Salud Mental 2012;35:137-145

Las adicciones, la genómica y la proteómica

Maura Epifanía Matus Ortega,[1] Juan Carlos Calva Nieves,[1] Anabel Flores Zamora,[1]
Philippe Leff Gelman,[1,2] Benito Antón Palma[1]

Artículo original

SUMMARY

Drug addiction is a chronically relapsing disorder that has been characterized by (1) compulsion to seek and take the drug, (2) loss of control in limiting intake, and (3) emergence of a negative emotional state (e.g, dysphoria, anxiety, irritability) reflecting a motivational withdrawal syndrome when access to the drug is prevented (defined as Substance Dependence by the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders [DSM] of the American Psychiatric Association). Acute exposure to drugs of abuse initiates molecular and cellular alterations in the Central Nervous System that lead to an increased overall vulnerability to addiction with subsequent drug exposures. These drug-induced alterations employ changes in gene transcription that result in the synthesis of new proteins. Therefore, one of the important goals of addiction research is to identify the drug-induced gene expression changes in the specific brain structures related to the addictive properties of various drugs.

The molecular and genomic mechanisms by which drugs of abuse induce neuroplastic changes related to addiction remain largely unknown. Several studies have evaluated changes in gene and protein expression profiles in the brain after administration of drugs of abuse. Exposure to psychostimulants induces the activity-dependent gene expression of several transcription activators and repressors.

Genomic research strategies have recently transitioned from the search for unknown genes to the identification and evaluation of coordinated gene networks and transcriptional signatures. New opportunities arising from the analysis of these networks include identifying novel relationships between genes and signaling pathways, connecting biological processes with the regulation of gene transcription, and associating genes and gene expression with diseases. The identification of gene networks requires large gene expression data sets with multiple data points.

Functional genomics methods, studying the steady-state levels of these mRNA species, such as quantitative RT-PCR (qRT-PCR), whole-genome microarray analysis, and next generation sequencing methods, provide sensitive and high-throughput approaches to quantitatively examining mRNA (and miRNA) species present within the cells of the Nervous System.

Functional genomics studies can help to illuminate genes involved in the development of behaviors related to drug abuse and relapse liability, but cannot provide insight into post-translational modifications (e.g., phosphorylation and glycosylation of proteins after translation has occurred) or subcellular localization of the protein product. Therefore, using proteomic techniques presents the opportunity to assess the totality of gene expression, translation, modification, and localization. Unfortunately, the sensitivity of proteomic tools lags behind those of functional genomics. Moreover, examining the mRNA provides a restricted view of primarily the cell body. Indeed, from a systems biology standpoint, analysis of both mRNA and protein levels (as well as miRNA and epigenetic changes) will ultimately provide a more integrated view of the molecular underpinnings of addiction.

When applying proteomic technologies to addiction research, an understanding of the power of proteomic analysis is essential. After genetic information is transcribed into mRNA, a template is provided to the cell from which proteins will be synthesized.

Neuroproteomic studies offer great promise for increasing understanding of the biochemical basis of addiction. While proteomics is still an evolving field, proteomic approaches have proven useful for elucidating the molecular effects of several drugs of abuse. With a number of ongoing research programs in addiction proteomics and a growing number of investigators taking advantage of these tools, the addiction research field will benefit from a consideration of the capabilities and limitations of proteomic studies.

As with other biomedical research fields, drug abuse research is making use of new proteomic capabilities to examine changes in protein expression and modification on a large scale. To obtain the maximum benefit and scientific advancement from these new technologies, a clear understanding of the power and limitations of neuroproteomics is necessary. With the main limitation of neuroproteomic studies being the complexity of the proteome, approaches that focus these studies need to be employed. The salient message is that there is not a single best technical approach for all studies and that the main driver for the choice of proteomic technology and experimental design should be the advancement of the understanding and treatment of drug abuse.

An important area that has heretofore received limited attention is the experimental design and interpretation specific to neuroproteomic studies of drug abuse. These challenges include choice of animal model, ensuring sample quality, the complexity of brain tissue, confirming discovery findings, data analysis strategies, and integration of large data sets with the existing literature.

Epigenetics is the study of heritable changes other than those in the DNA sequence and encompasses two major modifications of DNA or chromatin: DNA methylation and post-translational modification of histones. In this context, now it is known that regulation of gene expression contribute to the long-term adaptations underlying the effects of drugs of abuse. The precise molecular events that are required

[1] Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones. Subdirección de Investigaciones Clínicas. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz.
[2] Actualmente: Subdirección de Investigaciones Biomédicas. Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

Correspondencia: Benito Antón Palma. Laboratorio de Neurobiología Molecular y Neuroquímica de Adicciones, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Calz. México-Xochimilco 101, San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, 14370, México, DF. E.mail: bapags@gmail.com

Recibido: 28 de julio de 2011. Aceptado: 28 de noviembre de 2011.

for modification of chromatin and that underlie gene repression or activation have not been elucidated.

Recent reports have addressed this question and demonstrated that drugs of abuse modify specific methyl-CpG-binding proteins that control histone acetylation and gene expression. Further elucidation of the wide-range of histone modifications and the ensuing consequences on gene expression will be necessarily before the potential for drug development can be realized. It is important to characterize the molecular alterations underlying chromatin remodeling and the regulation of the epigenetics events by drugs of abuse. It is clear that modification in gene expression by drugs of abuse promote cellular changes.

This review is intended to provide guidance on recent advances in the field of drug addiction. This review also presents a number of experimental design and sample approaches that have been applied to genomic, proteomic and epigenetic studies of addiction. Coupled with new technologies for data collection, analysis, and reporting, these approaches represent the future of the addiction field and hold the key to unlocking the complex of profile of drug abuse disorders.

Key words: Drug abuse, gene transcription, protein expression, epigenetics.

RESUMEN

La adicción a las drogas es una enfermedad mental que se caracteriza por ocasionar graves implicaciones sociales, económicas y de salud de los individuos que la padecen. La exposición aguda a las drogas de abuso provoca alteraciones moleculares y celulares en el Sistema Nervioso Central que ocasionan una vulnerabilidad para sufrir adicción a subsecuentes exposiciones a sustancias de abuso diferentes. Las alteraciones inducidas por las drogas producen cambios en la transcripción de genes que resultan en la síntesis de nuevas proteínas. Uno de los objetivos importantes en la investigación en el campo de las adicciones es identificar los cambios en la expresión de genes inducidos por las drogas en estructuras específicas del cerebro que están relacionadas con las propiedades adictivas de diferentes sustancias.

El campo de la genómica y la proteómica, aplicada al estudio de las adicciones, tiene como objetivo identificar a los genes y las proteínas candidatos involucrados en la regulación de los procesos adictivos. Se han logrado progresos considerables en la identificación de genes y proteínas que regulan las conductas complejas presentes en los procesos adictivos en modelos de animales y modelos de estudio en humanos con material obtenido *post-mortem*. Estos descubrimientos se han sumado a los esfuerzos por identificar los circuitos neurales implicados en las manifestaciones conductuales relacionadas con las adicciones. También han permitido la identificación de genes candidatos que podrán ser blancos de futuras estrategias terapéuticas desarrolladas para tratar los procesos adictivos.

Los estudios de genómica funcional han permitido identificar algunos de los genes involucrados en el desarrollo de las conductas adictivas, pero no tienen la capacidad de proporcionar información sobre las modificaciones post-traduccionales ni de la localización subcelular de las proteínas para las que codifican los genes. Por lo tanto, la incorporación de estudios proteómicos ofrece la oportunidad de lograr evaluar, en su totalidad, la expresión, la traducción, las modificaciones y la localización de los genes y sus productos de expresión.

Para obtener los máximos beneficios y avances con el empleo de estas nuevas tecnologías, deben comprenderse en su totalidad los alcances y limitaciones de la neuroproteómica. En este sentido, se debe tener especial cuidado en la elección del modelo de estudio, asegurar la calidad de la muestra, la complejidad de la estructura en estudio, confirmar los resultados obtenidos, las estrategias de análisis de resultados y la integración de los datos obtenidos con los ya reportados en la literatura científica.

Los estudios recientes sobre los mecanismos moleculares que controlan los cambios inducidos por las drogas de abuso sobre la función transcipcional, la conducta y la plasticidad sináptica han identificado el importante papel que desempeña la remodelación de cromatina en la regulación y estabilidad de los programas genéticos neuronales mediados por las drogas y la subsecuente manifestación de las conductas adictivas.

Se han identificado alteraciones epigenéticas sobre el genoma, tales como metilación del DNA y modificaciones en la función de las proteínas histonas. Estos importantes mecanismos se ven afectados como una respuesta neurobiológica a la administración de sustancias de abuso.

Esta revisión pretende mostrar algunos de los avances recientes en el campo de las adicciones, presentando una breve descripción de los hallazgos que emplean aproximaciones genómicas, proteómicas y epigenéticas. Las implicaciones de estos estudios moleculares ponen de manifiesto nuevos conocimientos sobre el probable desarrollo de intervenciones terapéuticas en el futuro.

Palabras clave: Abuso de drogas, transcripción genética, expresión de proteínas, epigenética.

DISECCIÓN GÉNICA DE LAS CONDUCTAS COMPLEJAS

El campo de la genómica y la proteómica, aplicada al estudio de los trastornos psiquiátricos, tiene como objetivo identificar a los genes y proteínas candidato involucrados en la regulación de los procesos de reforzamiento, motivación y funciones cognitivas de algunas conductas humanas. Se han identificado genes y sus respectivas proteínas involucradas en estas conductas. Se ha estudiado, por ejemplo, el papel de los receptores específicos de los neurotransmisores (como dopamina, glutamato y serotonina), las proteínas que participan en el señalamiento intracelular (proteínas cinasas y arrestinas) y los factores de transcripción (como las proteínas CREB y cFosB).[1-3]

En la presente revisión analizamos ejemplos representativos de algunos estudios actuales en este campo, detallando los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación y las implicaciones funcionales de los hallazgos.

ANÁLISIS GENÓMICOS

Lehrmann et al.[4] llevaron a cabo un análisis de microarreglos para analizar la expresión génica en el aPFC de tejidos *post-mortem* de 42 sujetos con historial de abuso a cocaína, marihuana y/o feniciclidina, comparándolos con 30 casos control, para identificar modificaciones transcripcionales. En el estudio se seleccionaron 39 transcritos de genes cuyo cambio fue altamente significativo. Para su análisis se di-

vidieron de acuerdo a su función y localización celulares (cuadro 1).

Por su lado, el grupo de Black[5] evalúa el efecto de la administración crónica de cocaína en un modelo de roedores adolescentes, para identificar los efectos causados por las sustancias de abuso al ser ingeridas a edades tempranas y su relación con la plasticidad neural. Estos autores identificaron grupos de genes que clasificaron sobre la base de sus funciones celulares. De los 56 genes cuya expresión disminuyó significativamente, se identificaron 34 transcritos cuya función es conocida: 10 factores de transcripción y proteínas que codifican para receptores nucleares; tres trascritos que codifican para proteínas relacionas a las funciones del citoesqueleto, del resto de los trascritos, 22 codifican para proteínas cuya función no se conoce. Se identificaron 145 transcritos de genes cuya expresión aumentó significativamente. De éstos, 92 pudieron clasificarse en grupos cuya función es conocida, 16 codifican para proteínas implicadas en funciones de la matriz extracelular y células de adhesión; tres de los trascritos codifican para proteínas que se relacionan con la actividad motora de los microfilamentos. El resto de los transcritos codifican para proteínas cuya función es aún desconocida (53 trascritos) (cuadro 2).

Cuadro 1. Grupos de genes alterados por la administración de drogas de abuso identificados en el estudio de Lehrmann et al.[4] Los genes cuya expresión se modificó significativamente se clasificaron de acuerdo a su función y localización celular.

Función/ localización celular	Proteína
Señalamiento de Calmodulina	• Genes regulados por calcio-calmodulina • Proteína fosfatasa de biosíntesis de AMP cíclico y la actividad de adenilato ciclasa
Retículo endoplásmico y aparato de Golgi	• Genes involucrados en funciones de retículo endoplásmico • Genes involucrados en funciones de aparato de Golgi • Proteínas adaptinas y cinasas de adaptinas • Proteínas involucradas en endocitosis de vesículas recubiertas por clatrina en el plasma de la membrana celular • Proteínas involucradas en el transporte entre el aparato de Golgi y el sistema endosomal • Proteínas lisososmales • Proteínas de tráfico vesicular en la sinapsis • Proteínas involucradas en el transporte de partículas desde el endosoma tardío hacia los lisosomas • Proteína marcadora de microdominios de membrana
Metabolismo de lípidos y colesterol	• Proteínas involucradas en la biosíntesis y transporte del colesterol • Proteínas involucradas en biosíntesis, metabolismo y modificación de lípidos
Otras funciones celulares	• Proteínas involucradas en procesos de transducción de señales • Proteínas de citoesqueleto • Proteínas involucradas en los procesos de ubiquitinación • Receptores nucleares • Proteínas de regulación transcripcional • Proteínas mitocondriales: transportadores, metabolismo energético, ribosomas. • Proteínas con función desconocida (31)

Hemby[6] publicó un revisión detallada sobre los estudios desarrollados por varios grupos de investigación para evaluar los efectos de la administración de cocaína sobre la expresión coordinada de genes de las regiones cerebrales involucradas en las vías mesocorticolímbicas, incluyendo al núcleo *accumbens* (NAc), la corteza prefrontal, el hipocampo, el hipotálamo lateral y el área tegmental ventral (VTA), en modelos de roedores.

Los estudios mostraron que la administración de cocaína induce cambios en la expresión de genes y proteínas involucradas en los procesos de neuroplasticidad, específicamente en áreas como la corteza y el hipocampo, así como en los relacionados con procesos conductuales en los que participan el VTA, el NAc y las proteínas involucradas en la función regulatoria de células progenitoras de proliferación en el giro dentado.

Los transcritos regulados hacia la alta incluyen a los genes tempranos, los que codifican para proteínas efectoras y de andamio, receptores, proteínas transductoras de señales, proteínas asociadas a los ritmos circadianos, proteínas transcripcionales y traduccionales, señales de transducción de enzimas metabólicas y proteínas de citoesqueleto; mientras que los genes de proteínas regulados hacia la baja comprenden primordialmente transcritos relacionados con la función mitocondrial junto con transcritos que codifican para proteínas transductoras de señales. Asimismo, la administración de cocaína induce cambios en la expresión de genes de proteínas involucradas en la potenciación a largo plazo, expresadas en el hipocampo.

NEUROPROTEÓMICA

Para comprender la intrincada maquinaria neuroadaptativa que participa en los procesos adictivos, es necesario complementar los análisis de expresión de genes con estudios que evalúen a los proteomas correspondientes.

Con el advenimiento de las estrategias de separación y análisis de proteínas, basados en espectrometría de masas de alto rendimiento, es posible abarcar proteomas completos lo que permite delinear una multitud de efectos neurobiológicos producidos por la administración de drogas de abuso. Existen estudios recientes en los que se emplearon modelos animales y muestras de tejidos humanos obtenidos *post-mortem*, con tecnologías emergentes para el análisis de expresión de proteínas que evalúan los cambios producidos

Cuadro 2. Grupos de genes alterados en la corteza prefrontal medial 22 horas después de la última administración de cocaína, identificados en el estudio de Black et al. Los grupos se clasificaron de acuerdo a la modificación de su expresión.

Genes regulados hacia abajo		
• Transcripción	EGR 1	EGR 2
	EGR inducible por TGFB	homer 1
	Gen homólogo a notch 2	SMAD 5
	Receptor nuclear de la subfamilia 4, grupo A, miembro 2	Translocador semejante a receptor nuclear aril-hidrocarbonado
	Dedo de zinc y dominio BTB 10	Dominio jumonji 1A
• Citoesqueleto	Similar a BAF53a	Proteína 3 relacionada a actina ARP3
	Proteína asociada a huntingtina 1	
Genes regulados hacia arriba		
• Matriz extracelular y células de adhesión	ADAM 17	Aggrecan 1
	Antígeno CD36 -like 2 (Receptor de colágeno tipo I)	Proteína rica en cisteína 61
	Dermatopontina	Elastina
	Glicoproteína nmb	Integrina, alfa 6
	Matrilina 2	Neurexina 3
	Procolágeno, tipo IX, alfa 2	Proteína de membrana segmento de varilla externo 1
	Molécula de adhesión de esperma	
	Proteína transmembranal 8	Tenascina XA
• Actividad motora de microfilamentos	Miosina, pesada 3	Miosina pesada 7
	Tubulina, beta 3	

en regiones definidas del cerebro como resultado de la ingesta crónica de cocaína.[6]

EL ESTUDIO PROTEÓMICO

En un experimento proteómico se deben considerar y optimizar múltiples variables en cada uno de los pasos experimentales: la elección del modelo conductual, la obtención y preparación de la muestra, la recopilación e interpretación de los datos obtenidos con el objetivo de establecer cuáles son más significativos y confiables.[7] En la figura 1 se describe cada uno de los principales pasos y las variables importantes.

PERFIL PROTÉOMICO

Los diferentes grupos de investigación han utilizado una amplia variedad de técnicas proteómicas para analizar el proteoma de la sinapsis y estudiar los efectos de las drogas de abuso en el Sistema Nervioso. Estas metodologías se describen detalladamente en la revisión de Abul-Husn y Devi[8] (cuadro 3).

EL PROTEOMA DE LA SINAPSIS

La aplicación de las nuevas técnicas proteómicas en la investigación en neurociencias ha enriquecido el conocimiento sobre la estructura y la función del Sistema Nervioso. Las técnicas de fraccionamiento subcelular han sido claves para los análisis proteómicos exitosos. Varios grupos de investigación han iniciado la identificación de la composición de las proteínas en la sinapsis, con particular énfasis en las densidades postsinápticas. Un número menor de estudios ha abordado el análisis de otros compartimentos sinápticos en los mamíferos, tales como sinaptosomas, membranas sinápticas, vesículas sinápticas y presinápticas. En la revisión de Abul-Husn y Devi[8] se describen estos estudios (cuadro 4).

NEUROPROTEÓMICA Y DROGAS DE ABUSO

En el campo de las drogas de abuso las aproximaciones proteómicas son útiles para generar una visión objetiva y global de los cambios inducidos sobre un proteoma específico tras su administración. Adicionalmente es posible comparar y caracterizar el efecto de las drogas para comprender mejor sus mecanismos de acción.

Ante la hipótesis de que la administración de las drogas de abuso produzca cambios persistentes y significativos en la sinapsis, efectos que persisten a largo plazo, varios grupos de investigación han estudiado el papel de las proteínas sinápticas en los procesos adictivos por medio de metodologías proteómicas subcelulares.

Prokai et al.[9] reportaron que entre las proteínas postsinápticas cuya expresión se modificó, se identificaron a algunas relacionadas con la adhesión celular, el tráfico vesicular sináptico y la endocitosis. Los autores del estudio proponen que estos hallazgos implican cambios en la estructura sináptica inducidos por la morfina, así como alteraciones en la liberación de neurotransmisores y/o en el tráfico de receptores.

En un estudio diferente, Li et al.[10] analizaron la modificación de la expresión de proteínas, a partir de regiones

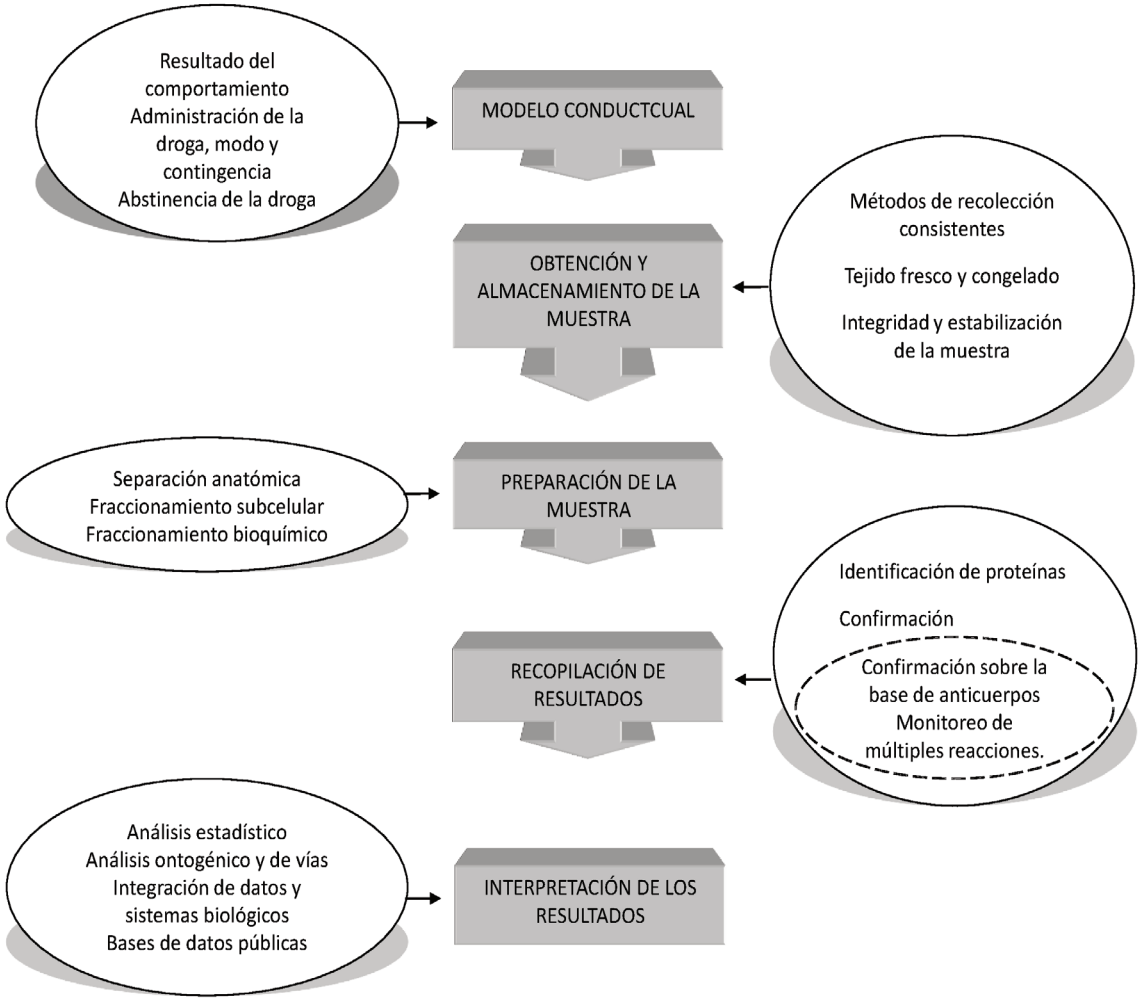

Figura 1. Pasos experimentales que deben considerarse durante el desarrollo de los estudios proteómicos, dado que influyen directamente en la obtención de los resultados. Cuadro modificado de Lull et al.[7]

cerebrales completas, tras la administración crónica de morfina. Los resultados del estudio mostraron la modificación de la expresión de sólo tres proteínas sinápticas (sinapsina, Lin-7 y sinucleína-beta). El hecho de identificar pocas proteínas sinápticas permite suponer que se pierden las proteínas expresadas en baja abundancia al emplear regiones cerebrales completas.[10] En un estudio similar,[11,12] sobre el efecto de la administración de morfina y butorfanol (una mezcla de agonista-antagonista opioide) en roedores, se identificaron cambios significativos en la expresión de proteínas del citoesqueleto (isoformas de tubulina y actina), lo que permite sugerir alteraciones en la morfología neuronal y/o en el transporte axonal. Adicionalmente se modificó la expresión de algunas proteínas de la fosforilación de tirosina, incluidas las proteínas Gi y Go. Este resultado permite proponer que existen cambios en la modulación de la transducción de señales de los receptores opioides durante la dependencia a drogas de abuso.

IMPLICACIONES FUNCIONALES

Los hallazgos descritos brevemente en esta revisión coinciden en sus resultados. Se identificaron modificaciones en la expresión de transcritos que codifican para proteínas relacionadas con el señalamiento de calcio. Estos resultados confirman observaciones previas de un decremento de los trascritos de proteínas involucradas con el señalamiento de calcio, vía cAMP, y en la expresión del transcrito de adenilato ciclasa I en las cortezas motora y frontal de pacientes alcohólicos.[13,14]

La administración de drogas de abuso induce la expresión de calmodulina, proteína moduladora de la actividad y sensibilidad de las moléculas de señalamiento dependientes de calcio, afectándose así la plasticidad sináptica, la memoria y la estabilización de la arquitectura dendrítica.

El incremento en la expresión de la mayoría de los trascritos que codifican para proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos y colesterol, permite suponer cambios

Cuadro 3. Metodologías empleadas en los estudios neuroproteómicos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación sobre el efecto de las drogas de abuso en el proteoma sináptico. Cuadro modificado de Abul-Husn y Devi.[8]

Técnica	Usos	Limitaciones
Perfil proteómico		
2-DE (IEF/SDS-PAGE)	Separación de proteínas solubles Detección de modificaciones post traduccionales e isoformas de proteínas.	Escasa detección de proteínas con pI o peso molecular extremos, de baja abundancia o hidrofóbicas. La cuantificación requiere consistencia y múltiples réplicas debido a la variabilidad entre cada gel.
DIGE	Más cuantitativo que 2-DE.	Sólo detecta proteínas que son sensibles a 2-DE.
16-BAC/SDS-PAGE	Separación superior de proteínas de membrana, comparado con 2-DE.	La cuantificación requiere consistencia múltiples réplicas debido a la variabilidad entre cada gel.
MudPIT	Identificación de proteínas solubles y de membrana.	No es cuantitativo, información limitada en las modificaciones post traduccionales.
ICAT	Análisis cuantitativo de membrana y proteínas solubles.	Sólo detecta péptidos trípticos que contienen cisteína; información limitada en modificaciones post traduccionales.
Identificación de proteínas		
MALDI-TOF MS	Obtención rápida de 'huella dactilar' de la carga-masa de los péptidos.	Se dificulta el análisis de mezclas complejas de proteínas.
MS en tándem	Identificación ambigua de proteínas utilizando una 'etiqueta de secuencia peptídica', análisis superior de mezclas complejas de proteínas.	Requiere tiempos largos de análisis de la muestra, interpretación de datos e identificación de proteínas.

Abreviaturas por sus siglas en inglés: 2-DE: Two-dimensional gel electrophoresis; IEF: IsoElectric Focusing; SDS: Sodium Dodecyl Sulfate; PAGE: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis; pI: isoelectric Point; DIGE: Differential In-Gel Electrophoresis; 16-BAC: Benzildimethyl-n-hexadecylammonium chloride; MudPIT: Multidimensional Protein Identification Tecnology; ICAT: Isotope-Coded Affinity Tag; MS: Mass Spectrometry; MALDI: Matrix-Aassisted Laser Desorption/Ionization; TOF: Time of Flight. Tabla modificada de Aul-Husn y Devi, 2006.

Cuadro 4. Los estudios de la sinapsis emplean diferente metodología proteómica en combinaciones diferentes, de acuerdo con la región sináptica en estudio, en este cuadro modificado de Abul-Husn y Devi,[8] se mencionan las combinaciones empleadas y la cantidad de proteínas identificadas.

Análisis neuroproteómico de la sinapsis	Métodos proteómicos y plataforma de MS	Número de proteínas identificadas
Fracción sináptica		
• Sinaptosomas y membranas sinápticas		
• Sinaptosomas de prosencéfalo de rata	2-DE, MALDI-TOF y LC-MS/MS; LC-MS/MS	246
• Sinaptosomas de prosenncéfalo de ratón	ICAT y LC-MS/MS	1131
• Membranas sinápticas de prosencéfalo de rata	SDS-PAGE, RP-HPLC, SCX-LC, MALDI-TOF y LC-MS/MS	107
• Membranas sinápticas de prosencéfalo de ratón	LC-MS/MS	862
• Membranas de hipocampo de ratón	LC-MS/MS	1685
Densidades postsinápticas		
• Prosencéfalo de rata	SDS-PAGE y MALDI-TOF	31
• Prosencéfalo de ratón	2-DE y LC-MS/MS	47
• Prosencéfalo de rata	2-DE y MALDI-TOF	233
	ICAT y LC-MS/MS	61
• Prosencéfalo de rata	MudPIT	492
• Cerebro de rata y ratón	SDS-PAGE y LC-MS/MS	452
• Prosencéfalo de rata	SDS-PAGE y LC-MS/MS	374
• Prosencéfalo de rata	MudPIT	231
• Rebanadas de hipocampo de rata	MudPIT	139
• Presinapsis		
• Vesículas sinápticas de cerebro de rata	2-DE y LC-MS/MS, 16-BAC/SDS-PAGE y LC-MS/MS	36
• Vesículas sinápticas libres de cerebro de rata	16-BAC/SDS-PAGE y MALDI-TOF	72
• Vesículas sinápticas asociadas con membrana plasmática presináptica de cerebro de rata	16-BAC/SDS-PAGE y MALDI-TOF	81
• Fracción de membranas postsinápticas de proencéfalo de rata	MudPIT	50

Las abreviaturas son las mismas que las del cuadro 1; RP-HPLC: Revrse Phasehigh-pressure liquid chromatography; SCX-LC: Strong Cation eXchange – Liquid Chromatograpy; LC-MS/MS: Liquid chromatograpy-tandem MS; MS: Mass Spectrometry.

en el funcionamiento neuronal, en la plasticidad y en la mielinización del SNC debidos a la administración de drogas de abuso.[15-17]

Las modificaciones en la expresión de transcritos que codifican para proteínas relacionadas con el tráfico intracelular y los organelos celulares, aparato de Golgi y retículo endoplásmico, permiten proponer efectos en el desarrollo de conos de crecimiento neuronal, posicionamiento axonal y modulación de las dendritas de la corteza apical, crecimiento y maduración de espinas dendríticas, que en última instancia implican consecuencias en la transmisión sináptica del cerebro adulto. La disminución en la expresión de transcritos relacionados con el tráfico sináptico vesicular, la endocitosis independiente de clatrina y el transporte de endosomas tardíos hacia los lisosomas, implica un efecto de las drogas de abuso sobre las vías secretorias de las neuronas y el transporte de moléculas hacia las dendritas.

Se reportaron modificaciones en la expresión de las proteínas relacionadas con la actividad motora de los microfilamentos del citoesqueleto y en las proteínas constituyentes de los microtúbulos de actina y miosina concernidas en el transporte de moléculas en los axones, lo que pone de manifiesto la complejidad de los efectos causados por las drogas de abuso sobre las funciones del citoesqueleto. Esto sugiere un potente efecto sobre la remodelación de la sinapsis.

Adicionalmente, se describieron un incremento en la expresión de transcritos que codifican para proteínas involucradas en la adhesión celular y la actividad motora de los microfilamentos, y una disminución en los transcritos que codifican para proteínas que se unen a la actina. Se propone que el incremento en la expresión de moléculas de adhesión impide la plasticidad sináptica por medio de la formación de nuevas sinapsis, menos adaptables, lo que impide la formación apropiada y el reforzamiento de conexiones específicas de aprendizaje.

De manera complementaria, los estudios proteómicos descritos permiten confirmar que la administración crónica de drogas de abuso altera de manera significativa los niveles y los estados de fosforilación de las proteínas sinápticas incluyendo las de proteínas que participan en la señalización, el tráfico vesicular, las endocíticas, el citoesqueleto y la adhesión celular, coincidiendo con los resultados de los estudios genéticos. La administración de cocaína mostró un efecto sobre la expresión de los genes tempranos en el sistema mesocorticolímbico, apoyando la hipótesis de la generación de una forma diferente de plasticidad neuroconductual que promueve la consolidación del proceso adictivo. Se ha propuesto que la administración rápida de las drogas origina neuroadaptaciones que promueven su búsqueda compulsiva y aumentan la vulnerabilidad a la adquisición, conductas ambas características del estado adictivo.[15]

El estudio de Black et al.[5] mostró una alta población de genes cuya función es aún desconocida; además, se modificó la expresión en muchos de los genes de manera transitoria, contrastando con los efectos fisiológicos permanentes. Estas importantes modificaciones fisiológicas podrían ser irreversibles.

IMPLICACIONES EPIGENÉTICAS

La mayor parte de la investigación en el terreno de las adicciones se ha centrado en el estudio de las cascadas intracelulares de transducción de señales y de factores de transcripción que se unen a elementos promotores (secuencias) de genes específicos, pero los mecanismos moleculares que controlan la expresión o la represión de los genes, conocidos como mecanismos epigenéticos, aún no han sido estudiados o valorados suficientemente. La epigenética se define como el estudio de los cambios heredados diferentes a los que ocurren en la secuencia del DNA y abarcan dos modificaciones principales del DNA o la cromatina: la metilación del DNA, la modificación covalente de citocinas, y las modificaciones post-transduccionales de las histonas, incluyendo la metilación, acetilación, fosforilación y sumoilación.[18]

En años recientes se ha evidenciado la importancia de los procesos de remodelación de cromatina en el control de la transcripción genética, revelándose una compleja red de mecanismos que regulan la accesibilidad de los genes a la maquinaria transcripcional responsable de la síntesis de RNA y de la expresión de los genes. Se ha reportado que las drogas de abuso interfieren en la regulación de la cromatina y en la maquinaria asociada a este proceso.[18-21] En este sentido se tiene información actualizada sobre las modificaciones en la cromatina que afectan la expresión genética, promoviéndola o reprimiéndola.

Por otra parte, Newton y Duman[20] y Cassel et al.[21] publicaron de manera separada los efectos causados por drogas psicotrópicas en el proceso de la remodelación de la cromatina y en la función de proteínas específicas que participan en la metilación de islas CpG, evento que controla la acetilación de histonas y, en última instancia, la expresión genética. Los resultados de Cassel et. al.[21] mostraron la inducción de la expresión de proteínas de unión a las islas CpG metiladas, MeCP2 y MBD1, en el estriado y con menos intensidad en la corteza frontal y el giro dentado del hipocampo, lo que sugiere una represión de la expresión genética en dichas estructuras causada por la administración de cocaína. Complementando estos resultados, los ensayos de modificación de histonas demostraron una disminución en la acetilación de la histona H3, lo que indica un estado menos relajado de la hebra del DNA, situación que impide la transcripción genética. Adicionalmente se incrementó de manera significativa la expresión del mRNA de la proteína desacetilada de histonas HDAC2, indicando que la regulación de la desacetilación de histonas ocurre por medio de un incremento en la expresión de esta familia de proteínas, lo que promueve la expresión genética al impedir el enrollamiento del DNA.

Los resultados de los estudios permiten concluir que la función de las histonas y el evento de remodelación de la cromatina se ven modificados por la administración de drogas de abuso. Esto proporciona un punto de partida para futuras investigaciones que permitan establecer las consecuencias funcionales de las modificaciones de la cromatina en respuesta a la administración de drogas de abuso, que en última instancia permita explicar las modificaciones en la expresión genética.

EL FUTURO DE LA PSICOGENÓMICA Y LA PSICOPROTEÓMICA

Para relacionar a los genes con una conducta compleja se requiere de estudios que confirmen las manifestaciones conductuales en modelos animales adecuados, que puedan extrapolarse a las enfermedades en los humanos.

Existen muchas pruebas para evaluar conductas en roedores, por ejemplo las mediciones de la función cognitiva, el miedo y la recompensa. En el campo de las adicciones es posible medir en los modelos animales el reforzamiento y el síndrome de abstinencia.[22,23]

En la mayoría de los estudios reportados se han utilizado modelos de roedores para simular los procesos adictivos a la cocaína en el humano. Sin embargo, evidencias crecientes indican la necesidad de refinar los modelos en roedores y primates no humanos para recapitular de mejor manera la adicción en el humano y relacionarla con diversas neuropatologías.

Se espera que en un futuro un paciente con una anormalidad conductual pueda tener acceso a una batería de pruebas que incluyan estudios genéticos y análisis de imagenología cerebral, que permitan definir la patología que sufre y se pueda entonces elegir el tratamiento más efectivo. Así, será posible identificar y educar a los individuos que sean particularmente vulnerables a una droga de abuso específica, y quienes, ante una breve exposición a la misma, corren un gran riesgo de adquirir la adicción. Así se podrán seleccionar programas óptimos en el tratamiento de individuos adictos.

CONCLUSIONES

Se ha establecido que las drogas de abuso provocan una modificación de la arquitectura neuronal mediante la alteración de la longitud de las dendritas, y que modifican la fisiología neuronal en general en las áreas cerebrales relacionadas con los procesos de adquisición y consolidación de la adicción.

Una de las áreas que se distingue sobre las otras regiones es la corteza prefrontal, debido a su altamente compleja conectividad sináptica y arborización dendrítica.[22,23] Por esta razón las modificaciones de la expresión genética, de manera específica sobre procesos importantes como el señalamiento intracelular mediado por calmodulina, el metabolismo del colesterol y el funcionamiento del aparato de Golgi y el retículo endoplásmico, reflejan los cambios en la función neuronal y la plasticidad sináptica inducidos por la administración de drogas de abuso. Por otro lado, los estudios epigenéticos iniciales llevados a cabo para conocer las implicaciones a nivel de regulación de la expresión genética, han mostrado que las drogas de abuso ejercen sus efectos porque producen modificaciones en la remodelación de la cromatina.[20] En este sentido, es de esperarse un importante desarrollo del conocimiento en esta disciplina que será de utilidad para comprender los mecanismos de los procesos de adquisición y las recaídas.

Existe una gran diversidad de resultados en los estudios proteómicos llevados a cabo para caracterizar la expresión de proteínas involucradas en los procesos adictivos a las drogas de abuso. A la fecha existen relativamente pocos estudios publicados en los que se combinan estudios de autoadministración con aproximaciones proteómicas. Una probable explicación es que los investigadores en las áreas de farmacología conductual y biología molecular han estado trabajando distanciados unos de otros. Otras causas de la diversidad en los resultados son: el uso inapropiado de modelos experimentales, la dependencia de sistemas no neuronales o tejidos neuronales involucrados en el reforzamiento de los efectos de la droga y la falta de substratos neurales definidos a nivel celular o bioquímico.

Los otros factores a considerar y que dificultan la comparación entre los diferentes estudios son la selección de la región cerebral, la fracción subcelular y/o el subgrupo de proteínas a analizar. Otro factor relevante es la selección de las técnicas proteómicas empleadas. Por ejemplo, el uso de dos técnicas de separación usadas para analizar la misma muestra de proteínas produce resultados drásticamente diferentes, esto se debe a que los métodos empleados pueden ser más o menos adecuados para cada subgrupo específico de proteínas (proteínas solubles y de membrana). Generalmente, las técnicas proteómicas se ejecutan de manera diferente en cada laboratorio de investigación.

Adicionalmente existen múltiples factores experimentales que deben considerarse: el tipo de droga de abuso, las vías y las velocidades de administración, la edad de los individuos, el grupo étnico al que pertenecen y en donde es importante la identificación de fenotipos.

La selección cuidadosa de estos factores y su estudio detallado en los procesos adictivos, aunado a la combinación de modelos conductuales adecuados de reforzamiento de drogas, específicamente los sistemas neurobiológicos, en conjunto con las técnicas moleculares, ampliará nuestro conocimiento sobre el desarrollo de pruebas diagnósticas objetivas lo que llevará a mejorar los tratamientos e implementar medidas preventivas y curas efectivas.

REFERENCIAS

1. Nestler EJ. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Delta-FosB. Phil Trans R Soc B 2008;363:3245-3255.
2. Bohn LM, Gainetdinov RR, Caron MG. G protein-coupled receptor kinase/beta-arrestin systems and drugs of abuse: psychostimulant and opiate studies in knockout mice. Neuromolecular Med 2004;5(1):41-50.
3. Nestler EJ. Genes and addiction. Nat Genet 2000;26:277–281.
4. Lehrmann E, Colantuoni C, Deep-Soboslay A, Becker KG et al. Transcriptional changes common to human cicaine, cannabis, phencyclidine abuse. PloS ONE1(1) 2006;e114.
5. Black YD, Maclaren FR, Naydenov AV, Carlezon WA et al. Altered attention and prefrontal cortex gene expression in rats after binge-like exposure to cocaine during adolescence. J Neurosc 2006;26:9656-9665.
6. Hemby SE. Cocainomics: new insights into the molecular basis of cocaine addiction. J Neuroimmune Pharmacol 2010;5(1):70-82.
7. Lull ME, Freemana WM, VanGuildera HD, Vranaa KE. The use of neuroproteomics in drug abuse research. Drug Alcohol Dependence 2010;107:11–22.
8. Abul-Husn NS, Devi LA. Neuroproteomics of the synapse and drug addiction. J Pharmacol Exp Ther 2006;318(2):461-468.
9. Prokai L, Zharikova AD, Stevens SM Jr. Effect of chronic morphine exposure on the synaptic plasma-membrane subproteome of rats: a quantitative protein profiling study based on isotope-coded affinity tags and liquid chromatography/mass spectrometry. J Mass Spectrom 2005;40(2):169-175.
10. Li KW, Jimenez CR, van der Schors RC, Hornshaw MP et al. Intermittent administration of morphine alters protein expression in rat nucleus accumbens. Proteomics 2006;6(6):2003-2008.
11. Kim SY, Chudapongse N, Lee SM, Levin MC et al. Proteomic analysis of phosphotyrosyl proteins in the rat brain: effect of butorphanol dependence. J Neurosci Res 2004;77(6):867-877.
12. Kim SY, Chudapongse N, Lee SM, Levin MC et al. Proteomic analysis of phosphotyrosyl proteins in morphine-dependent rat brains. Brain Res Mol Brain Res 2005;133(1):58-70.
13. Mayfield RD, Lewohl JM, Dodd PR, Herlihy A et al. Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. J Neurochem 2002;81(4):802-813.
14. Sohma H, Hashimoto E, Shirasaka T, Tsunematsu R et al. Quantitative reduction of type I adenylyl cyclase in human alcoholics. Biochim Biophys Acta 1999;1454(1):11-18.
15. Samaha AN, Mallet N, Ferguson SM, Gonon F et al. The rate of cocaine administration alters gene regulation and behavioral plasticity: implications for addiction. J Neurosc 2004;24:6362-6370.
16. Wojtal K, Trojnar MK, Czuczwar SJ. Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. Pharmacol Rep 2006;58(3):335-340.
17. Saher G, Brugger B, Lappe-Siefke C, Mobius W et al. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. Nat Neurosci 2005;8(4):468-475.
18. Wong CC, Mill J, Fernandes C. Drugs and addiction: an introduction to epigenetics. Addiction 2011;106(3):480-489.
19. Jiang Y, Langley B, Lubin FD, Renthal W et al. Epigenetics in the Nervous System. J Neurosci 2008;28:11753-11759.
20. Newton SS, Duman RS. Chromatin Remodeling: A Novel Mechanism of Psychotropic Drug Action Mol Pharmacol 2006;70:440-443.
21. Cassel S, Carouge D, Gensburger C, Anglard P et al. Fluoxetine and cocaine induce the epigenetic factors MeCP2 and MBD1 in adult rat brain. Mol Pharmacol 2006;70:487-492.
22. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. Neuropsychopharmacol 2010;35(1):217-238.
23. Self DW, Genova LM, Hope BT, Barnhart WJ et al. Involvement of cAMP-dependent protein kinase in the nucleus accumbens in cocaine self-administration and relapse of cocaine-seeking behavior. Neurosci 1998;18:1848-1859.

Artículo sin conflicto de intereses