369.
- McClung, C. A. *et al.* (2005) «Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(26), p. 9377-9381.
- McGue, M. *et al.* (2013) «A genome-wide association study of behavioral disinhibition», *Behav. Genet.*, 43(5), p. 363-373.
- McOmish, C. E. *et al.* (2008) «PLC-β1 knockout mice as a model of disrupted cortical development and plasticity: Behavioral endophenotypes and dysregulation of RGS4 gene expression», *Hippocampus*, 18(8), p. 824-834.
- Mead, A. N. *et al.* (2002) «Intravenous cocaine induced-activity and behavioural sensitization in norepinephrine-, but not dopamine-transporter knockout mice», *Eur. J. Neurosci.*, 16(3), p. 514-520.

- Medvedev, I. O. *et al.* (2005) «Characterization of conditioned place preference to cocaine in congenic dopamine transporter knockout female mice», *Psychopharmacology (Berl)*, 180(3), p. 408-413.
- Mello, N. K. *et al.* (2014) «Effects of chronic varenicline treatment on nicotine, cocaine, and concurrent Nicotine+Cocaine self-administration», *Neuropsychopharmacology*, 39(5), p. 1222-1231.
- Merikangas, K. R. *et al.* (1998) «Familial transmission of substance use disorders», *Arch. Gen. Psychiatry*, 55(11), p. 973-979.
- Messas, G. *et al.* (2005) «Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence», *Psychiatr. Genet.*, 15(3), p. 171-174.
- Miner, L. L. *et al.* (1995) «Retained cocaine conditioned place preference in D1 receptor deficient mice», *Neuroreport*, 6(17), p. 2314-2316.
- Minozzi, S. *et al.* (2015) «Anticonvulsants for cocaine dependence», *Cochrane Database Syst. Rev.*, p. CD006754.
- Mitchell, B. D. *et al.* (2014) «Using previously genotyped controls in genome-wide association studies (GWAS): Application to the Stroke Genetics Network (SiGN)», *Front. Genet.*, 5(APR), p. 95.
- Mitchell, M. R. i Potenza, M. N. (2014) «Addictions and Personality Traits: Impulsivity and Related Constructs.», *Curr. Behav. Neurosci. reports*, 1(1), p. 1-12.
- Moeller, F. G. *et al.* (2001) «Psychiatric Aspects of Impulsivity», *Am. J. Psychiatry*, 158(11), p. 1783-1793.
- Moeller, F. G. *et al.* (2007) «Diffusion tensor imaging eigenvalues: Preliminary evidence for altered myelin in cocaine dependence», *Psychiatry Res. - Neuroimaging*, 154(3), p. 253-258.
- Morice, E. *et al.* (2004) «Phenotypic expression of the targeted null-mutation in the dopamine transporter gene varies as a function of the genetic background», *Eur. J. Neurosci.*, 20(1), p. 120-126.
- Morton, W. A. (1999) «Cocaine and psychiatric symptoms», *Prim. Care Companion J. Clin. Psychiatry*, 1(4), p. 109-113.
- Moszyńska, A. *et al.* (2017) «SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease», *Open Biol.*, 7(4), p. 170019.
- Mucaj, V. *et al.* (2015) «MicroRNA-124 expression counteracts pro-survival stress responses in glioblastoma», *Oncogene*, 34(17), p. 2204-2214.
- Multani, P. K. *et al.* (2012) «Neuronal calcium sensor-1 and cocaine addiction: A genetic association study in African-Americans and European Americans», *Neurosci. Lett.*, 531(1), p. 46-51.
- Mutz, K. O. *et al.* (2013) «Transcriptome analysis using next-generation sequencing», *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24(1), p. 22-30.
- Nagao, Y. (2015) «Copy number variations play important roles in heredity of common diseases: A novel method to calculate heritability of a polymorphism», *Sci. Rep.*, 5(1), p. 17156.
- Narasimhan, D., Woods, J. H. i Sunahara, R. K. (2012) «Bacterial cocaine esterase: a protein-based therapy for cocaine overdose and addiction.», *Future Med. Chem.*, 4(2), p. 137-50.
- Narayana, P. A. *et al.* (2014) «Chronic cocaine administration causes extensive white matter damage in brain: Diffusion tensor imaging and immunohistochemistry studies», *Psychiatry Res. - Neuroimaging*, 221(3), p. 220-230.
- Neasta, J. *et al.* (2010) «Role for mammalian target of rapamycin complex 1 signaling in neuroadaptations underlying alcohol-related disorders», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107(46), p. 20093-20098.
- Nestler, E. J. (2001) «Molecular neurobiology of addiction», *Am. J. Addict.*, p. 201-217.
- Nestler, E. J. (2005) «Is there a common molecular pathway for addiction?», *Nat. Neurosci.*, 8(11), p. 1445-1449.
- Nestler, E. J. (2008) «Transcriptional mechanisms of addiction: role of FosB», *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 363(1507), p. 3245-3255.
- Nestler, E. J. (2014) «Epigenetic mechanisms of drug addiction», *Neuropharmacology*, 76(PART B), p. 259-268.
- Noble, E. P. *et al.* (1993) «Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence.», *Drug Alcohol Depend.*, 33(3), p. 271-85.
- Nocito Echevarria, M. A. *et al.* (2017) «N-acetylcysteine for treating cocaine addiction – A systematic review», *Psychiatry Res.*, 251, p. 197-203.

Bibliografia

- Noda, Y. i Nabeshima, T. (2002) «Learning/memory and drug dependence.», *Nihon Yakurigaku Zasshi.*, 119(4), p. 213-217.
- Nsengimana, J. i Bishop, D. T. (2017) «Design Considerations for Genetic Linkage and Association Studies», en *Stat. Hum. Genet. Methods Mol. Biol. vol 1666*, p. 257-281.
- O'Carroll, D. et al. (2007) «A Slicer-independent role for Argonaute 2 in hematopoiesis and the microRNA pathway», *Genes Dev.*, 21(16), p. 1999-2004.
- O'Connor, E. C. et al. (2011) «The predictive validity of the rat self-administration model for abuse liability», *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35(3), p. 912-938.
- O'Dushlaine, C. et al. (2015) «Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways», *Nat. Neurosci.*, 18(2), p. 199-209.
- O'Neill, B., Tilley, M. R. i Gu, H. H. (2013) «Cocaine produces conditioned place aversion in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter», *Genes, Brain Behav.*, 12(1), p. 34-38.
- Oberdoerffer, S. (2012) «A conserved role for intragenic DNA methylation in alternative pre-mRNA splicing.», *Transcription*, 3(3), p. 106-9.
- Oliveira, M. T. et al. (2003) «Drugs of abuse induce apoptotic features in PC12 cells.», *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1010, p. 667-70.
- del Olmo, N. et al. (2006) «Enhancement of hippocampal long-term potentiation induced by cocaine self-administration is maintained during the extinction of this behavior», *Brain Res.*, 1116(1), p. 120-126.
- Del Olmo, N. et al. (2007) «Cocaine self-administration improves performance in a highly demanding water maze task», *Psychopharmacology (Berl.)*, 195(1), p. 19-25.
- Orson, F. M. et al. (2014) «The future potential for cocaine vaccines.», *Expert Opin. Biol. Ther.*, 14(9), p. 1271-83.
- Ozburn, A. R., Janowsky, A. J. i Crabbe, J. C. (2015) «Commonalities and Distinctions Among Mechanisms of Addiction to Alcohol and Other Drugs», *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 39(10), p. 1863-1877.
- Palmer, R. H. C. et al. (2015) «Examining the role of common genetic variants on alcohol, tobacco, cannabis, and illicit drug dependence.», *Addiction*, 110(3), p. 530-537.
- Parsons, L. H., Koob, G. F. i Weiss, F. (1995) «Serotonin dysfunction in the nucleus accumbens of rats during withdrawal after unlimited access to intravenous cocaine», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 274(3), p. 1182-1191.
- Patkar, A. A. et al. (2002) «No association between polymorphisms in the serotonin transporter gene and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals», *Psychiatr. Genet.*, 12(3), p. 161-164.
- Peng, S. et al. (2010) «ERK in learning and memory: a review of recent research.», *Int. J. Mol. Sci.*, 11(1), p. 222-32.
- Peraile, I. et al. (2010) «Dopamine transporter down-regulation following repeated cocaine: Implications for 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced acute effects and long-term neurotoxicity in mice», *Br. J. Pharmacol.*, 159(1), p. 201-211.
- Persico, A. M. et al. (1996) «D2dopamine receptor gene TaqI A1 and B1 restriction fragment length polymorphisms: Enhanced frequencies in psychostimulant-preferring polysubstance abusers», *Biol. Psychiatry*, 40(8), p. 776-784.
- Pierce, R. C. et al. (2012) «Rational development of addiction pharmacotherapies: Successes, failures, and prospects», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2, p. :a012880.
- Pierce, R. C. et al. (2018) «Environmental, genetic and epigenetic contributions to cocaine addiction», *Neuropsychopharmacology*, (December 2017), p. 1-10.
- Pittenger, C. (2013) «Disorders of memory and plasticity in psychiatric disease», *Dialogues Clin. Neurosci.*, 15(4), p. 455-463.
- Pitts, E. G., Taylor, J. R. i Gourley, S. L. (2016) «Prefrontal cortical BDNF: A regulatory key in cocaine- and food-reinforced behaviors», *Neurobiol. Dis.*, 91, p. 326-335.
- Plebani, J. G. et al. (2012) «Results of an initial clinical trial of varenicline for the treatment of cocaine dependence», *Drug Alcohol Depend.*, 121(1-2), p. 163-166.
- Pompanon, F. et al. (2005) «Genotyping errors: causes, consequences and solutions», *Nat. Rev. Genet.*, 6(11), p. 847-859.

- Poon, H. F. *et al.* (2007) «Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells», *Neurochem. Int.*, 50(1), p. 69-73.
- Price, A. L. *et al.* (2006) «Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies», *Nat. Genet.*, 38(8), p. 904-909.
- Price, A. L. *et al.* (2010) «New approaches to population stratification in genome-wide association studies», *Nat. Rev.*, 11(June), p. 459-463.
- Przegaliński, E. *et al.* (2005) «Effects of CP 154,526, a CRF1 receptor antagonist, on behavioral responses to cocaine in rats», *Neuropeptides*, 39(5), p. 525-533.
- Quinn, R. K. *et al.* (2015) «Distinct miRNA expression in dorsal striatal subregions is associated with risk for addiction in rats», *Transl. Psychiatry*, 5(2), p. e503.
- Quinn, R. K. *et al.* (2017) «Temporally specific miRNA expression patterns in the dorsal and ventral striatum of addiction-prone rats», *Addict. Biol.*, 1 març, p. 631-642.
- Radwanska, K., Caboche, J. i Kaczmarek, L. (2005) «Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) modulate cocaine-induced gene expression in the mouse amygdala», *Eur. J. Neurosci.*, 22(4), p. 939-948.
- Ramakrishnan, M. *et al.* (2014) «Hapten optimization for cocaine vaccine with improved cocaine recognition», *Chem. Biol. Drug Des.*, 84(3), p. 354-363.
- Reginsson, G. W. *et al.* (2018) «Polygenic risk scores for schizophrenia and bipolar disorder associate with addiction», *Addict. Biol.*, 23(1), p. 485.
- Renthal, W. *et al.* (2007) «Histone Deacetylase 5 Epigenetically Controls Behavioral Adaptations to Chronic Emotional Stimuli», *Neuron*, 56(3), p. 517-529.
- Renthal, W. *et al.* (2009) «Genome-wide Analysis of Chromatin Regulation by Cocaine Reveals a Role for Sirtuins», *Neuron*, 62(3), p. 335-348.
- Ripke, S. *et al.* (2014) «Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci», *Nature*, 511(7510), p. 421-427.
- Rivetti di Val Cervo, P. *et al.* (2012) «p63-microRNA feedback in keratinocyte senescence», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109(4), p. 1133-1138.
- Robison, A. J. i Nestler, E. J. (2012) «Transcriptional and Epigenetic Mechanisms of Addiction», *Nat. Rev. Neurosci.*, 12(11), p. 623-637.
- Rocha, B. A. *et al.* (1997) «Intravenous cocaine self-administration in mice lacking 5-HT1B receptors», *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 57(3), p. 407-412.
- Rocha, B. A., Fumagalli, F., *et al.* (1998) «Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice», *Nat. Neurosci.*, 1(2), p. 132-137.
- Rocha, B. A., Searce-Levie, K., *et al.* (1998) «Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1 B receptor», *Nature*, 393(6681), p. 175-178.
- Rocha, B. A. *et al.* (2002) «Enhanced locomotor, reinforcing, and neurochemical effects of cocaine in serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor mutant mice.», *J. Neurosci.*, 22(22), p. 10039-45.
- Rodrigues, A. C. *et al.* (2011) «MicroRNA expression is differentially altered by xenobiotic drugs in different human cell lines», *Biopharm. Drug Dispos.*, 32(6), p. 355-367.
- Rodriguez, A. *et al.* (2004) «Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units», *Genome Res.*, 14(10 A), p. 1902-1910.
- Rolls, E. T. (2000) «The Orbitofrontal Cortex and Reward», *Cereb. Cortex*, 10(3), p. 284-294.
- Rubinstein, M. *et al.* (1997) «Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine.», *Cell*, 90(6), p. 991-1001.
- Russo, S. J. *et al.* (2009) «Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction.», *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1(Suppl 1), p. 73-82.
- Saba, R. *et al.* (2012) «Dopamine-Regulated MicroRNA MiR-181a Controls GluA2 Surface Expression in Hippocampal Neurons», *Mol. Cell. Biol.*, 32(3), p. 619-632.
- Saccone, N. L. *et al.* (2008) «In search of causal variants: refining disease association signals using cross-population contrasts.», *BMC Genet.*, 9, p. 58.

Bibliografia

- Saccone, S. F. *et al.* (2007) «Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs», *Hum. Mol. Genet.*, 16(1), p. 36-49.
- Sadler, B. *et al.* (2014) «Variants near CHRN3-CHRNA6 are associated with DSM-5 cocaine use disorder: Evidence for pleiotropy», *Sci. Rep.*, 4, p. 4497.
- Sanchis-Segura, C. i Spanagel, R. (2006) «Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: An overview», *Addict. Biol.*, 11(1), p. 2-38.
- Saunders, M. A., Liang, H. i Li, W.-H. (2007) «Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(9), p. 3300-3305.
- Schaefer, A. *et al.* (2010) «Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction», *J. Exp. Med.*, 207(9), p. 1843-1851.
- Schank, J. R., Liles, L. C. i Weinschenker, D. (2008) «Norepinephrine Signaling Through β -Adrenergic Receptors is Critical for Expression of Cocaine-Induced Anxiety», *Biol. Psychiatry*, 63(11), p. 1007-1012.
- Schindler, C. W. i Goldberg, S. R. (2012) «Accelerating cocaine metabolism as an approach to the treatment of cocaine abuse and toxicity», *Future Med. Chem.*, 4(2), p. 163-175.
- Schmidt, H. D. *et al.* (2013) «Epigenetics and psychostimulant addiction.», *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 3(3), p. a012047.
- Schoenbaum, G. i Shaham, Y. (2008) «The Role of Orbitofrontal Cortex in Drug Addiction: A Review of Preclinical Studies», *Biol. Psychiatry*, 63(3), p. 256-262.
- Schork, N. J. *et al.* (2009) «Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases», *Curr. Opin. Genet. Dev.*, p. 212-219.
- Schratt, G. (2009) «microRNAs at the synapse.», *Nat. Rev. Neurosci.*, 10(12), p. 842-9.
- Schratt, G. M. *et al.* (2006) «A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development», *Nature*, 439(7074), p. 283-289.
- Schroeder, F. A. *et al.* (2008) «Drug-induced activation of dopamine D1 receptor signaling and inhibition of class I/II histone deacetylase induce chromatin remodeling in reward circuitry and modulate cocaine-related behaviors», *Neuropsychopharmacology*, 33(12), p. 2981-2992.
- Schultz, W. (2002) «Getting formal with dopamine and reward.», *Neuron*, 36(2), p. 241-63.
- Schultz, W., Tremblay, L. i Hollerman, J. R. (2000) «Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia.», *Cereb. Cortex*, 10(3), p. 272-84.
- Schumann, J. i Yaka, R. (2009) «Prolonged withdrawal from repeated noncontingent cocaine exposure increases NMDA receptor expression and ERK activity in the nucleus accumbens.», *J. Neurosci.*, 29(21), p. 6955-6963.
- Serafine, K. M. i Riley, A. L. (2009) «Possible role of norepinephrine in cocaine-induced conditioned taste aversions», *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 92(1), p. 111-116.
- Shen, H. Y. *et al.* (2008) «Additive effects of histone deacetylase inhibitors and amphetamine on histone H4 acetylation, cAMP responsive element binding protein phosphorylation and Δ FosB expression in the striatum and locomotor sensitization in mice», *Neuroscience*, 157(3), p. 644-655.
- Sherva, R. *et al.* (2010) «Variation in Nicotinic Acetylcholine Receptor Genes is Associated with Multiple Substance Dependence Phenotypes», *Neuropsychopharmacology*, 35(9), p. 1921-1931.
- Shippenberg, T. S., Hen, R. i He, M. (2000) «Region-specific enhancement of basal extracellular and cocaine-evoked dopamine levels following constitutive deletion of the Serotonin(1B) receptor.», *J. Neurochem.*, 75(1), p. 258-65.
- Shram, M. J. *et al.* (2015) «Assessment of Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions between Albumin-Fused Mutated Butyrylcholinesterase and Intravenously Administered Cocaine in Recreational Cocaine Users», *J. Clin. Psychopharmacol.*, 35(4), p. 396-405.
- Simpson, D. D. *et al.* (1999) «A national evaluation of treatment outcomes for cocaine dependence.», *Arch. Gen. Psychiatry*, 56(6), p. 507-14.
- Sizemore, G. M., Co, C. i Smith, J. E. (2000) «Ventral pallidal extracellular fluid levels of dopamine, serotonin, gamma amino butyric acid, and glutamate during cocaine self-administration in rats», *Psychopharmacology (Berl.)*, 150(4), p. 391-398.

- Smethells, J. R. *et al.* (2016) «Long-Term Blockade of Cocaine Self-Administration and Locomotor Activation in Rats by an Adenoviral Vector-Delivered Cocaine Hydrolase.», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 357(2), p. 375-81.
- Smith, A. C. W. *et al.* (2014) «Synaptic plasticity mediating cocaine relapse requires matrix metalloproteinases», *Nat. Neurosci.*, 17(12), p. 1655-1657.
- Söber, S., Laan, M. i Annilo, T. (2010) «MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391(1), p. 727-732.
- Song, F. J. i Chen, K. X. (2011) «Single-nucleotide polymorphisms among microRNA: Big effects on cancer», *Chin. J. Cancer*, p. 381-391.
- Song, J. J. *et al.* (2004) «Crystal structure of argonaute and its implications for RISC slicer activity», *Science* (80-), 305(5689), p. 1434-1437.
- Sora, I. *et al.* (1998) «Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice.», *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(13), p. 7699-7704.
- Sora, I. *et al.* (2001) «Molecular mechanisms of cocaine reward: Combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(9), p. 5300-5305.
- Soria, G. *et al.* (2005) «Lack of CBI cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration», *Neuropsychopharmacology*, 30(9), p. 1670-1680.
- Sulovari, A. *et al.* (2017) «Genome-wide meta-analysis of copy number variations with alcohol dependence», *Pharmacogenomics J.*
- Suzuki, T. *et al.* (2007) «Characterization of mRNA species that are associated with postsynaptic density fraction by gene chip microarray analysis», *Neurosci. Res.*, 57(1), p. 61-85.
- Tang, W.-X. *et al.* (2003) «Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims», *J. Neurochem.*, 85(4), p. 911-924.
- Taniguchi, M. *et al.* (2012) «Histone Deacetylase 5 Limits Cocaine Reward through cAMP-Induced Nuclear Import», *Neuron*, 73(1), p. 108-120.
- Thalhammer, A. i Cingolani, L. A. (2014) «Cell adhesion and homeostatic synaptic plasticity», *Neuropharmacology*, p. 23-30.
- Thanos, P. K. *et al.* (2008) «The effects of cocaine on regional brain glucose metabolism is attenuated in dopamine transporter knockout mice», *Synapse*, 62(5), p. 319-324.
- Thermes, V. (2006) «Medaka simplet (FAM53B) belongs to a family of novel vertebrate genes controlling cell proliferation», *Development*, 133(10), p. 1881-1890.
- Thomas, M. J., Kalivas, P. W. i Shaham, Y. (2008) «Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction», *Br. J. Pharmacol.*, p. 327-342.
- Thompson, A. M., Gosnell, B. A. i Wagner, J. J. (2002) «Enhancement of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine exposure», *Neuropharmacology*, 42(8), p. 1039-1042.
- Thompson, A. M., Swant, J. i Wagner, J. J. (2005) «Cocaine-induced modulation of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus», *Neuropharmacology*, 49(2), p. 185-194.
- Thompson, B. J. *et al.* (2011) «Transgenic elimination of high-affinity antidepressant and cocaine sensitivity in the presynaptic serotonin transporter», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(9), p. 3785-3790.
- Thomsen, M., Hall, F. S., *et al.* (2009) «Dramatically Decreased Cocaine Self-Administration in Dopamine But Not Serotonin Transporter Knock-Out Mice», *J. Neurosci.*, 29(4), p. 1087-1092.
- Thomsen, M., Han, D. D., *et al.* (2009) «Lack of Cocaine Self-Administration in Mice Expressing a Cocaine-Insensitive Dopamine Transporter», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 331(1), p. 204-211.
- Thorgeirsson, T. E. *et al.* (2008) «A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease», *Nature*, 452(7187), p. 638-642.
- Tiedje, C., Holtmann, H. i Gaestel, M. (2014) «The Role of Mammalian MAPK Signaling in Regulation of Cytokine mRNA Stability and Translation», *J. Interf. Cytokine Res.*, 34(4), p. 220-232.
- Tilley, M. R. *et al.* (2007) «Cocaine reward and locomotion stimulation in mice with reduced dopamine transporter expression», *BMC Neurosci.*, 8(1), p. 42.
- Tilley, M. R. *et al.* (2009) «Cocaine does not produce reward in absence of dopamine transporter inhibition»,

Bibliografia

Neuroreport, 20(1), p. 9-12.

Tilley, M. R. i Gu, H. H. (2008) «Dopamine transporter inhibition is required for cocaine-induced stereotypy», *Neuroreport*, 19(11), p. 1137-1140.

Tristán-Noguero, A. *et al.* (2013) «Lack of association between the LPR and VNTR polymorphisms of the serotonin transporter gene and cocaine dependence in a Spanish sample», *Psychiatry Res.*, 210(3), p. 1287-1289.

Uh, H. W. *et al.* (2012) «How to deal with the early GWAS data when imputing and combining different arrays is necessary», *Eur. J. Hum. Genet.*, 20(5), p. 572-576.

Uhl, G. R. (2000) «The VMAT2 gene in mice and humans: amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins», *FASEB J.*, 14(15), p. 2459-2465.

Uhl, G. R. *et al.* (2008) «“Higher order” addiction molecular genetics: Convergent data from genome-wide association in humans and mice», *Biochem. Pharmacol.*, 75(1), p. 98-111.

Uhl, G. R., Hall, F. S. i Sora, I. (2002) «Cocaine, reward, movement and monoamine transporters», *Mol. Psychiatry*, 7(1), p. 21-26.

Ulloa, A. E. *et al.* (2014) «Association between copy number variation losses and alcohol dependence across African American and European American ethnic groups.», *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 38(5), p. 1266-74.

UNDOC (2016) *Informe Mundial sobre las Drogas 2016, World Drug Rep. 2016.*

UNDOC (2017) *Informe mundial sobre las drogas 2017, World Drug Rep. 2017.*

Vaillancourt, K. *et al.* (2017) «DNA methylation dynamics and cocaine in the brain: Progress and prospects», *Genes (Basel)*.

Valzania, A. *et al.* (2017) «Histone deacetylase 5 modulates the effects of social adversity in early life on cocaine-induced behavior», *Physiol. Behav.*, 171, p. 7-12.

Vandenbergh, D. J. *et al.* (2000) «Long forms of the dopamine receptor (DRD4) gene VNTR are more prevalent in substance abusers: No interaction with functional alleles of the catechol-o-methyltransferase (COMT) gene», *Am. J. Med. Genet. - Neuropsychiatr. Genet.*, 96(5), p. 678-683.

Vilar, M. *et al.* (2006) «Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle», *EMBO J.*, 25(6), p. 1219-1230.

Vocci, F. J. i Montoya, I. D. (2009) «Psychological treatments for stimulant misuse, comparing and contrasting those for amphetamine dependence and those for cocaine dependence.», *Curr. Opin. Psychiatry*, 22(3), p. 263-8.

Volkow, N. D. *et al.* (1991) «Changes in brain glucose metabolism in cocaine dependence and withdrawal.», *Am. J. Psychiatry*, 148(5), p. 621-626.

Volkow, N. D. *et al.* (1992) «Long-term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers», *Synapse*, 11(3), p. 184-190.

Volkow, N. D. *et al.* (2002) «Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies.», *Neurobiol. Learn. Mem.*, 78(3), p. 610-24.

Volkow, N. D. *et al.* (2004) «Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications», *Mol. Psychiatry*, 9(6), p. 557-569.

Volkow, N. D. (2008) *Comorbidity: Addiction and Other Mental Illnesses, Natl. Inst. Drug Abus.*

Volkow, N. D. i Koob, G. (2015) «Brain disease model of addiction: Why is it so controversial?», *The Lancet Psychiatry*, p. 677-679.

Volkow, N. D., Koob, G. F. i McLellan, A. T. (2016) «Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction», *N. Engl. J. Med.*, 374(4), p. 363-371.

Volkow, N. D. i Morales, M. (2015) «The Brain on Drugs: From Reward to Addiction», *Cell*, 162(4), p. 712-725.

Vranjkovic, O. *et al.* (2012) «-Adrenergic Receptor Mediation of Stress-Induced Reinstatement of Extinguished Cocaine-Induced Conditioned Place Preference in Mice: Roles for α_1 and α_2 Adrenergic Receptors», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 342(2), p. 541-551.

Wagner, F. A. i Anthony, J. C. (2002) «From first drug use to drug dependence: Developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol», *Neuropsychopharmacology*, 26, p. 479-488.

Wallace, M. A. i Claro, E. (1990a) «A novel role for dopamine: inhibition of muscarinic cholinergic-stimulated

- phosphoinositide hydrolysis in rat brain cortical membranes», *Neurosci. Lett.*, 110(1), p. 155-161.
- Wallace, M. A. i Claro, E. (1990b) «Comparison of serotonergic to muscarinic cholinergic stimulation of phosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain cortical membranes.», *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 255(3).
- Wang, W., Kwon, E. J. i Tsai, L.-H. (2012) «MicroRNAs in learning, memory, and neurological diseases», *Learn. Mem.*, 19(9), p. 359-368.
- Wei, H., Hill, E. R. i Gu, H. H. (2009) «Functional mutations in mouse norepinephrine transporter reduce sensitivity to cocaine inhibition», *Neuropharmacology*, 56(2), p. 399-404.
- Welter, M. *et al.* (2007) «Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(16), p. 6840-6845.
- Wetherill, L. *et al.* (2008) «Neuropeptide Y receptor genes are associated with alcohol dependence, alcohol withdrawal phenotypes, and cocaine dependence», *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 32(12), p. 2031-2040.
- Wetherill, L. *et al.* (2015) «Association of substance dependence phenotypes in the COGA sample», *Addict. Biol.*, 20(3), p. 617-627.
- Williams, M. J. i Adinoff, B. (2008) «The role of acetylcholine in cocaine addiction.», *Neuropsychopharmacology*, 33(8), p. 1779-97.
- Wise, R. A. (1996) «Addictive Drugs and Brain Stimulation Reward», *Annu. Rev. Neurosci.*, 19(1), p. 319-340.
- Wise, R. A. (2008) «Dopamine and reward: The anhedonia hypothesis 30 years on», *Neurotox. Res.*, 14(2-3), p. 169-183.
- Wray, N. R. *et al.* (2018) «Genome-wide association analyses identify 44 risk variants and refine the genetic architecture of major depression», *Nat. Genet.*, p. 167577.
- Wright, J. W. i Harding, J. W. (2009) «Contributions of Matrix Metalloproteinases to Neural Plasticity, Habituation, Associative Learning and Drug Addiction», *Neural Plast.*, 2009, p. 1-12.
- Xian, H. *et al.* (2008) «Genetic and environmental contributions to nicotine, alcohol and cannabis dependence in male twins», *Addiction*, 103(8), p. 1391-1398.
- Xie, H. *et al.* (2014) «Cryptosporidium parvum induces SIRT1 expression in host epithelial cells through downregulating let-7i», *Hum. Immunol.*, 75(8), p. 760-765.
- Xu, F. *et al.* (2000) «Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants», *Nat. Neurosci.*, 3(5), p. 465-471.
- Xu, M. *et al.* (1994) «Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice», *Cell*, 79(6), p. 945-955.
- Xu, M. *et al.* (1997) «Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors», *Neuron*, 19(4), p. 837-848.
- Xuei, X. *et al.* (2007) «The opioid system in alcohol and drug dependence: Family-based association study», *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.*, 144(7), p. 877-884.
- Yang, J. i Li, M. D. (2014) «Association and interaction analyses of 5-HT3 receptor and serotonin transporter genes with alcohol, cocaine, and nicotine dependence using the SAGE data», *Hum. Genet.*, 133(7), p. 905-918.
- Yang, Y. R. *et al.* (2016) «Primary phospholipase C and brain disorders», *Adv. Biol. Regul.*, 61, p. 80-85.
- Yuferov, V. *et al.* (2005) «Microarray studies of psychostimulant-induced changes in gene expression.», *Addict. Biol.*, 10(1), p. 101-118.
- Zhang, B. *et al.* (2011) «Practical Consideration of Genotype Imputation: Sample Size, Window Size, Reference Choice, and Untyped Rate.», *Stat. Interface*, 4(3), p. 339-352.
- Zhang, D. *et al.* (2010) «Genetic control of individual differences in gene-specific methylation in human brain.», *Am. J. Hum. Genet.*, 86(3), p. 411-9.
- Zhang, H. *et al.* (2006) «Association between two μ -opioid receptor gene (OPRM1) haplotype blocks and drug or alcohol dependence», *Hum. Mol. Genet.*, 15(6), p. 807-819.
- Zhang, H. *et al.* (2008) «The OPRD1 and OPRK1 loci in alcohol or drug dependence: OPRD1 variation modulates substance dependence risk», *Mol. Psychiatry*, 13(5), p. 531-543.
- Zhou, Z. *et al.* (2011) «Substance-specific and shared transcription and epigenetic changes in the human hippocampus chronically exposed to cocaine and alcohol», *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(16), p. 6626-6631.

Bibliografia

Zhou, Z., Enoch, M. A. i Goldman, D. (2014) «Gene expression in the Addicted Brain», *Int. Rev. Neurobiol.*, 116, p. 251-273.

Zhu, Y. *et al.* (2016) «A thalamic input to the nucleus accumbens mediates opiate dependence.», *Nature*, 530(7589), p. 219-222.

Zovoilis, A. *et al.* (2011) «MicroRNA-34c is a novel target to treat dementias», *EMBO J.*, 30(20), p. 4299-4308.

Zuo, L. *et al.* (2009) «Interaction between two independent CNR1 variants increases risk for cocaine dependence in European Americans: a replication study in family-based sample and population-based sample.», *Neuropsychopharmacology*, 34(6), p. 1504-13.

Zuvich, R. L. *et al.* (2011) «Pitfalls of merging GWAS data: Lessons learned in the eMERGE network and quality control procedures to maintain high data quality», *Genet. Epidemiol.*, 35(8), p. 887-898.

Disseny de portada per Bàrbara Torrico i Noèlia Fernàndez