

Aplicabilidad del análisis de microarray en la detección de patrones de expresión genética diferencial en procesos psicológicos: expresión genética amigdalina en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad

Sira Díaz-Morán¹, Marta Palència¹, Toni Cañete¹, Gloria Blázquez¹, Ignacio Morón², Marta Sabariego³, Rocío Donaire³, Carmen Torres³, Carme Mont-Cardona¹, Esther Martínez-Membrives¹, Regina López-Aumatell⁴, Adolf Tobeña¹, Alberto Fernández-Teruel¹

¹Unidad de Psicología Médica, Departamento de Psiquiatría y de Medicina Legal, Instituto de Neurociencia, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Barcelona, España.

²Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Instituto de Neurociencias F. Olóriz, Universidad de Granada, Granada, España.

³Departamento de Psicología, Universidad de Jaén, Jaén, España. ⁴Welcome Trust Centre for Human Genetics, Roosevelt Drive Oxford, UK.

Sira.Diaz@uab.cat

Resumen

En el presente trabajo se revisan las principales investigaciones sobre las bases genéticas del miedo, los trastornos de ansiedad y depresivos, así como de la susceptibilidad a las drogas, que han utilizado la técnica de microarray. Finalmente se presenta un resumen de algunos resultados preliminares, obtenidos por nuestro grupo de investigación, en el análisis de la expresión génica diferencial en ratas genéticamente heterogéneas (N/Nih-HS), seleccionadas por su alta/baja ansiedad, en función de su capacidad para la adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos (en la *Shuttle-box*).

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento del genoma completo marcó el inicio de una nueva era en la investigación sobre las bases funcionales de los sistemas biológicos, y permitió grandes avances en la comprensión del papel funcional de la expresión génica en situaciones conductuales complejas. Uno de los objetivos más importantes fue la identificación y localización de genes con expresión y funciones reguladoras en los mecanismos moleculares del comportamiento, de la emoción y los procesos cognitivos en diferentes especies (Mei et al., *Brain Res Bull* 2005, 67: 1-12; Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421).

Tradicionalmente, en modelos animales de ansiedad, para detectar expresión genética diferencial, se han aplicado una serie de "herramientas" como la hibridación "*in situ*" (Birzniece et al., *Neurosci Lett* 2002, 319: 157-161; Keck et al., *Neuropsychopharmacol* 2002, 26: 94-105), "*northern blot*" y "*reverse transcription-polymerase chain reaction*" (RT-PCR, Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421). Estos procedimientos analizan grupos pequeños de genes y, por este motivo, tienen rendimientos limitados (Lomax et al., *Hear Res* 2000, 147:293-302; Yoshikawa et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 275: 532-537). La técnica de análisis con microarray (finales siglo XX), inició el camino en la

investigación de los procesos moleculares subyacentes al procesamiento y almacenamiento de la información en el cerebro, a pesar de sus limitaciones (falsos positivos/negativos) (Irwin, *Mol Brain Res* 2001, 96: 163-169). Los primeros trabajos se centraron en la diferenciación de la expresión genética (análisis de *clusters*) de conjuntos de genes que podrían subyacer a cambios en alguna función macroscópica. Posteriormente, la investigación se focalizó en el estudio de expresión genética diferencial en condiciones experimentales (Dopazo, *OMIC* 2006, 10: 398-410). En la actualidad, se están desarrollando nuevos procedimientos inspirados en la biología de sistemas, focalizados en el estudio funcional de bloques/grupos de genes relacionados entre sí funcionalmente (Dopazo, *OMICS* 2006, 10: 398-410). El microarray ha mostrado ser un instrumento eficiente para el análisis de expresión de genes relacionados con los mecanismos moleculares subyacentes a los estados de ansiedad/miedo, puesto que permite el análisis en paralelo de miles de genes (Blohm & Guiseppi-Elie, *Curr Opin Biotechnol* 2001, 12: 41-47; Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421).

En el presente trabajo se revisan los principales estudios en los que se empleó el análisis de microarray para detectar diferencias de expresión genética en relación a comportamientos y procesos cognitivos/emocionales. Se muestran, además, resultados preliminares de una investigación en curso sobre las bases genéticas del miedo condicionado en ratas N/Nih-HS.

Análisis de microarray aplicado a la investigación de la depresión, el estrés y la susceptibilidad a las drogas de abuso

El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) juega un papel importante en el estrés y en la patofisiología del trastorno depresivo (Andrus et al., *Mol Psychiatr* 2010, 1-13). En roedores, la administración repetida de corticosterona induce comportamientos/síntomas de tipo depresivo y psicótico (Patten, *J Psychosom Res* 2000, 49: 447-449; Zhao et al., *Eur J Pharmacol* 2008, 581: 113-120). La "Prednisolona" –PSL-, glucocorticoide sintético, también causa comportamiento ansioso-depresivo en ratones C57BL/6n y en ratas (González-Pérez et al., *J Rheumatol* 2001, 28: 2529-2534; Kajiyama et al., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010, 34: 159-165). Exposiciones prolongadas a niveles elevados de glucocorticoides, por administración exógena, por estrés crónico o como consecuencia de la depresión, causan daño neural en el hipocampo y alteraciones en la expresión génica en esta estructura (Brown et al., *Biol. Psychiatry* 2004, 55: 538-545; Kajiyama et al., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010, 34: 159-165).

El factor liberador de corticotropina (CRF) es clave en la respuesta de estrés y en la actividad del eje HPA. Exposiciones a estrés agudo incrementan la expresión genética de CRFR1 (receptor del CRF) a través de la vía MEK-ERK1/2 (proteína quinasa que activa el factor de transcripción nuclear –ERK-) en el córtex prefrontal (Meng et al., *Mol Cell Endocrinol* 2011, 342: 54-63).

En un estudio de estrés crónico, Kim y Han (Kim & Han, *J Neurosci Res* 2006, 83: 497-507) identificaron, en amígdala de ratones C57BL/6j, sub-expresión del gen relacionado con la hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH) y de genes de factores de crecimiento, mientras que el gen de la hormona liberadora de la tirotrópina (TRH) se mostraba sobre-expresado.

Abuso de sustancias

En general, se asume que el consumo de sustancias de abuso se asume que resulta de la interacción entre predisposiciones genéticas y factores ambientales. Ratas que presentan más actividad locomotora durante una prueba conductual ("high responders", HR), también mostraron mayor conducta de auto-administración de psicoestimulantes que las ratas con menos conducta de locomotora ("low responders", LR, Kabbaj et al., *Psychopharmacology* (Berl) 2001, 158: 382-387). Estas diferencias conductuales, se acompañan de diferencias basales en la expresión genética de las vías moleculares de la circuitería emocional. También se ha identificado expresión diferencial de glucocorticoides en hipocampo, siendo más alta en las ratas LR (más inhibidas), y explicando la secreción diferencial de corticosterona en respuesta a estrés agudo (Kabbaj et al., *J. Neurosci* 2000, 20: 6983-6988).

Diversos estudios de expresión genética comparativa ponen de manifiesto los diferentes efectos de la exposición a un estrés psicosocial en función de la propensión al consumo de sustancias como el alcohol. Por ejemplo, se han identificado diferencias en la expresión de genes implicados en el ciclo celular (Ccn3 y Pctk1), en BDNF (promueve la locomoción y el efecto reforzante del consumo de drogas a partir del sistema dopaminérgico mesolímbico), CAM-KIIb, leptina y en genes relacionados con receptores de neurotransmisores como el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el glutamato, entre otros (Kabajj et al., *Neuropharmacology* 2004, 47: 111-122).

Asimismo, y a partir de estudios en los que se identificó sobre-regulación del gen *Fkbp5* con administración repetida de morfina, se considera que este gen media los procesos de tolerancia y dependencia de dicha droga, (McClung et al., *J. Neurosci* 2005, 25: 6005-6015). Otros estudios han relacionado genes del complejo de histocompatibilidad tipo II (MHC), como *Rt1.D β* , *Rt1.Ba* y *Rt1.B β* , con la mediación de respuestas inmunes en el tratamiento con morfina en ratas (Beagle et al., *Mol Pharmacol* 2004, 65: 437-442). También se han identificado una serie de genes implicados en la regulación de la acción de la oxicodona (analgésico opioide agonista sintético), como son *Fkbp5*, *Per2*, *Rt1.Da*, *Slc16a1* y *Abcg2* (Hassan et al., *Drug Metab Dispos* 2010, 38: 157-167).

Análisis de microarray aplicado al estudio de los trastornos de ansiedad y al miedo

A principios del siglo XXI se empezaron a esclarecer las funciones de genes relacionados con la ansiedad. Se descubrió, por ejemplo, la implicación de la proteína microtubular asociada -MAP- en este trastorno, así como la de genes relacionados con neurotransmisores (GABA, serotonina, norepinefrina y dopamina), receptores de $-5HT_3-$, receptores de colecistoquinina y sistemas neuropéptidos (Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421).

Debido a la heterogeneidad de las respuestas/rasgos de ansiedad y miedo en diferentes cepas de ratas, un mismo comportamiento puede implicar (o estar asociado a) rutas génicas diferentes o estar asociado a ellas. Por ejemplo, se han descrito varios *QTLs* (o "Locus para Rasgos Cuantitativos", del inglés "*Quantitative Trait Loci*") en cromosoma 5 y 10 de rata, implicados en el comportamiento de adquisición de la tarea de evitación activa en dos sentidos (Fernández-Teruel et al., *Genome Res.* 2002, 12: 618-626), que no fueron correspondidos con resultados de estudios de microarray (Zhang et al., *Genes Brain Behav* 2005, 4: 99-109). Estos

autores concluyen que las pequeñas diferencias observadas en los genes *Veli1* y *SLC6A4*, *Ptpro*, *Ykt6p* y *Id3a* contribuirían de manera relevante, a lo largo del ciclo vital, a las diferencias en comportamiento ansioso. Sin embargo, estos genes no están contenidos en las *QTLs* arriba citadas, lo que puede deberse a las diferentes tecnologías utilizadas.

En otro estudio con otro modelo de ansiedad, se detectaron 54 genes con diferencias significativas entre las dos cepas de ratas estudiadas (16/sobre-expresados y 38/su-expresados). Las ratas menos ansiosas, las *Sprague-Dawley* (SD), presentaban sobre-expresión del gen asociado a la actividad reguladora de citoesqueleto (ARC) y del factor trófico NGFI-A, así como sub-expresión del gen *5HT3R*, en comparación con las ratas más ansiosas, la cepa PVG (Wang et al., *Exp Brain Res* 2003, 149: 413-421). Por otra parte, en modelos animales de Trastorno por Estrés Postraumático (TEPT) se identificaron 31 genes correspondientes a los cambios observados en las ratas con síntomas de TEPT, observándose sobre-expresión del gen receptor 5-HT_{2C} y la enzima "*angiotensin I-converting enzyme*" (Harada et al., *Pharmacol Biochem Behav* 2008, 89: 11-16).

Miedo condicionado

En el proceso de miedo condicionado están implicados cambios bioquímicos y estructurales en las sinapsis, que requieren alteraciones en la función y expresión génica (Ressler et al., *J. Neurosci* 2002, 22: 7892-7902). En la comparación de la expresión génica hipocámpica entre las ratas "*Syracusa*" de alta vs baja evitación, que difieren claramente en sus respuestas de miedo condicionado, se identificaron ocho genes candidatos (p. ej. *SLC6A4*, *Veli1*, *Ptpro*, *Id3a*, *CD74*) con implicación relevante en el comportamiento de miedo y ansioso-depresivo en ratas y humanos, como es el caso del gen *SLC6A4* (Zhang et al., *Genes Brain Behav* 2005, 4: 99-109).

Los genes *Synapogyrin1* y *Rab1b*, se hallaron expresados diferencialmente en hipocampo en estudios en los que los fenotipos valorados se relacionaban con diversos tipos de aprendizaje, entre ellos el miedo condicionado (Cavallaro et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99: 16279-16284; D'Agata & Cavallaro, *Eur. J. Neurosci.* 2003, 18: 2835-2841; Zhang et al., *Genes Brain Behav* 2005, 4: 99-109). Es preciso ser cautos en la interpretación de estos resultados, puesto que se han obtenido empleando ratas seleccionadas genéticamente, y algunas diferencias encontradas podrían deberse a esta selección previa. Además, otra dificultad añadida a la hora de interpretar los resultados de los estudios con microarray, es que algunos genes como *Veli1* tienen dos isoformas homólogas en el hipocampo, cada una con distribuciones diferentes (Misawa et al., *J Biol Chem* 2001, 276: 9264-9272; Peng et al., *BMC Bioinformatics* 2003, 4: 26).

Gran parte del conocimiento que se posee actualmente sobre la memoria emocional proviene de la investigación del condicionamiento clásico de miedo (Mei et al., *Brain Res Bull* 2005, 67: 1-12). Se considera que el condicionamiento de miedo contextual depende del hipocampo y amígdala, y el condicionamiento de miedo con claves sólo requiere de la amígdala (Rodrigues et al., *J. Neurosci* 2001, 21: 6889-6896). Varios estudios farmacológicos y genéticos, sugieren que la formación de asociaciones en la memoria del miedo (contextuales y de claves) requiere de la activación de receptores NMDA glutamérgicos (Sara, *Mem* 2000, 7: 73-84). Mei et al. (*Brain Res Bull* 2005, 67: 1-12) hallaron 222 genes, relacionados con el miedo condicionado, que presentaban expresión diferencial en amígdala (123/sobre-expresados y 99/sub-expresados). De ellos, el 22% presentó funciones

relacionadas con la adhesión celular y la estructura proteínica (por ejemplo: α -actina, β -tubulina y proteínas microtubulares asociadas -MAP4-). Varios genes regulados por la amígdala están involucrados en la regulación de receptores ionotrópicos, como el receptor GABA_A (GABARAP). La baja regulación de este receptor, hallada después de la tarea de miedo condicionado, sugiere que el efecto inhibitorio observado decrece para permitir un incremento en la excitabilidad sináptica. Otros receptores que también se han encontrado asociados al miedo aprendido en ratas son, por ejemplo, el complejo actina-actinina,-CaMKII-, que interactúa con el receptor antagonista AMPA -CNQX-, y la proteína fosfatasa A2 -PP2A-, que los puede desfosforilar. El gen relacionado con el "cromosoma X frágil" -FXR1- también se ha asociado al miedo aprendido (Paradee et al., Neuroscience 1999, 94: 185-192). Ratones mutantes knockout para este gen, muestran un déficit significativo en la formación de la memoria relacionada con el miedo condicionado.

Otros genes, como el "*astrocyte-specific connexin-30*" -Cx30-, relacionado con funciones gliales, pueden cambiar su expresión en respuesta al miedo condicionado (Rash et al., J Neurosci 2001, 21: 1983-2000). De modo parecido ocurre con genes implicados en la formación de mielina, como la "*myelin-associated oligodendrocytic basic protein*" -MOBP- (McCallion et al., Mol Cell Neurosci 1999, 13: 229-236), "*proteolipid protein*" -PLP- (Yool et al., J Neurosci Res 2001, 63: 151-164) y "*oligodendrocyte-specific protein*" -OSP- (Bronstein et al., Neurology 1996, 47: 772-778).

Por último, el gen activador del transcrito Egr-1 en rata, muestra incremento en sus niveles de expresión después de miedo condicionado. La administración de diazepam provoca el bloqueo de este incremento y la reducción de la ansiedad (Letwin et al., J Neurosci 2006, 26: 5277-5287).

Expresión genética amigdalар en ratas N/Nih-HS extremas en ansiedad

Estudios neuroanatómicos y de comportamiento, han demostrado que el complejo amigdalino y estructuras como el hipocampo son componentes esenciales en las vías neurales mediadoras de emociones como el miedo y la ansiedad, o de procesos cognitivos como el aprendizaje y la memoria (Blalock et al., J Neurosci 2003, 23: 3807-3819; Dent et al., Physiol Behav 2001, 73: 841-847).

Nuestros resultados previos, obtenidos en cepas de ratas seleccionadas genéticamente por sus respuestas extremas en ansiedad condicionada (en la evitación activa en dos sentidos; las cepas de RHA-I y RLA-I), mostraron diferencias en expresión genética central relacionada con ansiedad/frustración (Sabariego et al., Neurosci Lett 2011, 504: 265-270). Continuación lógica de dicho trabajo ha sido estudiar la expresión genética diferencial en amígdala e hipocampo en relación a diferentes niveles de ansiedad en ratas genéticamente heterogéneas N/Nih-HS.

Las ratas N/Nih-HS derivan del cruce de ocho cepas consanguíneas genéticamente alejadas entre sí (las MR/N, WN/N, WKY/N, M520/N, F344/N, ACI/N, BN/SsN y BUF/N) (Hansen & Spuhler, Alcohol Clin Exp Res 1984, 8: 477-9). Este stock de ratas genéticamente heterogéneas constituye un recurso genético único para el mapeo fino de *QTLs*, a intervalos cromosómicos muy reducidos, y de *QTGs* ("*Quantitative Trait Genes*"), como ya han mostrado estudios sobre parámetros óseos (Alam et al., Bone 2011, 48: 1169-1177), sobre repuestas/rasgos de ansiedad/miedo (Johannesson et al., Genome Res 2008, 19: 150-158) y sobre diabetes (Solberg et al., Physiol Genom 2010, 41: 102-108).

Las ratas N/Nih-HS muestran un perfil de comportamiento y hormonal “defensivo”, con rendimiento pobre en situaciones de conflicto como la evitación en la “shuttle-box”, elevado tiempo de *freezing* (miedo), estilo conductual ansioso-depresivo y elevadas respuestas hormonales al estrés (Díaz-Morán et al., Behav Brain Res. 2012, 228:203-10; López-Aumatell et al., Behav Brain Res 2008; 188: 41–55; López-Aumatell et al., Behav Brain Res 2009, 202: 92-101).

En el estudio que estamos completando actualmente, del que a continuación presentamos algunos resultados preliminares relevantes, se seleccionaron tres grupos de ratas N/Nih-HS por sus niveles –altos, intermedios o bajos- de ansiedad/miedo condicionado (respuestas de evitación en la tarea de la *Shuttle-box*). Todos los animales habían sido evaluados en pruebas de ansiedad incondicionada, como el Laberinto Circular Elevado, miedo condicionado a un contexto y ansiedad condicionada (tarea de evitación en la “*Shuttle-box*”). Tres semanas después de la evaluación conductual, se diseccionaron las amígdalas e hipocampos, y tras la extracción de ARN se analizaron mediante microarray.

Los resultados relativos a expresión génica en amígdala se hallan en una fase de análisis casi definitiva, a falta únicamente de la validación por RT-PCR de algunos genes relevantes. Podemos decir que se identificaron 414 genes con expresión diferencial significativa en amígdala ($FDR < 0.05$), 341 genes sobre-expresados (el grupo de ratas “Baja-ansiedad” presentaba mayor nivel de expresión génica que el grupo “Moderada/Alta-ansiedad”) y 73 genes sub-expresados (el grupo de ratas “Baja- ansiedad” presentaban menor nivel de expresión génica que el grupo “Moderada/Alta-ansiedad”). Del total de genes, 28 se relacionaban con funciones del sistema nervioso central (neurotransmisión, procesos inmunitarios, procesos hormonales, drogas de abuso y comportamiento), de los que 6 se presentaron sobre-expresados y 22 sub-expresados (*fold-change* $> |2|$, $FDR < 0.05$, ver algunos genes relevantes en **Tabla 1**).

La **Figura 1** representa un claro ejemplo de la relación entre los niveles de expresión de uno de estos genes y las respuestas de miedo condicionado (*freezing*/petrificación). Tal y como podemos observar en dicha figura, el gen receptor 3 de la taquinina (*Tacr3*), implicado en la respuesta hormonal ante estrés (Tabla 1), muestra niveles sub-expresados en amígdala en el grupo “Baja-Ansiedad” (menor nivel de expresión que el grupo “Moderada/Alta-ansiedad”). Además, cabe destacar que la regresión lineal muestra que los niveles de expresión de *Tacr3* predicen positivamente los niveles de “petrificación” o miedo condicionado (*Freezing*; Figura 1; correlación de *Pearson* $R=0.59$, modelo de regresión *stepwise* –pasos sucesivos-, $R^2 = 0.343$, $p = 0.028$).

A partir de estos resultados y de los análisis en curso en los hipocampos, de las diferencias de expresión génica encontradas entre estos dos grupos de ratas y la relación con las variables conductuales, podemos concluir: 1) las ratas N/Nih-HS son un buen modelo animal para el estudio de las bases neurogenéticas de los procesos psicológicos superiores; 2) los genes identificados con diferencias significativas de expresión, podrían ser buenos predictores de comportamientos relacionados con la ansiedad/miedo condicionado.

Por último, estos resultados preliminares (pero en apariencia suficientemente consistentes) sugieren que la aplicación del microarray en modelos animales en situaciones de ansiedad/miedo (condicionados o incondicionados) se perfila como una técnica analítica de relevante potencial para la detección de genes candidatos a influir (o estar asociados a) fenotipos complejos.

Tabla 1. Listado de genes sobre/sub-expresados en amígdala entre los extremos en ansiedad de las ratas N/Nih-HS: funciones relacionadas con el Sistema nervioso central.

Grupo "Baja-ansiedad" > Grupo "Moderada/Baja-ansiedad"	Nombre genes	Función
Pr15a2	<i>Prolactin family 5, subfamily a, member 2</i>	Regulación actividad hormonal (prolactina).
Duox2	<i>Dual oxidase 2</i>	Está implicado en el desarrollo y procesos metabólicos de la hormona tiroidea, así como en la reproducción sexual, en la morfogénesis de estructuras del sistema nervioso (diencefalo, glándula pituitaria, adenohipófisis, glándula tiroidea), así como del sistema endocrino y óseo.
Igfbp7	<i>Insulin-like growth factor binding protein 7</i>	Implicado en la respuesta a estímulos hormonales, regulación del crecimiento, respuesta a estimulación de corticoesteroides, cortisol, glucocorticoides y hormonas esteroideas. Está presente durante la gestación e implicado en la percepción de estímulos térmicos.
Grupo "Baja-ansiedad" < Grupo "Moderada/Alta-ansiedad"		
Pr14a1	<i>Prolactin family 4, subfamily a, member 1</i>	Regulación actividad hormonal (prolactina), papel mediador con las células "Natural Killer" durante la gestación. Función importante en la fisiología de la reproducción.
Slc6a14	<i>Solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14</i>	Es el miembro 14 (familia 6) del transportador de serotonina, implicado en el transporte de aminos, ácidos orgánicos, aminoácidos y neurotransmisores.
Tacr3	<i>Tachykinin receptor 3</i>	Está implicado en la regulación del sistema circulatorio, del comportamiento de ingesta, de la respuesta a estrógenos, estradiol y hormonas esteroideas, así como al consumo de cocaína y morfina, y participa en la regulación metabólica de la dopamina, así como en las vías de las proteínas G.
Ucn3	<i>Urocortin 3 (stresscopin)</i>	Está implicado en la activación y regulación AMPc, y en la regulación de: la secreción hormonal, de la respuesta a estímulos de hormonas esteroideas, glucocorticoides, mineralcorticoides, corticosterona e insulina. Así como también participa en procesos que involucren a la proteína G.

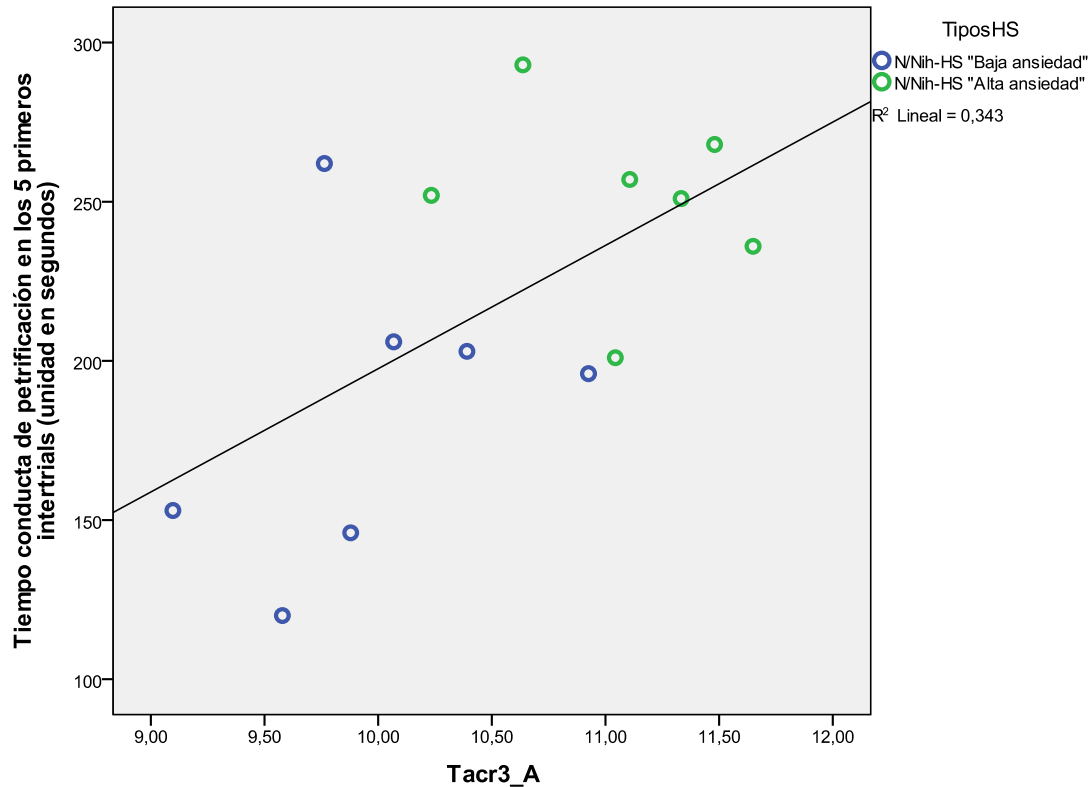


Figura 1. Relación entre los niveles de expresión genética (Tacr3) y conducta de miedo (*freezing*) en ratas N/Nih-HS, n = 14.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. F.J. Esteban su inestimable ayuda en la realización de este trabajo. Recibimos financiación del MICINN (SAF2009-10532), "Fundació La-Marató-TV3" (092630/31), 2009SGR-0051, y del consorcio EURATRANS (beca HEALTH-F4-2010-241504).