



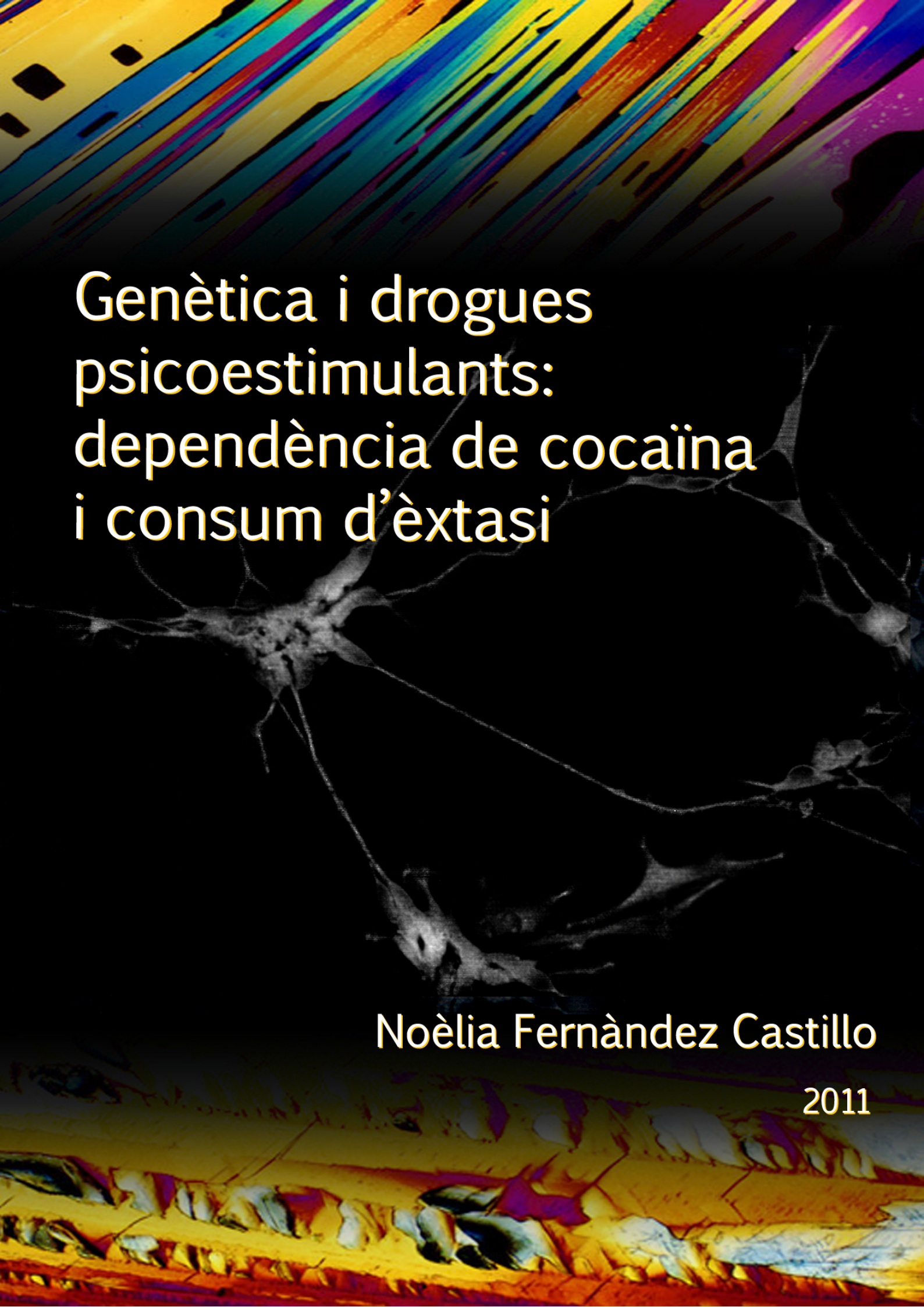
# Genètica i drogues psicoestimulants: dependència de cocaïna i consum d'èxtasi

Noelia Fernández Castillo

**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](http://www.tdx.cat)) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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](http://www.tdx.cat)) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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](http://www.tdx.cat)) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

The background features a complex, abstract design. The top half is dominated by numerous thin, parallel diagonal lines in a wide spectrum of colors including yellow, blue, green, red, and purple. Below this, a dark, almost black area contains a faint, light-colored silhouette of a neuron with its cell body and branching processes. The bottom portion of the image shows a textured, layered appearance with colors ranging from yellow to red, resembling a cross-section of biological tissue or a microscopic view of a neural pathway.

Genètica i drogues  
psicoestimulants:  
dependència de cocaïna  
i consum d'èxtasi

Noèlia Fernández Castillo

2011

# **GENÈTICA I DROGUES PSICOESTIMULANTS: DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA I CONSUM D'ÈXTASI**

Memòria presentada per  
**Noelia Fernández Castillo**

Per optar al grau de  
**Doctora per la Universitat de Barcelona**  
Programa de Genètica  
Departament de Genètica  
Bienni 2005-2007

Tesi dirigida pel **Dr. Bru Cormand Rifà** i la **Dra. Marta Ribasés Haro** al Departament  
de Genètica de la Universitat de Barcelona.

Dr. Bru Cormand Rifà

Dra. Marta Ribasés Haro

Noelia Fernández Castillo

2011



## AGRAÏMENTS

Una de les paraules que més es repeteix en aquesta tesi és “recompensa”, i de fet aquesta paraula definiria en gran mesura el que han suposat tots aquests anys per mi. Aquesta etapa ha estat sens dubte la millor etapa de la meua vida, a molts més nivells dels que mai m'hagués pogut imaginar. Aquesta tesi la vaig començar amb moltes il·lusions, que es van començar a gestar fins i tot molts anys abans de començar la carrera, però l'acabo amb moltes més encara. Segurament per dos motius claus: el primer per la certesa de que cada passa recorreguda t'apropa més a l'abisme de tot el que queda per aprendre i recórrer, el segon per haver compartit aquest camí amb vosaltres. És per això que tinc moltes coses que agrair-vos, i que necessitaria moltes més pàgines de les que hi ha en aquesta tesi per a fer-ho...

En primer lloc vull donar les gràcies als meus directors de tesi, el Bru i la Marta, per haver-me donat l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, per fer l'impossible per tirar endavant, pel recolzament, la inestimable ajuda i suport, la confiança que han dipositat en mi, l'optimisme i les energies. Per totes les preguntes que m'han fet fer-me i per totes les respostes que m'han donat. Per fer-me créixer i ajudar a aixecar-me quan m'he caigut. Però sobretot, per la gran paciència que han tingut!!

A tots els que han fet possible que aquest projecte tirés endavant. Al grup de Psiquiatria de Vall d'Hebrón, especialment al Dr. Miquel Casas, al Carlos Roncero, i a la Cristina Sánchez. Al grup del Rafael Maldonado, especialment a ell, la Maria Juliana i la Patricia. A Juli, por toda la inestimable ayuda y porque sin duda gran parte de este trabajo te lo debo a ti. Vull donar les gràcies també als pacients i voluntaris que han contribuït en aquest estudi.

Al Bru, perquè després de tots aquests anys, no direm quants però molts, puc dir que des del primer moment em vas fer sentir part del grup, d'un equip. Per haver-me portat de la maneta en els primers passos al laboratori i haver confiat en mi des del principi. Per ensenyar-me tantes coses, i intentar-me ensenyar tantes altres... Per celebrar eufòricament els petits èxits i treure-li importància als grans fracassos. Per la gran habilitat per seguir molt de prop la feina sense pressions, que crec que és clau. I per moltíssimes més coses, gràcies!!

A la Marta, per adoptar-me en el sentit més ampli de la paraula. Per l'enorme recolzament personal i professional. Per la paciència en els moments “tragedy” i per totes les col·leges merescudes. Per tot el que he après de tu, i per tot el que no he pogut aprendre però que m'encantaria poder fer-ho. Per la objectivitat, eficàcia, organització, resolució i per la valentia en afrontar nous projectes, no t'imagines quant t'admiro. Per totes les grans estones que hem passat juntes, pels riures, les abraçades i demès. Gràcies per ser la meua directora, companya, amiga i fins i tot “mare”.

A la Cris, perquè gran part d'aquesta tesi no hagués estat possible sense la teua feina. Però a part, perquè m'enduc molts bons moments i espero continuar tenint-los amb tu. Per acollir-me a VH, pel teu suport i carinyo. Pels consells, els moments piti-coti, i pels riures i la complicitat.

A la gent del lab, els que han passat, els que encara hi són, i els que arriben, per la inestimable ajuda i suport, per l'immillorable ambient de treball i pel dia a dia. A la Oriol, per ser la meua família artificial, perquè des de que et vaig veure vaig saber que seriem

grans amigues i no em vaig equivocar en absolut. Per tots els moments compartits dins i fora, pels viatges, les festes, els moments dolços i els moments amargs, t'estimo. A la Lauri, la meva germaneta de tesi, per començar el camí juntes i recorre'l de la maneta, per recolzar-nos mútuament i fer un bon tàndem fatàlic, per les parres i "periplos", però sobretot per l'enorme carinyo, moncha. Al Raül, perquè en els millors records de moments viscuts al laboratori hi estaves present, per tot el que em vas ensenyar i ajudar quan començava, i per tot el que hem rigut i cantat plegats. A l'Anna Di per tot el que vaig aprendre amb tu, per rescatar-me i per tots els moments viscuts que recordo amb tant carinyo i perquè després de tant temps encara et trobo molt a faltar. A l'Isaac, pels infinits "piques" i les malifetes còmplices, que tant m'han fet pixar de riure, per les festes, escapades i racons. Al Claudio, per todos los consejos, ayuda y apoyo, y por todos los momentos vividos. A la Cèlia, perquè sempre estàs disposada a ajudar, pel teu sentit de l'humor i pels moments juntes, però per tot el que ens queda per viure. A Mònica, perquè està clar que sin ti no haríamos nada, y porqué me encantan tus peculiares versiones de las canciones. A la Gessamí, perquè sempre estàs disposada a deixar-ho tot per donar un cop de mà, per tots aquests anys i per morir-me de riure amb tu. A Patri, por tu alegría, bondad y por iluminar el laboratorio. A la Roser i la Mariona, per tot el que m'han ajudat, sobretot quan vaig començar i anava tant perduda. A la Lidia, per compartir penes associatives. Al Lucas, per compartir colze a colze, literalment, els meus primers anys al laboratori. A la Neus, per la teva alegria, per preocupar-te per mi i per tots els consells. Al Dani, la Lluïsa i la Susanna, pel seu recolzament i rebre'm sempre amb un somriure d'orella a orella. I en definitiva a tots i cadascun dels vells i els nous, gràcies perquè no hagués estat possible sense vosaltres.

A la gent de mol, que tants cops de mà m'han donat, que han hagut de patir els meus seminaris i m'han ajudat a ser crítics amb la feina. Especialment a la Gemma, el Jon, el Ricky, l'Olga, l'Amanda, l'Ester, l'Àlex, la Marina, la Pili, el Marc, la Montse, el Freddy, Irene vD i la Roser. A la Gemma perquè si vaig arribar a parar aquí va ser gràcies a tu, perquè ets un referent (des de molts anys abans d'entrar al departament) i sempre que he tingut algun problema he pogut comptar amb tu i m'has ajudat a solucionar-ho amb èxit, com no. Al Jon, per tots els moments que t'he vingut a empenyar i no m'has engegat, i pels pitis, els riures, ànims i savis consells.

A la resta de la gent del departament, no acabaria mai... A la Ona per ser molt més que una companya de feina, per tots els moments viscuts i per l'alegria, energia i seny que transmetes. Al Paps per tots els riures, que ressonen i ressonen... Al Sisco, pels inestimables cafès-desconnexió de mitja tarda. Al Solana, per transmetre'm la visió crítica i inconformista, per tants bons moments i per seguir allà en la distància. A les mosques, especialment a la Isabel, la Cora, la Natalia, la Marina, el Xavi i l'Albert, amb els que hem compartit tantes cerveses, festes i tants bons moments. A tots amb els que vam compartir el viatge a Sardenya, que va ser genial, i amb els que vam escapar-nos a Pedraforca i Castellfollit. Als epis per acollir-me com una més, especialment al Sisco, Marta, Loli, Miquel, Juani, Maria, Chema, Nacho, Manu, Victor, Kike, Mette, Salvatore, Edu, Eva i Edu Moreno, per tantes bones estones. A l'Iñaki i al Guifré, per preocupar-se tant per mi, se us troba molt a faltar. I a les secres, què fariem sense elles!! Al Fèlix, de bio cell, per tota l'ajuda amb les cel·luletes.

A les nenes de Vall del Bronx, per acollir-me tant bé quan he estat allà. A l'Ester i la Roser per ajudar-me tant quan vaig començar i quan encara era migranyosa, i per tots aquests anys de camí. A l'Aintzane i el Mario por todos los raticos. A les nenes

d'anatomia patològica, especialment a la Laura i la Eli, per totes les birres i festes, i per adoptar-me a Granada.

Aquesta tesi tracta sobre drogues i no vull deixar-me'n una d'important, la precaïna! Amb ella he pogut desenganxar-me del "soma", veure la realitat i aportar el meu petit granet de sorra per intentar canviar-la. Gràcies a tota la gent de D-Recerca i de la FJI/Precarios, amb els que he compartit tanta feina, il·lusions i esforços durant aquests anys, però sobretot amb els que he après infinitat de coses a tants nivells, i on he trobat grans amics. Als que hem treballat més colze amb colze i hem compartit molts bons moments, a Elena Capel, Aritz, Ali, Kilian, Floren, Pablo, Aurora, Elisa, Alai, Javi, Gloria Torres, Jose Die, Victoria, Gloria Curto, Ceci, Nacho, Vicente, Fran, David García, Dani F, Xavi, Ester, Agnese, Naiara i Andrés. I especialment a la Bàrbara, l'Elena Piñero, l'Alfredo i l'Enric, per acollir-me quan vaig arribar perdudíssima i ser els meus guies precaris recercaires i per compartir tantes coses. A Alfredo, he aprendido tantísimas cosas contigo... es un honor ser tu "amigo", te echo mucho de menos. A David González, por todas las carcajadas q me has arrancado. A Pili, mi alma gemela. A Héctor, porque sin duda el mejor hallazgo de estos años ha sido encontrarte a ti. Muchísimas gracias por todo el apoyo y ánimos, por las ilusiones, y por hacer de estos últimos años los mejores de mi vida. Por tantas otras cosas, maite zaitut.

Als meus amics que sempre han estat un gran suport i ajuda, i que estan allà sempre que els necessito. Al Sisco i al Siscu, perquè sou els meus nenes i no tinc paraules per descriure el que signifiquen per mi, no sé què faria sense vosaltres. A la Moni, perquè em resulta increïble que malgrat la distància et senti tant a prop, per estar sempre allà i per compartir les meves penes i alegries, per posar seny i sentit a tot, pels consells i infinitat de coses. A la Berta, per la capacitat de riure quan no hi ha forces, pel coratge i tendresa que sempre m'has donat, per escoltar-me i recolzar-me, pels riures i per tantes coses. Al Dani i la Mar, perquè sou part de la meva família, per escoltar-me i entendre'm, per fer-me costat, fer-me evadir i sobretot riure. A Santi, porque escogerte como amigo fué uno de los mayores aciertos de mi vida, y que tú me escogieras la mayor suerte, gracias por hacerme de psicólogo estos años. A Cris, porque siempre revolucionas mi mundo y lo llenas de color y alegría. A Lidia, porque después de tantos y tantos años seguimos compartiendo nuestras vidas. A la Mireia C, perquè sens dubte conèixer-te va suposar un punt d'inflexió enorme a la meva vida i qui sóc ara t'ho dec en gran part a tu. A l'Igor, la Yopo i la Susa per les filosofades, els moments "salvem el món"; els reis, per deixar enrere el James Blunt i per tants bons moments i no tant bons. Al Dani per ser tant crític amb mi i fer-ho amb tanta gràcia. A les nenes de la carrera, la Sara, l'Anna, la Jess, la Maria i la Núria. I als italians, l'Enrico, el Paolo i el Francesco.

A la meva família, especialment al Miguel i la Mari, a la Rosalía i a la Rose & Co, i a JM pel recolzament, comprensió, per entendre el que això significava per mi. Als meus pares, que ho són tot per mi, per recolzar-me incondicionalment en tot el que faig i inexplicablement sentir-se'n orgullosos, pels consells, ànims i suport. Per tot el que he heretat d'ells, per transmetre'm les ganes de lluitar i les il·lusions per somiar, però sobretot per la lluita per fer realitat els somnis.

A la meva iaia





# RESUM

La cocaïna i l'èxtasi (MDMA, 3,4-metilendioximetamfetamina) són drogues psicoestimulants que incrementen l'activitat del sistema nerviós central i perifèric amb efectes com l'augment de l'estat d'alerta, la resistència, la productivitat, la motivació, la locomoció, el ritme cardíac i la pressió sanguínia. Ambdues drogues tenen efectes sobre l'estat d'ànim, tot induint sentiments d'eufòria i provocant plaer i recompensa. El seu consum, principalment per part d'adolescents i adults joves, té conseqüències greus per a la salut, i a la llarga el consum reiterat pot esdevenir crònic donant lloc a abús o dependència. Tant la cocaïna com l'MDMA actuen principalment activant els sistemes de neurotransmissió dopaminèrgica i serotoninèrgica en els circuits neuronals de plaer i de recompensa. La genètica juga un paper molt important en la transició del consum a l'abús i a la dependència: d'una banda totes dues drogues indueixen canvis en l'expressió gènica que estan a la base de les neuroadaptacions i del remodelatge dels circuits neuronals que condueixen al consum crònic, i de l'altra hi ha factors genètics de predisposició a la dependència que poden afavorir el desenvolupament d'aquest fenomen en certs individus.

El treball que es presenta en aquesta Tesi Doctoral ha permès identificar variacions en el genoma que predisposen a la dependència de cocaïna, així com alteracions en el transcriptoma de cèl·lules neuronals o de determinades estructures cerebrals causades per l'acció de la cocaïna o de l'MDMA. Així, s'ha estudiat la participació de variants genètiques de susceptibilitat a la dependència de cocaïna mitjançant estudis d'associació de tipus cas-control cobrint sistemes gènics sencers implicats en la neurotransmissió dopaminèrgica i serotoninèrgica, en el control de l'alliberament de neurotransmissors i factors neurotròfics i els seus receptors. També s'ha avaluat l'efecte sobre la transcripció gènica de l'exposició aguda a la cocaïna en un model neuronal dopaminèrgic. I finalment s'ha estudiat l'efecte de l'administració activa i passiva d'MDMA sobre la transcripció gènica en quatre estructures cerebrals de ratolí implicades en el fenomen de recompensa.



# ÍNDEX

---

## INTRODUCCIÓ

---

<b>1. ADDICCIÓ A DROGUES</b>	<b>3</b>
<b>1.1. DROGUES I EPIDEMIOLOGIA</b>	<b>3</b>
<b>1.2. CLASSIFICACIÓ DSM IV-TR</b>	<b>4</b>
<b>1.3. TRACTAMENT</b>	<b>5</b>
<b>1.4. NEUROBIOLOGIA DE L'ADDICCIÓ</b>	<b>7</b>
1.4.1. PLAER I RECOMPENSA: REFORÇ POSITIU	10
1.4.2. MOTIVACIÓ I IMPULS	12
1.4.3. APRENENTATGE I MEMÒRIA	12
1.4.4. PÈRDUA DE CONTROL	13
1.4.5. ESTRÈS CEREBRAL: REFORÇ NEGATIU	14
<b>2. DROGUES PSICOESTIMULANTS</b>	<b>15</b>
<b>2.1. COCAÏNA</b>	<b>16</b>
2.1.1. DADES EPIDEMIOLÒGIQUES DEL CONSUM DE COCAÏNA	16
2.1.2. CLÍNICA DEL CONSUM DE COCAÏNA	17
2.1.3. DIANES I EFECTE FARMACOLÒGIC DE LA COCAÏNA	19
2.1.4. GENÈTICA I COCAÏNA	23
2.1.4.1. Models animals genoanul·lats i transgènics en cocaïna	23
2.1.4.2. Efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica	28
2.1.4.3. Factors genètics de susceptibilitat a la dependència de cocaïna	34
2.1.4.3.1. Heretabilitat de la dependència de cocaïna	34
2.1.4.3.2. Estudis d'associació genètica amb la dependència de cocaïna	34
2.1.4.3.3. Gens candidats a participar en la susceptibilitat a la dependència de cocaïna estudiats en aquest treball	40
2.1.4.3.3.1. Factors neurotròfics	40
2.1.4.3.3.2. Control de la neurosecreció sinàptica: complex SNARE	42
<b>2.2. ÈXTASI (MDMA)</b>	<b>44</b>
2.2.1. DADES EPIDEMIOLÒGIQUES DEL CONSUM D'ÈXTASI	44
2.2.2. CLÍNICA DEL CONSUM D'ÈXTASI	45
2.2.3. DIANES I EFECTE FARMACOLÒGIC I NEUROTÒXIC DE L'MDMA	46
2.2.4. GENÈTICA I MDMA	47
2.2.4.1. Models animals genoanul·lats i transgènics en MDMA	48
2.2.4.2. Efecte de l'MDMA sobre l'expressió gènica	48
2.2.4.3. Factors de susceptibilitat genètica en l'abús d'èxtasi	49

## OBJECTIUS

---

OBJECTIUS	53
-----------	----

## RESULTATS

---

INFORME DELS DIRECTORS DE TESI	57
--------------------------------	----

<b>CAPÍTOL 1. COCAÏNA I SISTEMA DOPAMINÈRGIC, SEROTONINÈRGIC I FACTORS NEUROTRÒFICS: ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ</b>	59
---	----

ARTICLE 1. ASSOCIATION STUDY BETWEEN THE <i>DAT1</i> , <i>DBH</i> AND <i>DRD2</i> GENES AND COCAINE DEPENDENCE IN A SPANISH SAMPLE	59
--	----

ARTICLE 2. ASSOCIATION STUDY OF 37 GENES RELATED TO SEROTONIN AND DOPAMINE NEUROTRANSMISSION AND NEUROTROPHIC FACTORS IN COCAINE DEPENDENCE	69
---	----

<b>CAPÍTOL 2. COCAÏNA I NEUROSECRECIÓ SINÀPTICA: ESTUDI D'ASSOCIACIÓ</b>	109
--	-----

ARTICLE 3. CANDIDATE PATHWAY ASSOCIATION STUDY IN COCAINE DEPENDENCE: THE CONTROL OF NEUROTRANSMITTER RELEASE	109
---	-----

<b>CAPÍTOL 3. EFECTES TRANSCRIPTÒMICS DE LA COCAÏNA EN UN MODEL CEL·LULAR</b>	135
---	-----

ARTICLE 4. EFFECT OF ACUTE EXPOSURE TO COCAINE ON GENE EXPRESSION IN DIFFERENTIATED SH-SY5Y CELLS	135
---	-----

<b>CAPÍTOL 4. EFECTES TRANSCRIPTÒMICS DE L'ADMINISTRACIÓ ACTIVA I PASSIVA DE MDMA (ÈXTASI) EN UN MODEL ANIMAL</b>	155
---	-----

ARTICLE 5. ACTIVE AND PASSIVE MDMA ('ECSTASY') INTAKE INDUCES DIFFERENTIAL TRANSCRIPTIONAL CHANGES IN THE MOUSE BRAIN	155
---	-----

## DISCUSSIÓ

---

1. VARIANTS DE SUSCEPTIBILITAT A LA DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA	205
--	-----

1.1. CONSIDERACIONS SOBRE ELS ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ I LA METODOLOGIA EMPRADA	205
1.2. SISTEMA DOPAMINÈRGIC I DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA	215
1.3. SISTEMA SEROTONINÈRGIC I DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA	220
1.4. FACTORS NEUROTRÒFICS I DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA	221
1.5. CONTROL DE LA NEUROSECRECIÓ SINÀPTICA I DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA	222
1.6. ALTRES GENS ESTUDIATS PRÈVIAMENT	223
<b>2. EFECTE DE LA COCAÏNA I DE L'ÈXTASI (3,4-METILENDIOXI-METAMFETAMINA, MDMA) SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA</b>	<b>224</b>
2.1. CONSIDERACIONS SOBRE ELS ESTUDIS D'EXPRESSIÓ AMB MICROARRAYS I LA METODOLOGIA EMPRADA	224
2.2. EFECTE D'UN TRACTAMENT AGUT AMB COCAÏNA SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN CÈL·LULES SH-SY5Y DIFERENCIADES	230
2.3. EFECTE DEL CONSUM ACTIU I PASSIU D'MDMA SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN UN MODEL ANIMAL	232
<b>3. COCAÏNA I ÈXTASI: SUSCEPTIBILITAT GENÈTICA I CANVIS D'EXPRESSIÓ GÈNICA</b>	<b>238</b>
<b>4. PERSPECTIVES FUTURES EN L'ESTUDI DE LES DROGUES</b>	<b>241</b>

## **CONCLUSIONS**

---

<b>CONCLUSIONS</b>	<b>245</b>
--------------------	------------

## **BIBLIOGRAFIA**

---

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>249</b>
---------------------	------------

## **APÈNDIX**

---

ARTICLE 1. ASSOCIATION STUDY BETWEEN THE DAT1, DBH AND DRD2 GENES AND COCAINE DEPENDENCE IN A SPANISH SAMPLE (VERSIÓ DEFINITIVA DE LLA REVISTA)	283
ARTICLE 3. CANDIDATE PATHWAY ASSOCIATION STUDY IN COCAINE DEPENDENCE: THE CONTROL OF NEUROTRANSMITTER RELEASE (GALERADES)	289



## ABREVIATURES

5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina

5-HT<sub>1E</sub>: receptor de serotonina tipus 1 E

5-HT<sub>2A</sub>: receptor de serotonina tipus 2A

5-HTT: receptor de serotonina (també SERT o SLC6A4)

μl: microlitre

ACh: acetilcolina

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

cAMP: adenosina monofosfat cíclic

Ca<sup>2+</sup>: ió calci

Camk2a: proteïna cinasa II alpha dependent de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina

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

CDNF: factor neurotròfic conservat de dopamina

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

CNV: variant de número de còpies

COMT: catecol-O-metiltransferasa

CPP: preferència de lloc condicionada, *Conditioned Place Preference*

CRF: factor alliberador de la corticotropina

DA: dopamina

DAT: transportador de dopamina (també SLC6A3)

DBH: dopamina beta-hidroxilasa

Ddn: dendrina

DRD1: receptor D1 de dopamina

DRD2: receptor D2 de dopamina

DRD3: receptor D3 de dopamina

DRD4: receptor D4 de dopamina

DRD5: receptor D5 de dopamina

DSM: Diagnòstic i Estadística de l'Associació Americana de

FC: *fold change*, canvi d'expressió real

FDR: *False Discovery Rate*

GABA: àcid γ-butíric

GCOS: *GeneChip Operating Software*

GWAS: estudi d'associació a escala genòmica

HWE: equilibri Hardy-Weinberg

IEGs: Gens primerencs immediats, *immediate early genes*

indel: inserció-deleció

Kalrn: kalirina

KD: Genominvat, *gene Knock-Down*

KO: Genoanul·lat, *gene Knock-Out*

Lcn2: lipocalina  
LD: desequilibri de lligament  
LFC: *log fold change*, canvi d'expressió en base logarítmica 2  
LTP: Potenciació a llarg termini, *Long-term potentiation*  
MAF: freqüència de l'al·lel minoritari (*Minor Allele Frequency*)  
MAPK: Proteïna-cinases activades per mitògens, *mitogen activated protein kinase*  
MDA: Metamfetamina  
MDMA: 3,4-metilendioximetamfetamina, èxtasi  
MM: sonda *miss match*  
NAc: nucli accumbens  
NE: Noradrenalina o norepinefrina  
NET: transportador de noradrenalina  
NGF: factor de creixement nerviós  
NGS: tecnologies de seqüenciació massiva, *next-generation sequencing*  
NSF: N-etilmaleimida  
NTFs: Factors neurotròfics  
OMS: Organització Mundial de la Salut  
ONU: Organització de les Nacions Unides  
PET: tomografia per emissió de positrons  
PM: sonda *perfect match*  
OFC: escorça òrbitofrontal  
qRT-PCR: reacció en cadena de la polimerasa quantitativa a temps real  
RA: àcid retinoic retinoic acid  
RFLP: polimorfismes de longitud de fragments de restricció *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
RMA: *Robust Multichip Average*  
SERT: transportador de serotonina  
SHM: migranya hemiplègica esporàdica  
SLC6A3: transportador de dopamina  
SLC6A4: transportador de serotonina  
SNARE: Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor  
SNC: sistema nerviós central  
SNP: polimorfisme de un únic nucleòtid  
TDAH: Trastorn per dèficit d'atenció amb hiperactivitat  
TH: tirosina hidroxilasa  
UTR: regió no traduïda (*untranslated region*)  
UNODC: Oficina de les Nacions Unides per a les Drogues i el Crim (*United Nations Office on Drugs and Crime*)  
VTA: àrea tegmental ventral



# INTRODUCCIÓN

“Despertaba a todo esto, o, mejor, a un sueño del cual formaba parte todo esto, transformado y embellecido por el *soma* que circulaba por su sangre, y sonreía con su sonrisa quebrada y descolorida de dicha infantil.”

*Un mundo feliz, Aldous Huxley*



# 1. ADDICCIÓ A DROGUES

L'addicció a drogues és un trastorn psiquiàtric associat a comportaments maladaptatius i destructius, que consisteix en l'ús persistent, compulsiu i incontrolat d'una droga. Les drogues provoquen sensació de plaer, reforç i gratificació, mecanismes que afavoreixen la repetició del consum, i indueixen canvis adaptatius al Sistema Nerviós Central (SNC) alterant-ne la seva funció. Aquests canvis són la base de la tolerància, la pèrdua de control, l'establiment del deler o *craving* (desig incontrolat de consum de la droga), l'abstinència i els canvis emocionals i anímics que persisteixen fins molt de temps després que cesi el consum. Els canvis neurobiològics induïts pel consum de drogues es mantenen, són progressius i són responsables de la cronificació de l'addicció i de l'aparició de recaigudes.

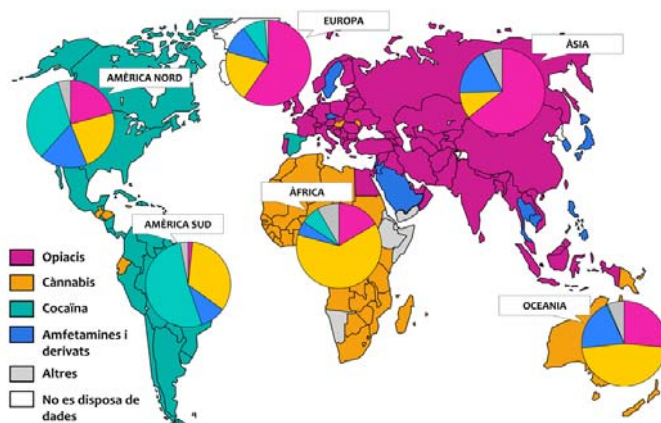
## 1.1. DROGUES I EPIDEMIOLOGIA

El consum i l'abús de drogues, a nivell individual, comporta problemes en l'entorn familiar i social del consumidor, en les relacions interpersonals i també en les laborals. A més, suposa riscos seriosos per a la salut del consumidor i pot causar-ne la mort. A nivell global, el consum de drogues és devastador per a la salut pública, i els factors narco-polítics i narco-econòmics generen desequilibris en les relacions entre països i regions.

L'any 2002 l'Organització Mundial de la Salut (OMS) va estimar que 2.000 milions de persones al món consumeixen alcohol, 1.300 milions tabac i 185 milions drogues il·legals, i que aquestes substàncies van contribuir conjuntament al 12,4% de la mortalitat l'any 2000 (3,2%, 8,8% i 0,4% respectivament). ([www.who.int/substance\\_abuse/facts/global\\_burden/en](http://www.who.int/substance_abuse/facts/global_burden/en)).

L'Oficina de les Nacions Unides per a les Drogues i el Crim (*United Nations Office on Drugs and Crime; UNODC*) va estimar que l'any 2007 entre 172 i 250 milions de persones van consumir drogues il·legals com a mínim un cop (*World Drug Report 2009, UNODC*). D'aquests, s'estima que entre 18 i 38 milions han tingut problemes greus relacionats amb les drogues i probablement hagin desenvolupat una dependència.

La droga il·legal més consumida arreu del món és el cànnabis (s'estima que



**Figura 1.** Principals problemes amb les drogues, reflexat en tractament ofert, 2007. Adaptat de *World Drug Report 2009, UNODC*.

**Taula 1.** Nombre estimat de consumidors de drogues il·legals (milions) d'entre 15 i 64 anys per regió i subregió l'any 2007. *World Drug Report 2009*, UNODC.

	<b>Cànnabis</b>	<b>Opiacis</b>	<b>Cocaïna</b>	<b>Èxtasi</b>	<b>Grup Amfetamines</b>
<b>Àfrica</b>	28,8 – 56,4	1,00 – 2,78	1,15 – 3,64	1,39 – 4,09	0,34 – 1,87
Nord	3,7 – 9,3	0,12 – 0,49	0,03 – 0,05	0,24 – 0,51	-
Oest i Central	16,1 – 27,1	0,55 – 0,65	0,75 – 1,32	-	-
Est	4,5 – 9,0	0,10 – 1,33	-	-	-
Sud	4,6 – 10,9	0,23 – 0,31	0,30 – 0,82	0,21 – 0,65	0,21 – 0,40
<b>Amèrica</b>	41,4 – 42,1	2,19 – 2,32	9,41 – 9,57	5,65 – 5,78	3,13 – 3,22
Nord	31,2 – 31,3	1,31 – 1,36	6,87 – 6,87	3,76 – 3,76	2,56 – 2,56
Central	0,5 – 0,6	0,02 – 0,03	0,12 – 0,14	0,31 – 0,31	0,02 – 0,03
Carib	1,1 – 1,7	0,06 – 0,09	0,17 – 0,25	0,12 – 0,25	0,03 – 0,13
Sud	8,5 – 8,5	0,80 – 0,8	2,25 – 2,31	1,45 – 1,46	0,51 – 0,51
<b>Àsia</b>	40,9 – 59,6	8,44 – 11,89	0,40 – 2,56	5,78 – 7,04	3,55 – 13,58
Oest i Sud-Oest	4,1 – 19,9	2,80 – 4,97	0,31 – 0,99	4,60 – 20,56	2,25 – 5,95
Sud	27,5 – 27,5	3,62 – 3,66	-	-	-
Central	1,9 – 2,0	0,34 – 0,34	-	-	-
Proper-mitjà	7,4 – 10,2	1,68 – 2,91	-	-	-
Orient					
<b>Europa</b>	28,9 – 29,7	3,44 – 4,05	4,33 – 4,60	2,43 – 3,07	3,75 – 3,96
Oest i central	20,8 – 20,9	1,23 – 1,52	3,87 – 3,88	1,59 – 1,69	2,11 – 2,12
Est i Sud-Est	8,1 – 8,7	2,21 – 2,53	0,46 – 0,72	0,84 – 1,38	1,64 – 1,83
<b>Oceania</b>	2,5 – 2,6	0,09 – 0,09	0,34 – 0,39	0,57 – 0,59	0,81 – 0,88
<b>Estimació Global</b>	142,6 – 190,3	15,2 – 21,1	15,6 – 20,8	15,8 – 50,6	11,6 – 23,5

hi ha entre 142 i 190 milions de consumidors; Taula 1), seguida de la cocaïna a Amèrica (9,4 - 9,6 milions) i Europa (4,3 - 4,6 milions) i els opiacis a Àsia (8,4 - 11,9 milions).

Les drogues que es consumeixen i, per tant, els problemes sanitaris relacionats amb aquest consum són diferents arreu del món (Fig. 1). La droga de consum primari més tractada a Amèrica i Espanya és la cocaïna (34% Amèrica del Nord, 52% Amèrica del Sud i 46,9% Espanya); a Europa i Àsia són els opiacis (60% i 65%, respectivament) i el cànnabis a Àfrica i Oceania (63% i 47%, respectivament) (Fig. 1).

## 1.2. CLASSIFICACIÓ DSM IV-TR

El consum ocasional però limitat d'una droga d'abús és clínicament diferent del consum creixent de la droga, pèrdua de control de la limitació del consum i l'aparició de la cerca compulsiva de la droga que caracteritza l'addicció (Koob & Volkow, 2010). El diagnòstic diferencial entre consum ocasional, abús i dependència es fa en base als criteris que dicta el Manual de Diagnòstic i Estadística de l'Associació Americana de Medicina (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; DSM). El DSM conté una classificació dels trastorns mentals i proporciona descripcions clares de les categories diagnòstiques. La versió vigent revisada és la quarta

(DSM IV-TR). Com a trastorns per consum de substàncies el DSM IV-TR distingeix entre abús i dependència (Taula 2). La dependència, altrament coneguda com a addicció, es defineix com la patologia que compleix 3 de 7 criteris, entre els quals trobem per exemple la tolerància i l'abstinència. Ambdós criteris indiquen adaptació neurològica també anomenada dependència fisiològica.

**Taula 2.** Criteris diagnòstics per a la dependència i abús d'una substància segons el DSMIV-TR.

#### CRITERIS PER A LA DEPENDÈNCIA

Tres o més dels següents ítems durant 12 mesos

1. Tolerància:
  - a. Necessitat d'incrementar el consum per obtenir l'efecte desitjat.
  - b. L'efecte de la droga disminueix amb el seu consum continuat.
2. Abstinència:
  - a. La síndrome d'abstinència característica per a la substància.
  - b. Es consumeix per alleujar o evitar els símptomes d'abstinència.
3. Es consumeix en quantitats majors o durant un període més llarg del que inicialment es pretenia.
4. Desig persistent o esforços infructuosos per controlar-ne o interrompre'n el consum.
5. S'empra molt de temps en activitats relacionades amb l'obtenció, el consum o en la recuperació dels efectes de la substància.
6. Reducció d'activitats socials, laborals o creatives importants a causa del consum.
7. Se segueix consumint la substància tot i tenir consciència de problemes psicològics o físics persistents causats o exacerbats pel seu consum.

#### CRITERIS PER A L'ABÚS

Un o més dels següents ítems durant 12 mesos sempre i quan els símptomes no hagin complert mai criteris per a la dependència:

1. Consum recurrent que dóna lloc a l'incompliment d'obligacions a la feina, escola o casa.
2. Consum recurrent en situacions en què fer-ho és físicament perillós.
3. Problemes legals relacionats amb la substància.
4. Consum continuat tot i tenir problemes socials continus i recurrents o problemes interpersonals causats o exacerbats pels efectes de la substància.

## 1.3. TRACTAMENT

Donat que el consum de qualsevol droga es una acció voluntària, el comportament en relació al control i a la força de voluntat són importants en l'aparició de la dependència. És per aquesta raó que es culpabilitza als individus addictes de desenvolupar un trastorn de dependència, quan en realitat s'hauria de considerar una malaltia (McLellan *et al.*, 2000). Fins i tot, en alguns casos, el tractament per a les addiccions és vist com innecessari o ineficaç (Dackis & O'Brien, 2005). S'ha estimat que entre els individus que desenvolupen dependència d'una droga, vora el 40% es recuperen sense tractament de drogodependència (Cunningham, 2000).

Les intervencions farmacològiques dirigides a evitar el consum s'agrupen en dues classes:

en primer lloc, aquelles que interfereixen amb els efectes reforçants de la droga d'abús (medicaments que interfereixen amb la unió de la droga a la seva diana, la resposta recompensant o l'accés de la droga al cervell, o aquells que provoquen respostes aversives); i, en segon lloc, aquelles que compensen les adaptacions (medicaments que disminueixen la motivació, augmenten el valor de les recompenses naturals, interfereixen amb respostes condicionades, amb l'abstinència física o amb la recaiguda induïda per estrès) (Volkow & Li, 2004). La utilitat d'alguns medicaments contra l'addicció a drogues s'ha validat i aprovat, mentre que d'altres estan encara en fase experimental. La Taula 3 resumeix els medicaments aprovats o en fase experimental. La majoria d'aquests prometedors fàrmacs tenen com a diana diferents neurotransmissors (com àcid gamma-aminobutíric o GABA, cannabinoides o glutamat) i ofereixen un rang més ampli d'opcions terapèutiques que els antics (Volkow & Li, 2004).

**Taula 3.** Medicaments per al tractament de l'addicció a drogues i alcohol (Volkow & Li, 2004).

Diana clínica	Medicament	Diana biològica
<b>Alcoholisme</b>		
Aprovat	Disulfiram (Antabuse) Naltrexone	Aldehid deshidrogenasa (provoca resposta aversiva) Receptor opioide Mu (antagonista: interfereix amb el reforç)
En investigació	Acamprosat	Relacionat amb glutamat
	Topiramamat (Topamax)	GABA/Glutamat
	Valproat	GABA/Glutamat
	Ondansetron	Receptor 5-HT <sub>3</sub> receptor
	Nalmefene	Receptor opioide Mu (antagonista)
	Baclofen (Lioresal)	Receptor GABAB (agonista)
En investigació	Pyrrolopyrimidina compost (Antalarmina)	Receptor CRF1 (inhibeix resposta a estrès)
	Rimonabant (Acomplia)	Receptor CB1 (antagonista)
<b>Addicció a nicotina</b>		
Aprovat	Substitut de la nicotina	Receptor nicotínic (substitut amb farmacocinètica diferent)
En investigació	Bupropió	Bloqueja transportador DA (amplifica senyal DA)
	Deprenyl	Inhibidor MAO-B (inhibeix metabolisme DA)
	Rimonabant (Acomplia)	Receptor CB1 (antagonista)
	Methoxsalen	CYP2A6 (inhibeix metabolisme nicotina)
	Conjugat vacuna nicotina (NicVax)	Bloqueja entrada al cervell
<b>Addicció a heroïna/opiacis</b>		
Aprovat	Naltrexona Metadona	Receptor opioide Mu (antagonista) Receptor opioide Mu (substitut amb farmacocinètica diferent)
	Buprenorfina	Receptor opioide Mu (substitut)
<b>Addicció a cocaïna</b>		
En investigació	Topiramamat (Topamax)	GABA (agonista)
	g-vinyl GABA (GVG) (Sabril)	GABA transaminasa (inhibeix metabolisme GABA)
	Gabapentina (Neurontin)	GABA/Glutamat (síntesi)
	Tiagabine (Gabitril)	Transportador GABA (inhibidor)
	Baclofen (Lioresal)	Receptor GABA <sub>B</sub> (agonista)
	Modafinil	Glutamat (?)
	Disulfiram (Antabuse)	Desconegut per a la cocaïna
	Vacuna cocaïna (TA-CD)	Bloqueja l'entrada al cervell

\*No s'han inclòs medicaments per a l'abstinència física. DA, dopamina; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; receptor GABA<sub>B</sub>, GABA tipus B; 5-HT<sub>3</sub>, receptor de 5-hydroxytryptamina (serotonina) subtipus 3; MAO-B, monoamina oxidasa B; receptor CB1, receptor cannabinoide de tipus 1; CYP2A6, citocrom P450, família 2, subfamília A, polipèptid 6.

## 1.4. NEUROBIOLOGIA DE L'ADDICCIÓ

Inicialment l'estudi de la neurobiologia de l'addicció a drogues es va centrar en l'impacte agut de les drogues d'abús, comparant el consum de la droga amb l'absència de consum. No obstant, actualment els estudis se centren en l'administració crònica i els canvis neuroadaptatius aguts i a llarg termini al cervell que provoquen la recaiguda. El propòsit de la recerca actual sobre la neurobiologia de les drogues d'abús és entendre els mecanismes genètics/epigenètics, cel·lulars i moleculars implicats en la transició del consum ocasional i controlat fins a la pèrdua del control sobre la cerca i consum de la droga i la recaiguda crònica fins i tot després d'una abstinència perllongada que emmarquen l'addicció (Koob & Volkow, 2010).

L'addicció a drogues combina aspectes tant de trastorns de control impulsiu com de trastorns compulsius, i aquests estan estretament relacionats amb el reforç positiu negatiu pel consum de drogues (Caixa 1). Tant la impulsivitat com la compulsivitat són el reflex de la motivació creixent per la cerca de droga i dels símptomes de dependència. Els cicles d'impulsivitat i compulsivitat donen lloc a un cicle addictiu complex en què la impulsivitat acostuma dominar en les fases primerenques i la compulsivitat en les tardanes (Fig. 2). Donat que l'individu es mou des de la impulsivitat a la compulsivitat, hi ha una transició des del reforç positiu cap al reforç negatiu (Koob, 2004), i les diferents etapes per les quals passa un individu interactuen entre elles i es van magnificant, donant lloc al final a l'estat patològic conegut com a addicció (Koob & Le Moal, 1997). Les diferents drogues produeixen patrons diferents d'addicció amb èmfasi en determinats components del cicle de l'addicció (Koob, 2008). Les drogues afecten directa o indirectament a diferents àrees del SNC provocant plaer, recompensa i gratificació, però també pèrdua de control, tolerància, sensibilització, deler, abstinència, estrès cerebral i recaiguda

### Caixa 1. Definicions

#### Impulsivitat:

Comportament definit per la predisposició a decisions ràpides i no planificades en resposta a estímuls interns o externs sense tenir en compte les conseqüències negatives envers l'individu o els altres (Moeller *et al.*, 2001). Es mesura en dos aspectes: escollir una recompensa immediata menor en comptes d'una recompensa més gran i retardada (Rachlin & Green, 1972) o la incapacitat d'inhibir un comportament canviant el transcurs de l'acció o aturant una resposta un cop iniciada (Logan *et al.*, 1997).

#### Compulsivitat:

Comportament que resulta en la perseveració en la resposta tot i les conseqüències adverses, en afrontar respostes incorrectes en eleccions o reiniciació persistent d'actes habituals (Everitt & Robbins, 2005).

#### Reforç positiu:

Procés pel qual la presentació d'un estímulo, normalment plaent, augmenta la probabilitat de resposta.

#### Reforç negatiu:

Definit com el procés en què retirar l'estímul aversiu incrementa la probabilitat de resposta.

#### Tolerància:

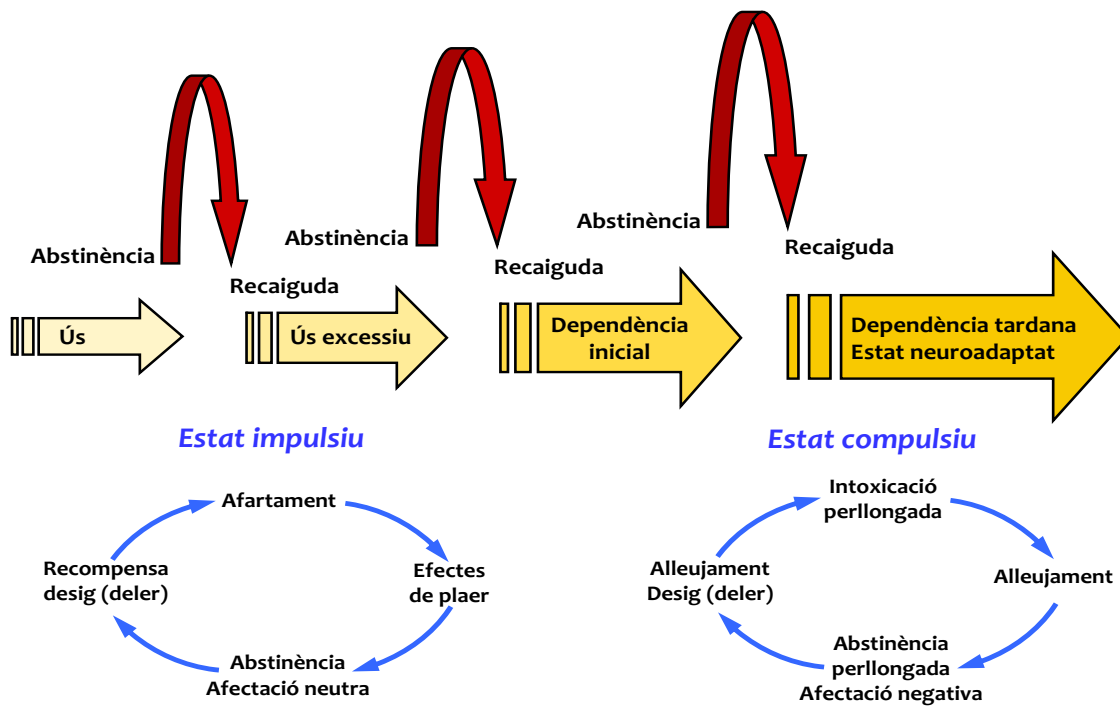
Disminució progressiva dels efectes de la droga després d'administracions repetides. S'ha d'incrementar la dosi per tal d'obtenir el mateix efecte.

#### Sensibilització:

Els efectes de la droga augmenten després d'administracions repetides.

#### Síndrome d'abstinència:

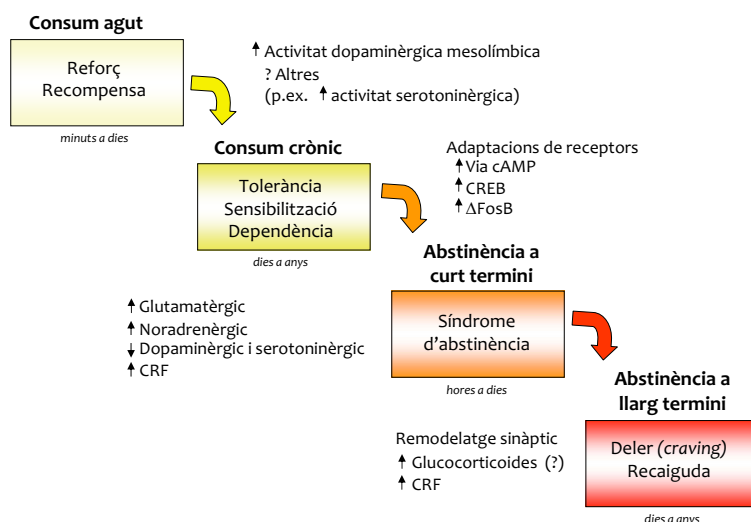
Símptomes deguts a l'expressió compensatòria després de repetides administracions d'una droga i la interrupció brusca del consum.



**Figura 2.** Esquema de la progressió de la dependència a l'alcohol en el temps, il·lustrant el canvi subjacent als mecanismes motivacionals. Des del reforç inicial positiu i plaent dels efectes de la droga, el procés addictiu progressa cap a un reforç negatiu mantingut i d'alleujament fins a un estat emocional negatiu. Adaptat de Koob, 2009.

(Caixa 1). A mesura que el consum va esdevenint crònic es produeixen de forma gradual una sèrie d'adaptacions moleculars i cel·lulars per tal de compensar l'efecte de la droga i un cop s'assoleix la dependència de la droga, quan s'interromp el consum es desregulen la majoria de sistemes de neurotransmissió (Caixa 2),

l'activitat dels quals estava adaptada al consum crònic de la droga, donant lloc als símptomes de la síndrome d'abstinència (Fig. 3). Els canvis produïts pel consum de la droga i el remodelatge sinàptic persisteixen fins i tot després de llargs períodes d'abstinència i segueixen provocant desig de consum en resposta a determinades senyals associades a la droga que poden donar lloc a la recaiguda en el consum (Fig. 4; Koob & Le Moal, 2001).



**Figura 3.** Cicle de l'addicció i efectes dependents de la durada de l'exposició a drogues. Als quadres es mostren els processos més importants associats a cada estadi, i al costat els mecanismes moleculars i cel·lulars implicats. CRF, corticotrophin releasing factor; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CREB, cAMP response element-binding; ΔFosB, osteosarcoma viral oncogene homologue B delta variant. Adaptat de Nestler & Aghajanian, 1997.



## Caixa 2. Principals sistemes de neurotransmissió i moduladors del sistema nerviós central

### Sistema glutamatèrgic:

El glutamat és el neurotransmissor excitatori més abundant al sistema nerviós. El sistema glutamatèrgic juga un paper important en la plasticitat sinàptica i està implicat en funcions cognitives com l'aprenentatge i la memòria.

### Sistema GABAèrgic:

L'àcid gamma-aminobutíric (GABA) és el principal neurotransmissor inhibitori del SNC. El sistema GABAèrgic juga un paper important en la regulació de l'excitabilitat neuronal.

### Sistema serotoninèrgic:

La serotonina (5-HT) és un neurotransmissor monoaminèrgic. El sistema serotoninèrgic juga un paper essencial en l'activitat motora, la conducta alimentària i sexual, l'humor, la son, la termoregulació i les activitats respiratòries i cardiovasculars.

### Sistema dopaminèrgic:

La dopamina (DA) és també un neurotransmissor monoaminèrgic. El sistema dopaminèrgic té un paper fonamental en el control motor, la regulació d'emocions, la cognició, la conducta, la motivació i la recompensa.

### Sistema noradrenèrgic:

La noradrenalina o norepinefrina (NE) funciona com a neurotransmissor i com a hormona. El sistema noradrenèrgic està implicat en l'alerta, l'excitació i el despertar, i influeix en el sistema de recompensa. Té un paper important en el sistema nerviós simpàtic.

### Sistema colinèrgic:

L'acetilcolina (ACh) és un neurotransmissor que actua tant a al SNC com al sistema nerviós perifèric (SNP). Al SNP l'ACh actua activant els músculs i és el neurotransmissor més important del sistema nerviós autònom. Al SNC l'ACh causa accions anti-excitatòries i actua com a neuromodulador de la plasticitat sinàptica, l'aprenentatge i la memòria a curt termini, l'excitació i el despertar i la recompensa.

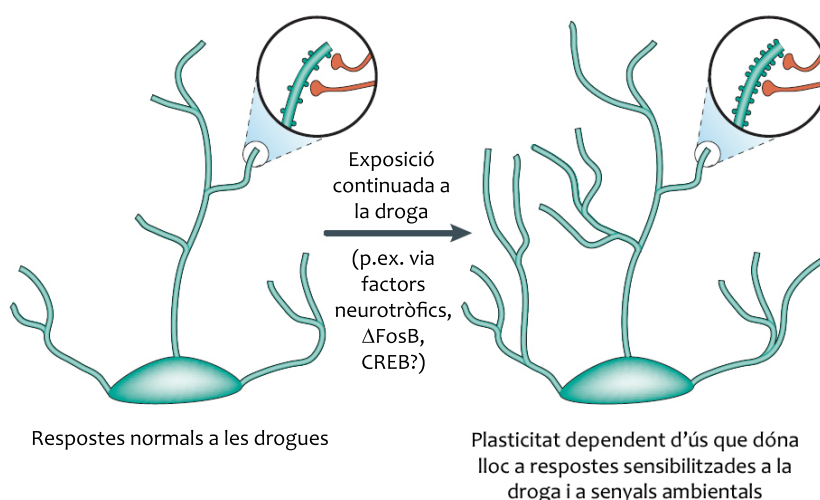
### Sistema endocannabinoide:

Està compost per un grup de lípids neuromoduladors i els seus receptors que estan implicats en diversos processos fisiològics com la gana, la sensació de dolor, l'estat d'ànim i la memòria. El cànnabis actua sobre els seus receptors.

### Sistema opioide:

Està format pels pèptids opioides endògens (o endorfines) i els seus receptors. Juga un paper crític en la modulació d'un gran nombre de funcions sensorials, motivacionals, emocionals i cognitives, i regula la resposta al dolor. Els opiàtics actuen a través dels seus receptors.

**Figura 4.** Regulació de l'estructura dendrítica per part de les drogues d'abús. Es mostra l'expansió de l'arbre dendrític d'una neurona exposada a una droga d'abús, com s'ha observat al nucli acumbens (NAc) i a l'escorça prefrontal després de l'administració de cocaïna o psicoestimulants relacionats. Les zones ampliades mostren un increment del nombre d'espines dendrítiques, que es postula que coincideixen amb l'activació de terminals nervioses. Aquestes alteracions de les espines dendrítiques, que són similars a les observades en alguns models d'aprenentatge, podrien intervenir en les respostes sensibilitzades a llarg termini a les drogues d'abús o a senyals ambientals. Adaptada de Nestler, 2001.



Entre les estructures i circuits cerebrals específics implicats en les diferents etapes del cicle addictiu trobem el sistema mesolímbic, l'amígdala, l'hipocamp i l'escorça orbitofrontal i prefrontal entre d'altres, que són els responsables del plaer i la recompensa, la motivació i l'impuls, l'aprenentatge i memòria associats al consum, el control inhibitori i l'estrès cerebral (Caixa 3). El patró d'activitat entre aquests circuits té influència sobre la realització d'eleccions entre comportaments alternatius per part de l'individu que poden dur a la dependència.

### **Caixa 3. Principals regions cerebrals implicades en el consum, abús i dependència de drogues.**

#### Àrea tegmental ventral (VTA):

Grup de neurones localitzades al mesencèfal (als ganglis basals), origen del sistema dopaminèrgic mesocorticolímbic. Està implicada en el plaer, recompensa, cognició i motivació.

#### Nucli estriat:

Regió subcortical del prosencèfal. Es divideix en dues subdivisions anatòmiques (dorsal i ventral):

- El nucli estriat dorsal està format pel nucli caudat i el putamen (situat als ganglis basals). El nucli caudat està implicat en l'aprenentatge i memòria i el putamen regula el moviment i també està implicat en l'aprenentatge.
- El nucli estriat ventral està format pel nucli accumbens (localitzat als ganglis basals) i el tubercle olfatori. El nucli accumbens està implicat en la recompensa, plaer, riure, agressió i la por.

#### Hipocamp:

Estructura situada al lòbul temporal medial que té un paper molt important en la formació dels records i la memòria (episòdica o autobiogràfica, però no procedimental), així com també en l'orientació i la memòria espacial.

#### Amígdala:

Està situada als lòbul temporal medial i té un paper molt important en el processament i memòria de les reaccions emocionals. També modula la consolidació de 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 moderació del comportament social correcte. L'escorça orbitofrontal és una regió de l'escorça prefrontal situada just darrere de les òrbites oculars que està implicada en el processament cognitiu de la presa de decisions, i també juga un paper important en la recompensa i emocions.

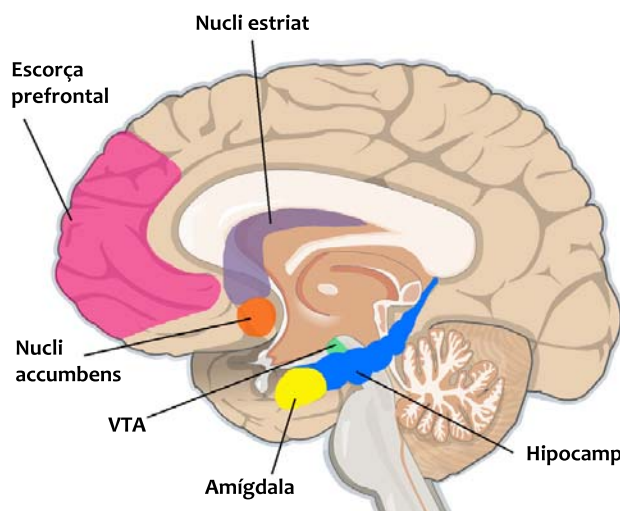
#### Nuclis de rafe:

Nuclis formats per grups de neurones serotoninèrgiques que estan situats formant una columna al tronc encefàlic. Estan implicats en la detecció i posterior resposta a estímuls externs i estan relacionats amb el son i la vigília. Són l'origen de totes vies de senyalització serotoninèrgiques que innerven regions corticals i subcorticals, el cerebel i la medulla espinal. El nucli dorsal del rafe és el nucli més gran i els seus axons projecten a l'amígdala, el nucli caudat i el putamen i el bulb olfatori.

## **1.4.1. Plaer i recompensa: reforç positiu**

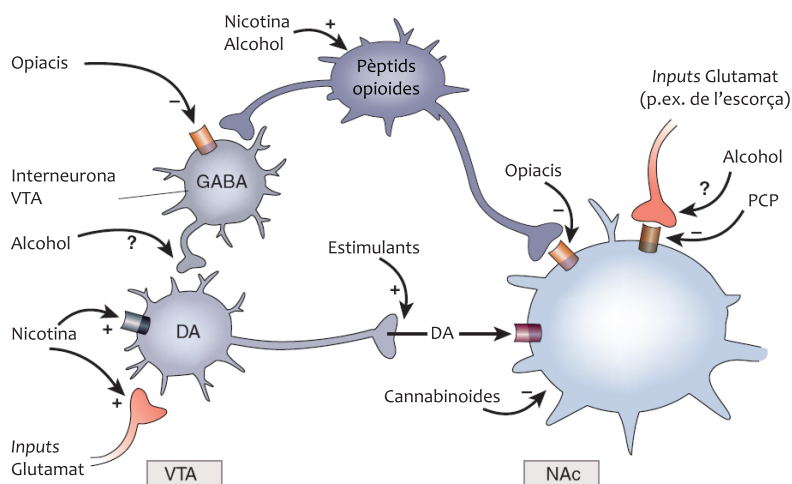
Hi ha nombroses evidències que totes les drogues d'abús convergeixen en un circuit cerebral del sistema límbic (Koob & Le Moal, 2001; Nestler, 2001; Di Chiara et al., 2004; Volkow et al., 2004; Wise, 2004), anomenat sistema de recompensa. Aquest circuit mesolímbic està format

per cossos de neurones dopaminèrgiques situats a l'àrea tegmental ventral (*Ventral Tegmental Area*, VTA) del cervell mitjà que projecten els seus axons principalment cap al nucli accumbens (NAc), al nucli estriat ventral, l'amígdala, l'hipocamp i l'escorça prefrontal (Fig. 5; Gardner, 1997). L'experiència de recompensa associada al consum de drogues va acompanyada de l'activitat d'aquest circuit dopaminèrgic mesolímbic, induint sentiments subjectius de plaer i emocions positives. Les recompenses actuen com a reforçants positius tot augmentant la freqüència i la intensitat del comportament que provoca la recompensa, així com mantenint aquest comportament après evitant que desaparegui (Pavlov, 1927). Un clar exemple d'aquest sistema de plaer i recompensa són les recompenses naturals, com el menjar, el beure i el sexe, que augmenten les concentracions extracel·lulars de dopamina (DA) mesolímbica, tot activant el sistema de recompensa i reforçant aquests comportaments essencials per a la supervivència de l'individu i de l'espècie (Schultz *et al.*, 2000).



**Figura 5.** Esquema de SNC humà amb les principals àrees implicades en el sistema de recompensa. VTA, àrea tegmental ventral.

S'ha descrit com les diferents drogues, tot i els seus diferents mecanismes d'acció, convergeixen a la via VTA i NAc amb efectes funcionals aguts comuns (Nestler, 2005; Fig. 6).



**Figura 6.** Esquema simplificat de les accions convergents agudes de les drogues d'abús sobre la via dopaminèrgica VTA-NAc. Les drogues psicoestimulants augmenten directament la transmissió dopaminèrgica al NAc. Els opiacis també ho fan de manera indirecta: inhibeixen les interneurons gabaèrgiques al VTA, que desinhibeix les neurones dopaminèrgiques del VTA. Els opiacis també actuen sobre els receptors opioïdes a les neurones del NAc. Les accions d'altres drogues són menys conegudes. Sembla ser que la nicotina activa

les neurones dopaminèrgiques del VTA estimulants directament els receptors nicotínics d'aquestes neurones i estimulants indirectament aquests receptors a les terminals glutamatergiques que innerven les neurones dopaminèrgiques. L'alcohol, activant la funció dels receptors de GABA, inhibeix les terminals gabaèrgiques al VTA i en desinhibeix les neurones. També inhibeix les terminals glutamatergiques que innerven les neurones del NAc. Els mecanismes del cannabis impliquen l'activació dels receptors cannabinoïdes CB1 a les terminals GABAèrgiques i glutamatergiques al NAc, i sobre les mateixes neurones del NAc. PCP, penicilidina. Adaptada de Nestler, 2005.

Les drogues activen de manera directa o indirecta l'activitat dopaminèrgica al NAc: els psicoestimulants actuen directament sobre les terminals dopaminèrgiques tot augmentant la concentració de DA, i els opiacis i els cannabinoides actuen sobre els sistemes opioide i cannabinoides endògens, respectivament, que activen la via VTA-NAc (Dani *et al.*, 2001; Koob & Le Moal, 2001; Nestler, 2001; Boehm *et al.*, 2004; Di Chiara *et al.*, 2004; Howlett *et al.*, 2004; Volkow *et al.*, 2004; Wise, 2004).

L'efecte de reforç que provoquen les drogues d'abús estan mediades per l'activació dels sistemes dopaminèrgic, serotoninèrgic, GABAèrgic i opioide, ja siguin per acció directa al prosencèfal basal (NAc i amígdala), o bé per acció indirecta a sobre la VTA (Koob, 1992; Koob & Le Moal, 2001; Nestler, 2005; Koob, 2006).

### 1.4.2. Motivació i impuls

Durant l'addicció, la droga actua com un reforçant molt més potent que qualsevol reforçant natural i aquests últims ja no poden competir com a elecció alternativa viable, de manera que la preferència per la droga esdevé fixa (Di Chiara, 2002). Una àrea del cervell implicada en canviar els valors relatius dels reforçants és l'escorça òrbitofrontal (*Orbitofrontal cortex*, OFC) (Rolls, 2000; Schultz *et al.*, 2000). Els estudis de neuroimatge han posat de manifest la disrupció de l'OFC durant els fenòmens d'addicció (revisat per Volkow & Fowler, 2000). L'OFC s'activa en els individus addictes amb el consum de la droga i amb els senyals associats, però no s'activa en aquells no addictes, i el nivell d'activació prediu la intensitat del desig de consum induït per la droga (Volkow *et al.*, 1999; Volkow & Fowler, 2000; Brody *et al.*, 2002). Durant l'abstinència, els individus addictes mostren una hipoactivitat de l'OFC i es postula que una nova exposició a la droga o als senyals associats provoquen la seva reactivació donant lloc a un intens desig de consum que freqüentment porta al consum compulsiu de la droga i a la recaiguda (Volkow *et al.*, 1992; Volkow *et al.*, 2003).

### 1.4.3. Aprenentatge i memòria

La rellevància de l'aprenentatge i la memòria en el procés d'addicció es fa evident quan l'efecte pernicios d'un lloc, una persona o una senyal porten records de la droga a un individu addicte que intenta desintoxicar-se. Aquests factors desencadenen un intens desig de consum i freqüentment acaben amb la recaiguda de l'individu. Pel que fa a l'addicció, s'han proposat que diverses estructures cerebrals podrien estar implicades en la memòria: el NAc i l'amígdala en l'aprenentatge incentiu-condicionat, el nucli caudat i putamen en l'adquisició d'hàbits i l'hipocamp en la memòria declarativa (és a dir, la memòria explícita, de coneixements sobre el món i les experiències viscudes, per contraposició a la memòria implícita o procedimental, que es refereix a habilitats o pautes d'actuació) (White, 1996). A través de l'aprenentatge incentiu-condicionat, els estímuls neutrals associats a la droga d'abús adquireixen propietats reforçants

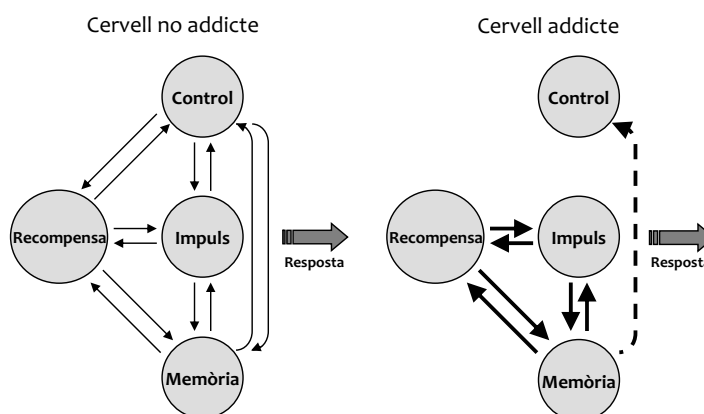
i preferència motivacional fins i tot en absència de la droga. A través de l'aprenentatge d'hàbits, les seqüències comportamentals apreses es posen en marxa de forma automàtica a partir de l'estímul apropiat. Finalment, la memòria declarativa està relacionada amb l'aprenentatge dels estats afectius relacionats amb el consum de la droga (Volkow *et al.*, 2003). Així, mitjançant l'aprenentatge incentiu-condicionat d'hàbits i la memòria declarativa, qualsevol estímul associat a la droga, el context del consum i els records, provoquen per si sols la motivació per la droga i el desig de consum.

Els circuits de la memòria estan influenciats pels efectes de la droga durant la intoxicació, ja que estableixen l'expectació de l'efecte de la droga en els individus addictes (Kirk *et al.*, 1998). S'ha descrit que durant la intoxicació per la droga i durant el desig incontrolat per l'exposició a drogues o senyals relacionats s'activen regions implicades en la memòria (Grant *et al.*, 1996; Breiter *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 1998; Childress *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999; Kilts *et al.*, 2001). S'ha vist que l'exposició a drogues altera comportaments apresos via les regions prefrontals, l'amígdala i el nucli estriat en rates (Wyvell & Berridge, 2001; Schoenbaum & Setlow, 2005; Nelson & Killcross, 2006; Simon & Setlow, 2006), i altera la manera com les neurones d'aquestes àrees processen la informació apresada (Homayoun & Moghaddam, 2006; Stalnaker *et al.*, 2006). A més, en humans i en models animals s'han observat alteracions dopaminèrgiques en el nucli estriat dorsal, una regió associada a l'aprenentatge d'hàbits, tot indicant que la rutina associada amb el consum de droga està provocada automàticament per l'exposició a la droga o senyals relacionats (Volkow *et al.*, 1997b; Letchworth *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002).

#### 1.4.4. Pèrdua de control

El control inhibitori és una funció cognitiva de regulació que implica la inhibició intencionada d'una resposta predominant conforme a senyals contextuals canviants. Deficiències en el control inhibitori contribueixen a l'abús de substàncies, ja que els individus amb conductes o trets de personalitat impulsius tenen més tendència a consumir drogues. Una de les troballes més consistents dels estudis de neuroimatge són les anomalies a l'escorça prefrontal, incloent l'escorça cingulada anterior, en els subjectes addictes a drogues (Goldstein & Volkow, 2002). L'escorça prefrontal està implicada en la presa de decisions i en el control inhibitori (Volkow

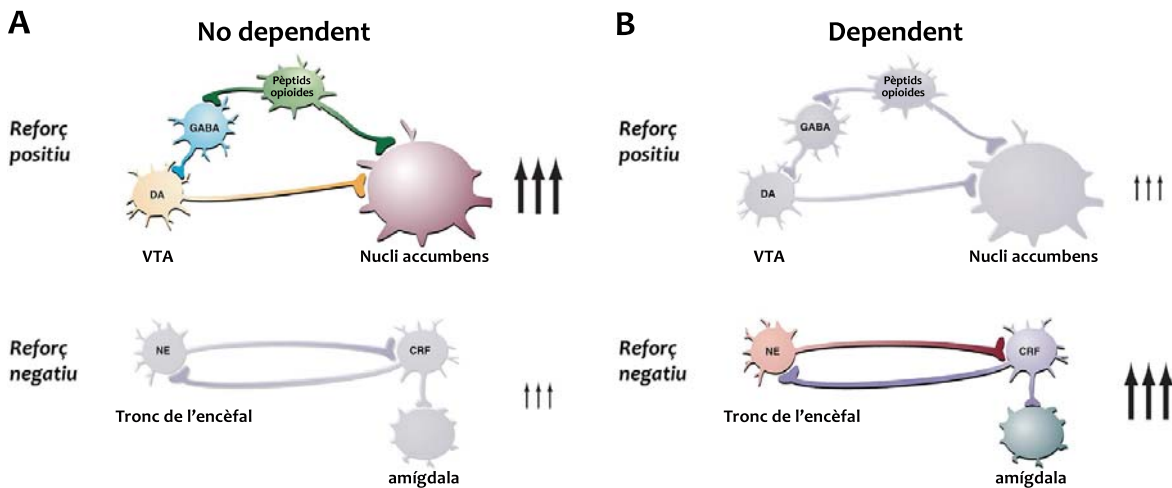
**Figura 7.** Model de xarxa de quatre circuits implicats en l'addicció: recompensa, motivació/impuls, memòria i control. Durant l'addicció s'incrementa el valor de la droga als circuits de recompensa, motivació i aprenentatge i aquesta supera el control inhibitori exercit per l'escorça prefrontal, afavorint així la retroalimentació positiva iniciada pel consum de la droga i la perpetuació de l'augment de l'activació dels circuits de motivació/impuls i memòria. Adaptat de Volkow *et al.*, 2003.



et al., 2001). La seva disrupció podria donar lloc a decisions inadequades que afavoreixen recompenses immediates davant d'altres a llarg termini o respostes més favorables (Fig. 7). També podria explicar el control deficient sobre el consum de drogues fins i tot quan el subjecte addicte expressa el desig de deixar de consumir (Goldstein & Volkow, 2002). Estudis preclínics mostren que l'administració crònica de cocaïna o amfetamina provoca un increment significatiu de les ramificacions dendrítiques i de la densitat d'espines dendrítiques a l'escorça prefrontal (Robinson et al., 2001).

### 1.4.5. Estrès cerebral: reforç negatiu

El consum crònic d'una droga va acompanyada d'una pertorbació crònica de l'homeostasi de la recompensa cerebral, fent que els llinars per la recompensa augmentin progressivament i es donin neuroadaptacions en els sistemes de neurotransmissió per tal de mantenir l'homeostasi. Com s'ha esmentat anteriorment amb el consum crònic, es passa d'un reforç positiu a un reforç negatiu, en el que durant la síndrome d'abstinència es crea estrès cerebral degut a la desregulació de la homeostasi, provocant l'activació del factor alliberador de la corticotropina (*Corticotropin-releasing factor*, CRF) a l'amígdala (Fig. 8) Aquesta activació dóna lloc a un estat aversiu i d'ansietat mediat també per altres sistemes com el noradrenèrgics, i s'ha vist que els antagonistes del CRF bloquegen aquests efectes aversius (Koob & Volkow, 2010).



**Figura 8.** Neurocircuit associat als efectes aguts positius de reforç de les drogues d'abús i el reforç negatiu de la dependència i com es produeix la transició de A) l'estat no dependent de la droga a B) l'estat dependent del consum de la droga. En el reforç positiu s'activen la via VTA-NAc mitjançant les neurones dopaminèrgiques, gabaèrgiques i opioides. En el reforç negatiu s'activa el circuit de l'amígdala en què les neurones noradrenèrgiques i les alliberadores de CRF convergeixen a les interneurons GABA, les quals juguen un paper important en l'estrès cerebral. Adaptada de Koob & Le Moal, 2008.

## 2. DROGUES PSICOESTIMULANTS

Els psicoestimulants són substàncies capaces de reduir els llindars de l'alerta o de la vigília, de manera que l'individu respon amb més facilitat o rapidesa als estímuls exògens o endògens. Els efectes subjectius de tots els psicoestimulants depenen de la personalitat de l'individu, el lloc on s'administren, la dosi i la via d'administració. La rellevància de l'addicció a psicoestimulants es posa de manifest en l'informe de l'Organització de les Nacions Unides (ONU) de 2005 sobre el consum de drogues, que estima que hi ha uns 200 milions d'addictes al món, dels quals 52 milions són addictes a psicoestimulants (Fernández-Espejo, 2006).

Hi ha diversos tipus de psicoestimulants, que es classifiquen en tres grans famílies: amfetamínics, alcaloides naturals i metilxantines (Taula 4). Tant l'amfetamina com la cocaïna provoquen efectes similars sobre l'estat d'ànim, causen toxicitat crònica i tenen un elevat potencial d'abús i dependència, mentre que les metilxantines són energitzants amb menor risc d'abús (Fernández-Espejo, 2006).

**Taula 4.** Drogues psicoestimulants.

Amfetamina i anàlegs	Alcaloides naturals	Metilxantines
Dextroamfetamina Metamfetamina (MDA) Metilendioximetamfetamina (MDMA) Fenmetracina Fendimetracina Metilfenidat Fentermina Pemolina	Cocaïna Tropacocaïna Nicotina	Teobromina Teofilina Cafeïna Teïna

### Sensibilització i tolerància

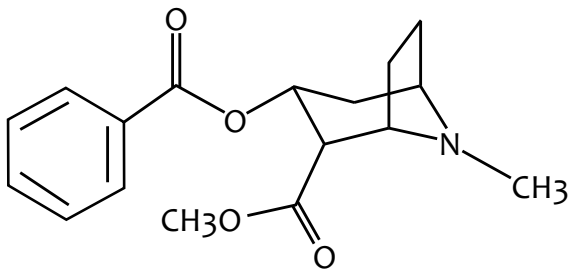
La sensibilització es dona amb tots els psicoestimulants, i és causada en gran mesura per la hiperfunció dopaminèrgica corticolímbica induïda pel consum dels psicoestimulants. Els primers canvis que apareixen són de tipus ansiós o depressiu, amb confusió, agressivitat i pèrdua d'interès per la majoria de les activitats. En ocasions poden aparèixer psicosis tòxiques, amb al·lucinacions visuals, tàctils i il·lusions paranoides.

L'exposició repetida a psicoestimulants indueix un augment progressiu de l'activitat motora. Aquest fenomen s'anomena sensibilització comportamental, i s'associa a canvis plàstics en circuits nerviosos que, d'altra banda, incrementen el valor motivacional de les drogues i participen en el fenomen de desig incontrolat (*delcr*) un cop s'abandona el consum (Robinson & Berridge, 1993; Carlezon *et al.*, 1997; Nestler & Aghajanian, 1997; Robinson & Berridge, 2000).

La majoria de consumidors de psicoestimulant presenten tolerància, i necessiten dosis més elevades per obtenir els mateixos efectes subjectius. Es desenvolupa tolerància a alguns dels efectes centrals com l'eufòria i l'anorèxia, i aquesta és deguda probablement a un increment en l'excreció de la droga i a fenòmens neuroquímics adaptatius al SNC. Hi ha tolerància creuada entre psicoestimulants.

## 2.1. COCAÏNA

La cocaïna o metilèster de benzoilecgonina (Fig. 9), és un alcaloide que s'extreu de les fulles de dos arbustos cultivats a les regions tropicals dels Andes, *Erythroxylum coca lam* i *Erythroxylum novogranatense*, i que habitualment eren consumides per les civilitzacions preinques. Els indis andins mastegaven les fulles de coca amb la finalitat de disminuir les sensacions de fam i fatiga (Fernández-Espejo, 2006). La fulla de coca es va començar a importar a Europa a partir del 1580 i el seu principi actiu va ser aïllat l'any 1860 per Wöhler. L'any 1862 els laboratoris Merck d'Alemanya van purificar els primers grams d'aquest alcaloide. Les seves propietats anestèsiques locals es van descobrir el 1870 i al segle XIX el van convertir en un producte fonamental de molts medicaments casolans. Durant disset anys va ser un component més de la popular Coca-Cola fins que es va veure el seu perill d'addicció i es va eliminar de la seva fórmula.



**Figura 9.** Estructura química de la cocaïna (metilbenzoilecgonina, C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>).

En l'actualitat la cocaïna se sol consumir en forma de clorhidrat, inhalada per via intranasal o injectada per via intravenosa. Una altra forma de consum habitual consisteix en fumar la cocaïna base, coneguda com a *crack*. Els efectes de l'administració de cocaïna intranasal es comencen a percebre al cap de 3-5 minuts i assoleixen el seu màxim als 10-20 minuts i fumada o per via intravenosa, els efectes

es produeixen als 8-10 minuts i desapareixen en pocs minuts. La rapidesa d'inici i acabament atorga una gran capacitat reforçadora a aquestes vies. La cocaïna s'hidrolitza al plasma i es metabolitza al fetge. La vida mitjana d'eliminació és al voltant d'una hora, tot i que la durada dels seus efectes es relaciona amb la seva vida mitjana de distribució, que és molt més curta (Fernández-Espejo, 2006).

### 2.1.1. Dades epidemiològiques del consum de cocaïna

L'any 2007 la UNODC va estimar que la prevalença anual del consum cocaïna arreu del món era d'entre 15,6 i 20,8 milions de persones, que equival al 0,4%-0,5% de la població d'entre 15 i 64 anys. Les estimacions dels últims anys suggereixen que el major mercat continua sent Nord Amèrica, seguit de Europa Occidental i Central i Sud Amèrica (*World Drug Report 2009*, UNODC).

S'estima que al voltant de 13 milions d'europaus han consumit cocaïna almenys un cop a la vida (3,9% dels adults de 15 a 64 anys) i que al voltant de 4 milions d'europaus (una mitjana



entre països de l'1,2%) en van consumir durant l'any 2008. En general, després del cànnabis la cocaïna continua sent la segona droga il·legal més consumida a Europa, tot i que hi ha grans diferències entre països. Les xifres varien del 0,1% al 8,3%, amb la majoria de països d'Europa central i oriental presentant una baixa prevalença de consum al llarg de la vida (0,5-2%). Per altra banda, els països amb un major consum són Dinamarca, Espanya, Itàlia, Irlanda i el Regne Unit (2009 Annual report on the state of the drugs problem in Europe, *European monitoring Centre for drugs and drug addiction*, EMCDDA). Malgrat el gran increment en el consum de cocaïna a Europa Occidental en els últims anys, sembla ser que comença a estabilitzar-se, sobretot pel que fa als països amb major consum: Espanya, Anglaterra i Gales, Itàlia i Alemanya (*World Drug Report 2009*, UNODC).

El consum de cocaïna és més elevat en individus adults joves (15 – 34 anys). S'estima que uns 7,5 milions d'europaus joves han consumit cocaïna almenys un cop a la vida (una mitjana entre països del 5,6%), i 3 milions (2,2%) havien consumit durant l'any 2008. A més, la prevalença del consum és molt més gran en homes que en dones joves (2 : 1).

Espanya ha tingut la prevalença més alta de consum de cocaïna a Europa en l'última dècada, amb xifres fins i tot superiors a les dels Estats Units en els darrers anys. El percentatge de població consumidora s'ha estabilitzat entre 2005 i 2008 en el 3% de la població d'entre 15 i 65 anys (equival a 910.000 consumidors de cocaïna).

Quant a la dependència de cocaïna, un estudi realitzat a Estats Units va mostrar que vora el 5% dels consumidors de cocaïna poden desenvolupar dependència a aquesta droga durant el primer any de consum, però no més d'un 20% creen dependència a llarg termini (Wagner & Anthony, 2002). També s'ha descrit que molts consumidors de cocaïna controlen el consum de la droga establint normes, per exemple, sobre la quantitat, freqüència o context de consum (Decorte, 2000). La proporció entre homes i dones en tractament pel consum de cocaïna és de 5,1 : 1 a Europa.

## 2.1.2. Clínica del consum de cocaïna

### *Efectes inicials del consum de cocaïna*

La cocaïna consumida intranasalment comença a produir efectes a partir dels 5 - 10 minuts, i en canvi el *crack* provoca efectes de forma gairebé instantània, en només uns segons. Aquests efectes consisteixen en una intensa eufòria, plaer i estat d'èxtasi, en què qualsevol sensació de plaer s'intensifica. Aquests efectes van seguits de diversos minuts d'excitació i inquietud. També es redueixen les inhibicions socials i es facilita la comunicació interpersonal (Morton, 1999). A més, la cocaïna provoca la sacietat de la gana sense intensificar els plaers associats al menjar (Gawin & Kleber, 1985; Johanson & Fischman, 1989). Aproximadament entre 5 i 20 minuts després d'aquesta excitació la persona comença a sentir-se irritable i incòmoda i, per tal

d'evitar aquest estat i recuperar l'estat eufòric, freqüentment torna a consumir.

### *Consum regular i dependència de cocaïna*

No tots els individus que proven la cocaïna acaben consumint-ne regularment. Alguns individus que experimenten amb cocaïna interrompen el consum immediatament, descrivint que l'efecte principal de la cocaïna és una ansietat insuportable en comptes d'eufòria. D'altres que sí que experimenten una eufòria intensa interrompen el consum per motius econòmics o bé pel restringit accés a la droga. Finalment, hi ha individus que abans de desenvolupar completament l'addicció tenen por d'una pèrdua de control sobre el consum i són capaços de deixar de consumir (Gawin, 1991). Per altra banda, els individus que creen dependència, a mesura que desenvolupen l'addicció a cocaïna incrementen la dosi i freqüència de consum. Els períodes d'extrema eufòria són nombrosos produint records vívids que més endavant contrasten amb la disfòria que produeix el desig incontrolat de consum (Gawin & Kleber, 1986; Gawin & Ellinwood, 1988). Els individus addictes a cocaïna asseguren que tots els seus pensaments giren al voltant del consum de la droga (Gawin & Kleber, 1986; Gawin & Ellinwood, 1988). Les limitacions de l'accés a la droga, incloent el preu elevat i les restriccions legals pel que fa a la seva distribució, regulen el consum en humans. Per altra banda, models animals amb lliure accés a la droga acaben autoadministrant-se-la fins arribar a la mort en tan sols 14 dies (Johanson & Fischman, 1989).

Hi ha una elevada comorbiditat entre la dependència de cocaïna i altres trastorns psiquiàtrics, tals com psicosi induïda per la droga, trastorns de l'estat d'ànim, ansietat, disfunció sexual i trastorns del son (*American Psychiatric Association: DSM-IV, 1994*). La cocaïna també provoca problemes cardiovasculars, tot augmentant el ritme cardíac i causant vasoconstricció, que pot donar lloc a hipertensió, accidents cerebrovasculars, isquèmia cardíaca i infarts tissulars i d'òrgans (Goldstein *et al.*, 2009).

### *Síndrome d'abstinència*

La síndrome d'abstinència de la cocaïna es caracteritza per un patró trifàsic de símptomes (Gawin, 1991):

- *Fase 1 – davallada.* Immediatament després de l'afartament de cocaïna s'esdevé una davallada de l'estat d'ànim i l'energia. S'intensifiquen ràpidament la depressió, agitació, ansietat i deler. Entre una i les quatre hores següents, el deler de cocaïna decreix i augmenta l'esgotament i el desig de dormir.
- *Fase 2 – abstinència.* De 0,5 a 4 dies després de la davallada apareix ràpidament una síndrome disfòrica perllongada, responsable de l'ús continuat de la cocaïna, en la qual s'inclouen ansietat, manca de motivació, avorriment i una notable disminució de la intensitat de les experiències plaents normals (anhedònia). Aquest estat contrastat amb els records de l'eufòria induïda per la cocaïna provoquen el deler sever de cocaïna, el restabliment del consum i cicles d'afartament recurrents. Si l'abstinència continua, els símptomes anhedònics es poden perllongar entre 2 i 12 setmanes.

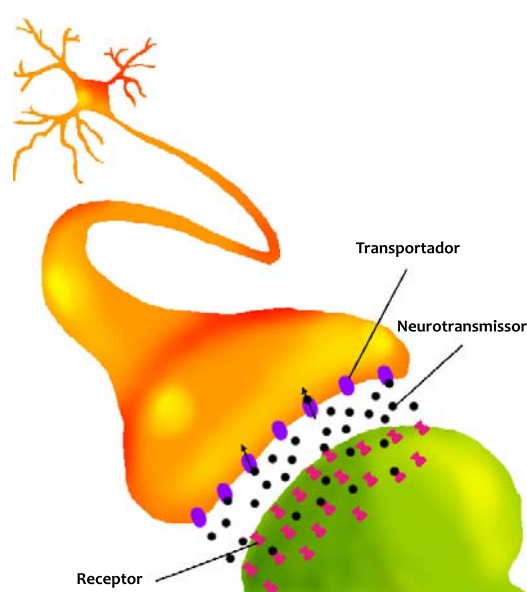
- **Fase 3 – supressió.** Després que l'anhedònia de l'abstinència finalitzi, encara pot aparèixer deler condicionat de cocaïna de manera intermitent, durant mesos o fins i tot anys després de l'últim consum de la droga, però amb el temps va desapareixent.

### 2.1.3. Dianes i efecte farmacològic de la cocaïna

La cocaïna s'uneix als transportadors monoaminèrgics de dopamina (DAT), serotonina (SERT) i noradrenalina (NET), que són els responsables d'aturar l'activitat sinàptica d'aquests neurotransmissors i transportar-los altre cop des de l'espai sinàptic a la terminal presinàptica (Filip *et al.*, 2005) (Fig. 10; veure caixes 4 i 5 per explicació detallada de sistema dopaminèrgic i serotoninèrgic, respectivament).

S'ha demostrat que la cocaïna té una alta afinitat pels transportadors DAT ( $K_i = 277$  nM), SERT ( $K_i = 217$  nM) i NET ( $K_i = 144$  nM) (Koe, 1976) i bloqueja la recaptació de les monoamines abans esmentades ( $K_i$ , valors de 640, 140 i 1600 nM, respectivament) (Ritz *et al.*, 1990). Aquest bloqueig augmenta l'efecte d'aquests neurotransmissors tot allargant la seva vida mitjana a l'espai sinàptic i permetent que aquests difonguin més efectivament. Experiments *in vivo* amb models animals de comportament demostren que l'administració de cocaïna en rates incrementa l'activitat motora i l'alliberament de dopamina (DA) i serotonina (5-HT) al NAc (Broderick *et al.*, 2004). També s'observen canvis similars en la neurotransmissió dopaminèrgica i serotoninèrgica després de l'autoadministració intravenosa de cocaïna (Caixa 6) en un model murí que simula l'abús de cocaïna en humans. En aquest model, els efectes reforçants induïts per la cocaïna (equivalent a la recompensa) es correspondria amb els efectes eufòrics en humans (Drummond *et al.*, 1995). Els nivells extracel·lulars de DA i 5-HT també s'incrementen al *globus pallidus* (Sizemore *et al.*, 2000).

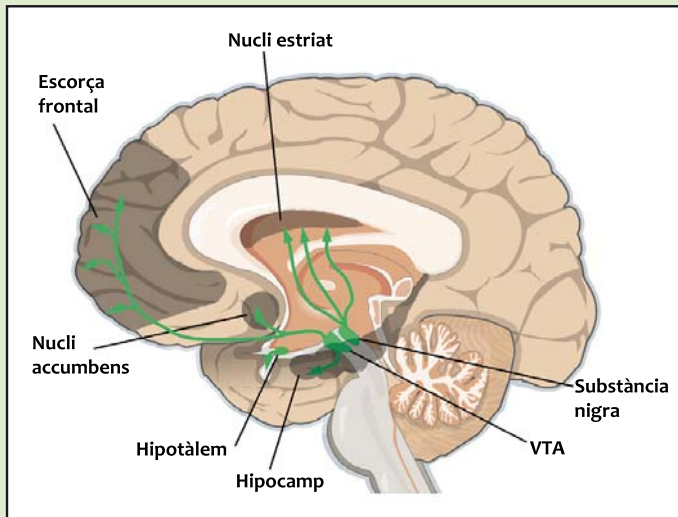
El paper prominent del bloqueig del DAT (i com a conseqüència l'augment de la neurotransmissió dopaminèrgica) en l'efecte de recompensa de la cocaïna es corrobora amb la relació entre la saturació de DAT (> 60%) per la cocaïna i els efectes estimulants i d'eufòria en humans (Volkow *et al.*, 1997a), així com amb la forta correlació que hi ha entre l'afinitat d'aquesta droga per DAT i l'efecte de recompensa de la cocaïna i d'altres psicoestimulants (Ritz *et al.*, 1988; Spealman *et al.*, 1989; Kuhar *et al.*, 1991).



**Figura 10.** Esquema d'una sinapsi neuronal. Neurona presinàptica i neurona postsinàptica en taronja i verd, respectivament. S'indiquen els receptors i transportadors del neurotransmissor.

#### Caixa 4. El sistema dopaminèrgic

La DA és un neurotransmissor que, juntament amb la noradrenalina i l'adrenalina, forma part del grup de les catecolamines. La DA actua com a neuromodulador tot alterant la resposta a altres neurotransmissors de les neurones diana, i també pot regular l'activitat de canals iònics dependents de voltatge (Girault & Greengard, 2004).



Els cossos cel·lulars de les neurones dopaminèrgiques que innerven els nuclis caudats i putamen estan situats a la substància nigra, mentre que les neurones que innerven el nucli estriat i l'escorça prefrontal estan a l'àrea tegmental ventral (VTA) (Girault & Greengard, 2004, Iversen & Iversen, 2007).

La DA té un paper fonamental en molts aspectes del comportament, des del control motor a la regulació d'emocions, cognició, conducta, motivació i recompensa, entre d'altres (Bjorklund & Dunnett, 2007). La síntesi de DA s'inicia amb la conversió de fenilalanina a tirosina mitjançant l'enzim fenilalanina hidroxilasa (PAH). A continuació, l'enzim tirosina hidroxilasa (TH) oxida la tirosina convertint-la en L-dihidrofenilalanina (L-DOPA), pas limitant de la producció de DA, noradrenalina i adrenalina al cervell. La L-DOPA és posteriorment convertida a DA via decarboxilasa d'aminoàcids aromàtics (AADC o DDC), que al seu torn és convertida en noradrenalina per la dopamina beta-hidroxilasa (DBH).

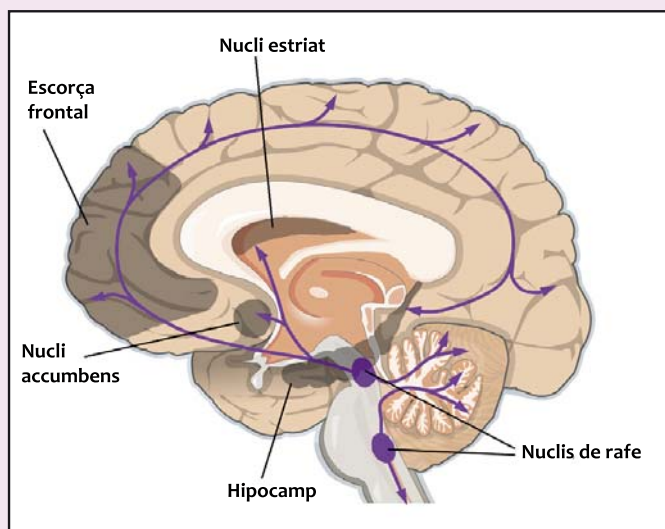
Hi ha cinc tipus de receptors de DA amb diferents propietats estructurals i farmacològiques. S'agrupen en dues categories: els similars al receptor D1, que activen l'adenilat ciclase (receptors D1 i D5) i els similars a receptor D2, que inhibeixen la formació d'AMPc (receptors D2, D3 i D4) (Girault & Greengard, 2004). El transportador de dopamina DAT s'encarrega de la recaptació de la DA de l'espai sinàptic per part de la neurona presinàptica. Un cop recaptada, la DA pot ser degradada alternativament pels enzims catecol-O-metil transfera (COMT) o monoamina oxidasa (MAO).

### Caixa 5. El Sistema serotoninèrgic

La 5-HT és un neurotransmissor monoaminèrgic amb un paper essencial en un ampli ventall de funcions biològiques, fisiològiques i conductuals del SNC que inclouen l'activitat motora, la conducta alimentària i sexual, l'humor, la son, la termoregulació i les activitats respiratòries i cardiovasculars (Blundell, 1992, Blundell *et al.*, 1995, Halford & Blundell, 2000, Simansky, 1996).

Els cossos cel·lulars de les neurones serotoninèrgiques s'agrupen majoritàriament en petits *clusters* als nuclis del rafe, que se situen al llarg del tronc de l'encèfal i innerven pràcticament la totalitat del SNC.

La 5-HT se sintetitza a partir de l'aminoàcid essencial L-triptòfan a través de l'acció conjunta dels enzims triptòfan hidroxilasa (TPH) i descarboxilasa d'aminoàcids aromàtics (AADC). A més, a les vies catabòliques de degradació d'aquest neurotransmissor participen els enzims monoamina oxidasa (MAO), l'aldehiddehidrogenasa i l'alcohol deshidrogenasa, i es genera, entre d'altres, l'àcid 5-hidroxiindolacètic (5HIAA), producte metabòlic utilitzat com a mesura del metabolisme serotoninèrgic.

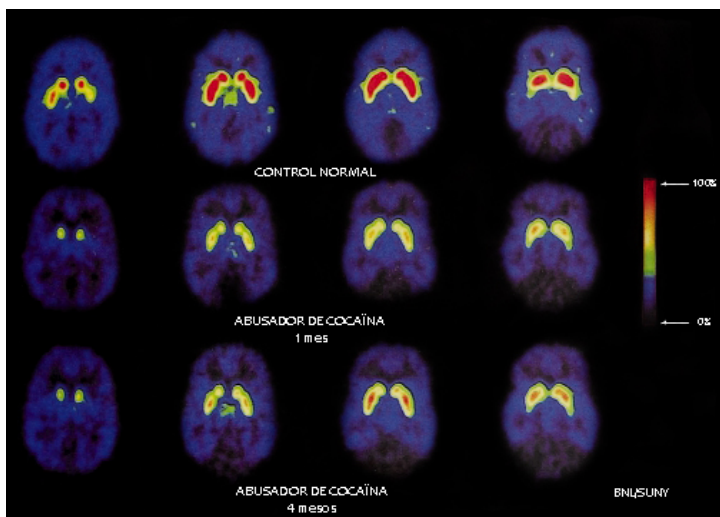


De la mateixa manera que altres neurotransmissors, la 5-HT s'emmagatzema en vesícules i s'allibera a les terminals sinàptiques a través d'un mecanisme d'exocitosi modulada per diferents autoreceptors somatodendrítics i altres neurotransmissors com l'acetilcolina, el GABA, la histamina i la noradrenalina. L'acció serotoninèrgica està mediada per la unió d'aquest neurotransmissor a diferents receptors serotoninèrgics. Diversos estudis farmacològics i fisiològics han permès la identificació de 7 grups de receptors serotoninèrgics en funció dels seus perfils farmacològics, el patró d'expressió, l'estructura proteica i els diferents mecanismes de transducció del senyal (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> i 5-HT<sub>7</sub>) (Barnes & Sharp, 1999, Hoyer & Martin, 1997). Els efectes d'aquest neurotransmissor estan en funció de la localització presinàptica o postsinàptica dels seus receptors. Així, els receptors 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>3</sub> són tant pre- com postsinàptics, mentre que els receptors 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub> i 5-HT<sub>7</sub> es localitzen postsinàpticament. A part del gran nombre de receptors serotoninèrgics, la seva distribució regional, la seva localització pre- o postsinàptica i les diferents vies inhibidores o excitatòries de transducció del senyal, hi ha diferents mecanismes de regulació post-transcripcional de l'acció serotoninèrgica, que inclouen processos d'*splicing* alternatiu als receptors 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub> i 5-HT<sub>7</sub> i d'edició al receptor 5-HT<sub>2C</sub>.

L'activitat serotoninèrgica finalitza amb la recaptació d'aquest neurotransmissor a les terminals de les neurones presinàptiques. Aquesta eliminació activa de 5-HT de les terminacions nervioses està mediada per una única proteïna coneguda com a transportador presinàptic de serotonina (SERT o 5HTT), que s'expressa exclusivament a les neurones serotoninèrgiques dels nuclis del rafe (Blakely *et al.*, 1991, Chang *et al.*, 1996). L'activitat d'aquesta molècula transmembranosa regula, juntament amb els autoreceptors presinàptics 5-HT<sub>1A</sub> i 5-HT<sub>1B</sub>, la concentració serotoninèrgica a l'espai sinàptic i té influència sobre la magnitud i durada de la transmissió (Lesch & Mossner, 1998).

Altres estudis també mostren que l'efecte reforçant de la cocaïna en models animals està mediat, en part, pel sistema dopaminèrgic: (i) La destrucció de la via dopaminèrgica que es projecta des del cervell mitjà fins al NAc, té com a conseqüència que alguns animals no es tornen a autoadministrar cocaïna (Roberts *et al.*, 1980). Aquestes lesions sembla que alteren de forma específica la resposta a cocaïna, ja que els animals continuen responent a altres reforçants com el menjar (Caine & Koob, 1994). D'altra banda, lesions a les neurones serotoninèrgiques no provoquen la interrupció de l'autoadministració de cocaïna (Roberts *et al.*, 1994). (ii) A diferència dels inhibidors selectius de la recaptació de 5-HT, els inhibidors de la recaptació de DA, diferents de la cocaïna, tenen efectes reforçants i l'autoadministració d'aquests es correlaciona amb la seva capacitat d'unió a DAT (Bergman *et al.*, 1989). (iii) El tractament amb antagonistes de receptors de DA atenuen els efectes comportamentals de l'autoadministració de cocaïna, i en canvi no ho fan els antagonistes dels receptors de 5-HT o noradrenalina (NE) (Mello & Negus, 1996); (iv) Quan es retira la cocaïna i se substitueix per un agonista de DA, l'animal s'autoadministra l'agonista (Woolverton *et al.*, 1984), la qual cosa suggereix que l'estimulació directa d'aquests receptors produeix efectes reforçants.

El sistema serotoninèrgic també té un paper important en els efectes de la cocaïna, com els efectes hiperlocomotors, el reforç i la sensibilització. Estudis clínics i pre-clínics posen de manifest que la 5-HT i els receptors de 5-HT modulen els mecanismes d'acció de la cocaïna, i com 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 (Spealman, 1993; Walsh & Cunningham, 1997; Filip *et al.*, 2001; Filip *et al.*, 2004; Filip, 2005; Muller & Huston, 2006; Filip *et al.*, 2010).



**Figura 11.** Imatges obtingudes amb el radioligand del receptor D2 de DA ([<sup>18</sup>F]N-metilspiroperidol) en un individu control i un abusador de cocaïna estudiat 1 i 4 mesos després de l'últim consum de la droga. Les imatges corresponen als quatre plans seqüencials on es localitza el nucli estriat. L'individu abusador de cocaïna presenta nivells més baixos de receptor D2 en comparació al control, que persisteixen després de quatre mesos. Adaptada de Volkow *et al.*, 1993.

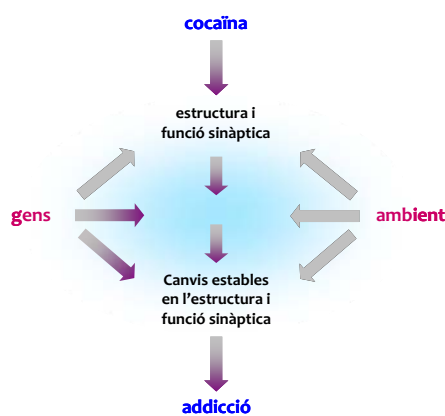
El sistema dopaminèrgic, d'altra banda, sembla que juga un paper essencial en la dependència de cocaïna. S'ha postulat que l'addicció en resulta d'una disminució de DA al cervell (Dackis & Gold, 1985). El grup de la Nora Volkow va demostrar que els abusadors de cocaïna presenten reduccions significatives en els receptors D2 de DA en comparació amb controls (Volkow *et al.*, 1990; Volkow *et al.*, 1993; Volkow *et al.*, 1997b)(Fig. 11). Aquestes reduccions son perllongades i persisteixen entre 3 i 4 mesos després de la desintoxicació, últim punt en el que van ser capaços d'avaluar els

pacients abans que tornessin a recaure.

### 2.1.4. Genètica i cocaïna

En la investigació sobre la dependència de cocaïna i de l'efecte d'aquesta droga, la genètica hi juga un paper important. Mitjançant models animals *genoanul·lats* i transgènics s'han pogut entendre els mecanismes a través dels quals la cocaïna provoca els seus efectes reforçants i de recompensa. El consum de cocaïna provoca efectes sobre l'estructura sinàptica i en l'expressió gènica i, a mesura que el consum es fa crònic, aquests canvis s'estabilitzen. Que aquests canvis donin pas a l'addicció depèn de la combinació de factors ambientals i factors genètics de predisposició (Fig. 12). Així, s'ha observat, tant en humans com en animals, que hi ha diferències biològiques que fan que els individus responguin de manera molt diferent a les drogues.

**Figura 12.** Esquema en què es mostren els factors genètics i ambientals que es combinen per influir sobre el procés pel qual la repetida exposició a una droga (cocaïna) pot conduir a l'addicció. Els factors ambientals i genètics, que contribueixen a la funció i estructura sinàptica, determinen la sensibilitat inherent d'un individu a l'exposició inicial de la droga. Aquests factors també estableixen com les neurones, i els circuits en què operen, s'adapten a través del temps a l'exposició de la droga, que al seu torn determina el desenvolupament de l'addicció. Adaptat de Nestler, 2000.



#### 2.1.4.1. Models animals *genoanul·lats* i transgènics en cocaïna

En els darrers anys s'han fet avenços importants en el desenvolupament de nous models animals que ajuden a identificar els mecanismes d'acció de les drogues psicoestimulants. Els models murins genètics s'han emprat per identificar correlacions entre diferents gens i trets relacionats amb les drogues (Sora *et al.*, 1997; Crabbe *et al.*, 1999), així com per estudiar el paper que juguen gens específics en l'addicció (Uhl *et al.*, 2000; Uhl *et al.*, 2002). La majoria d'aquests estudis s'han centrat en l'efecte de recompensa i el condicionament a drogues, incloent la preferència de lloc condicionada (Conditioned Place Preference, CPP) i l'autoadministració (Caixa 6).

##### *Genoanul·lació i transgènics de transportadors monoaminèrgics*

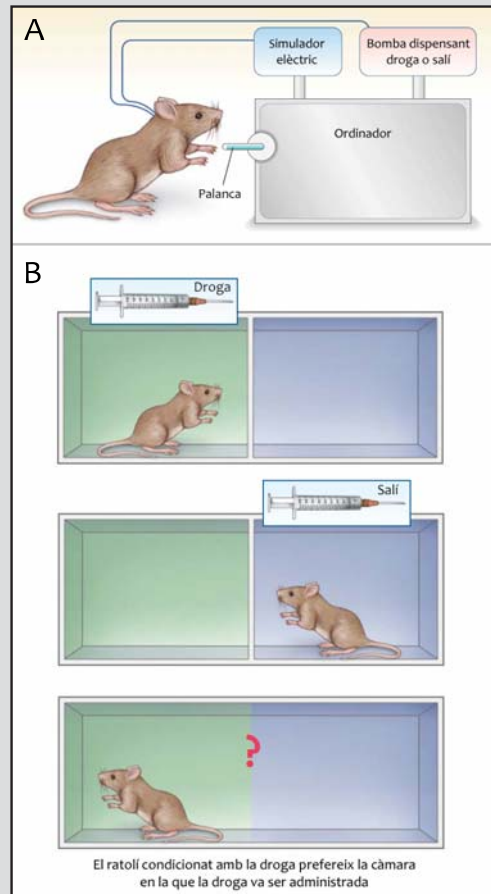
Els primers estudis que es van fer amb animals *genoanul·lats* (*gene Knock-Out*, KO) per esbrinar els mecanismes moleculars de l'acció de la cocaïna (i els psicoestimulants) van utilitzar animals sense transportadors monoaminèrgics. La tria es va fer a partir del coneixement previ que es tenia de l'efecte farmacològic de la cocaïna. Aquests estudis s'han centrat en el transportadors

**Caixa 6. Models animals en l'estudi de les drogues.**

Els models animals emprats en l'estudi de les propietats addictives de les drogues es basen en el condicionament, tant clàssic o Pavlovià (en què s'associa un estímul amb el resultat) com operant (en què s'associa una acció amb el resultat).

Model de preferència de lloc condicionada (conditioned place preference, CPP):

Aquest paradigma permet avaluar les propietats de recompensa de les drogues d'abús emprant el condicionament clàssic (Pavlovià), on els animals aprenen a associar un context específic amb els efectes hedònics d'una droga administrada. Consisteix en una capsa amb dos compartiments amb característiques diferents (color, textura, patró) (Figura B, adaptada de Cami et al., 2003). A l'inici de l'experiment, es permet als animals explorar lliurement ambdós compartiments. 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 bé del vehicle (salí), de manera que l'administració de la droga s'associa a un determinat compartiment i el del vehicle a l'altre. Durant el test de CPP sense droga l'animal escull entre els dos contextos, l'associat a la droga i l'associat al vehicle. Un augment en la preferència pel context de la droga serveix com a mesura dels efectes reforçants Pavlovians d'aquesta.

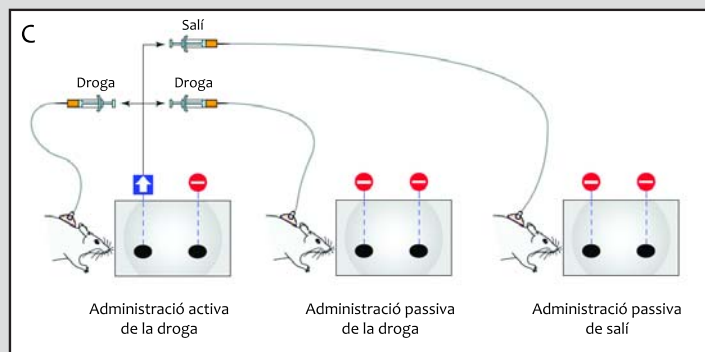


Model d'autoadministració:

Model operant en què els animals de laboratori premen una palanca (o introdueixen el musell) per rebre la droga, ja sigui per via intravenosa, intracerebral o oral. 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 models no operants com la CPP, ja que els animals han de treballar per 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 l'LSD (Figura A, adaptada de Cami et al., 2003).

Model d'autoadministració operant acoblat a control:

Aquest model permet discernir entre 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. En aquest paradigma, un animal que s'autoadministra droga a través d'una resposta activa a una situació operant, provoca que un altre subjecte, un animal acoblat, rebi la mateixa dosi de droga de manera passiva (Figura C, adaptada de Jacobs et al., 2003). L'animal "master" (contingent) també es pot connectar a un tercer subjecte que rep una infusió salina cada cop que l'animal master s'autoadministra la droga. Els animals acoblats (no-contingents) no tenen control sobre quan prenen la droga i per tant no es produeix aprenentatge sota aquestes condicions, la qual cosa permet discernir entre els efectes farmacològics de la droga dels d'aprenentatge de l'animal contingent.





DAT, SERT i NET. Per tal d'esbrinar la contribució d'aquests tres sistemes de neurotransmissió als efectes de recompensa de la cocaïna es van utilitzar ratolins manipulats genèticament, als quals els mancava un d'aquests transportadors en homozigosi o en heterozigosi (manca de dues i una còpia del gen, respectivament) (Taula 5).

**Taula 5.** Activitat locomotora basal i respostes comportamentals a la cocaïna en ratolins genoanul·lats de transportadors monoaminèrgics.

Genotip KO	Activitat locomotora basal	Efectes de la cocaïna			
		Hiperactivació locomotora	Sensibilització locomotora	Preferència de lloc condicionada (CPP)	Auto-administració
<b>Dat</b>					
salvatge	- [1, 2]	+ [1, 3]	+ [3]	+ [2]	+ [4]
heterozigot	- [2]	- [3]	- [3]	+ [2]	
homozigot	↑ [1, 2]	- [1, 3]	- [3]	+ [2]	+ [4]
<b>Net</b>					
salvatge	- [3, 5]	+ [3, 5]	+ [3, 5]	+ [5]	+ [6]
heterozigot					
homozigot	↓ [3, 5]	↑ [5] ↓ [3]	↑ [3] - [5]	↑ [5]	↓ [6]
<b>Sert</b>					
salvatge				+ [2]	
heterozigot				↑ [2]	
homozigot				↑ [2]	

salvatge (+/+); heterozigot (+/-); homozigot (-/-); + efecte existent; - manca d'efecte; ↑ efecte augmentat comparat amb la soca salvatge; ↓ efecte existent, però reduït 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., 2000a; 6. Rocha et al., 1999.

En ratolins homozigots *Dat* -/- o heterozigots +/- els efectes de recompensa de la cocaïna i la CPP no estan suprimits, tot i que aquests animals no manifesten els efectes locomotors de la cocaïna (Taula 5) (Giros et al., 1996; Rocha et al., 1998; Sora et al., 1998; Mead et al., 2002). Aquests resultats no refuten la importància de la DA com a principal substrat per l'efecte de recompensa de la cocaïna, però suggereixen que podria haver-hi una segona diana a través de la qual la cocaïna produeix 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 heterozigots *Dat* -/- *Sert* +/- (Sora et al., 2001), però no en homozigots *Dat* -/- *Net* -/- o *Net* -/- *Sert* -/- (Taula 6) (Hall et al., 2002; Uhl et al., 2002; Hall et al., 2004). A més, sorprenentment, l'anul·lació de *Net*, *Sert* o dels dos gens alhora no només no disminuïa els efectes de recompensa de la cocaïna sinó que els incrementava (taules 5 i 6) (Sora et al., 1998; Rocha et al., 1999; Xu et al., 2000a; Hall et al., 2002; Mead et al., 2002). Els resultats d'aquests experiments indiquen que *Sert* juga un paper important en la modulació dels efectes de recompensa o adversos de la cocaïna, mentre que *Net* seria únicament responsable dels efectes adversos de la droga.

**Taula 6.** Preferència de lloc condicionada induïda per la cocaïna en ratolins dobles genoanul·lats per transportadors monoaminèrgics.

Genotip KO		Preferència de lloc condicionada (CPP)
<b>Dat</b>	<b>Net</b>	
salvatge	salvatge	+ [1, 2]
homozigot	homozigot	+ [1, 2]
<b>Net</b>	<b>Sert</b>	
salvatge	salvatge	+ [3]
salvatge	homozigot	+ [3]
heterozigot	homozigot	+ [3]
homozigot	salvatge	+ [3]
homozigot	heterozigot	+ [3]
homozigot	homozigot	↑ [3]
<b>Dat</b>	<b>Sert</b>	
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]

salvatge (+/+); heterozigot (+/-); homozigot (-/-); + efecte existent; - manca d'efecte; ↑ efecte augmentat comparat amb la soca de tipus salvatge. 1. Hall et al., 2004; 2. Uhl et al., 2002; 3. Hall et al., 2002; 4. Sora et al., 2001.

Per altra banda, també s'han generat llinatges transgènics per tal d'esbrinar el paper de *Dat* en els efectes de la cocaïna. Així, ratolins transgènics que sobreexpressen *Dat* mostren un augment de la CPP sense cap efecte locomotor induït per la cocaïna (Donovan et al., 1999). En els animals *Dat* KO hi ha canvis compensatoris importants que podrien interferir en els resultats (Gainetdinov & Caron, 2003), i és per això que es va crear una nova línia genominvada (*gene Knock-Down*, KD) en què l'expressió de *Dat* estava reduïda en un 90%. Al contrari que els ratolins *Dat* KO, els *Dat* KD tenien augmentats els efectes estimulants locomotors a baixes dosis de cocaïna, i en canvi no hi havia efecte en la CPP (Tilley et al., 2007). Recentment s'ha generat un nou model murí transgènic de *Dat* que és insensible a la cocaïna, amb una recaptació de DA relativament normal i amb menys canvis compensatoris dels que presenten la resta de models KO o KD (Chen et al., 2006). En aquests ratolins la cocaïna no aconsegueix incrementar els nivells de DA a l'espai sinàptic ni generar activitat elèctrica a les neurones. Aquest model animal tampoc presenta CPP (Chen et al., 2006; Tilley et al.,

2009), autoadministració de cocaïna (Thomsen et al., 2009) ni comportament estereotípic induït per la cocaïna (Tilley & Gu, 2008), indicant la importància de *Dat* en moltes de les accions de la cocaïna, incloent-hi la recompensa.

### Genoanul·lació de receptors monoaminèrgics

S'han generat també models animals per avaluar el paper que juguen els receptors dopaminèrgics i serotoninèrgics en l'abús de cocaïna (Taula 7).

#### Receptors de dopamina:

Els receptors de DA tenen una distribució diferencial al cervell i propietats farmacològiques també diferents, i per tant la manipulació genètica dels receptors de DA pot produir efectes més específics en el comportament i sobre els efectes de la cocaïna que els observats en les manipulacions dels transportadors. Els ratolins KO pel receptor D1 (*Drd1* -/-) presenten

**Taula 7.** Respostes comportamentals a la cocaïna en ratolins genoanul·lats per receptors monoaminèrgics.

Gen KO (-/-)	Locomoció	Sensibilització	Preferència d'espai condicionat (CPP)	Auto-administració
<b>Dopamina</b>				
<i>Drd1</i>	↓ [1] - [3]	- [5]	+ [2]	- [4]
<i>Drd2</i>	+ [6] ↓ [8]		↓ [8]	↑ [7]
<i>Ddrd3</i>	↑ [9] ↓ [10]	- [10]	↑ [9]	
<i>Ddrd4</i>	↑ [11]			
<i>Drd5</i>	↓ [12] + [5]	↓ [5]	+ [5]	
<i>Drd1/Drd3</i>	↓ [13]		↓ [13]	
<b>Serotonina</b>				
<i>5-ht1b</i>			+ [15]	↑ [14] ↑ [16]
<i>5-ht2a</i>	↑ [17]	+ [17]		

+ efecte existent; - manca d'efecte; ↑ efecte augmentat comparat amb el wild-type; ↓ efecte disminuït comparat amb el wild-type.

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 *et al.*, 2000; 11. Katz *et al.*, 2003; 12. Elliot *et al.*, 2003; 13. Karasinska *et al.*, 2005; 14. Rocha *et al.*, 1997; 15. Belzung *et al.*, 2000; 16. Shippenberg *et al.*, 2000.

respostes normals als efectes de recompensa de la cocaïna en la CPP (Miner *et al.*, 1995), però desapareixen els efectes estimulants i de sensibilització locomotora de la cocaïna (Miner *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 2000b; Karlsson *et al.*, 2008), així com també l'autoadministració de la droga (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). Aquests ratolins presenten una reducció lleugera de CPP de cocaïna (Welter *et al.*, 2007). Tot i que s'esperarien canvis més severos en aquests animals, el resultat es pot explicar perquè aquests receptors funcionen com a autoreceptors i la seva genoanul·lació provoca un augment substancial de l'alliberament de DA en resposta a la cocaïna. Els ratolins *Drd3* -/- i *Drd4* -/- presenten respostes incrementades a la cocaïna (Rubinstein *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 1997; Katz *et al.*, 2003) i en canvi els ratolins *Drd5* -/- presenten respostes reduïdes en alguns estudis però no en d'altres (Elliot *et al.*, 2003; Karlsson *et al.*, 2008).

#### Receptors de serotonina:

Tot i que la relació entre el sistema dopaminèrgic i els efectes de la cocaïna està ben establerta, el sistema serotoninèrgic (com s'ha discutit prèviament), i particularment la interacció entre aquest i el sistema dopaminèrgic, també té un paper important. Els diferents receptors de 5-HT també tenen diferents distribucions i propietats farmacològiques, i només alguns s'han investigat en relació a la cocaïna. Els agonistes del receptor 5-HT1B incrementen el reforç induït

per la cocaïna (Parsons *et al.*, 1998) i els nivells de DA extracel·lular al NAc (Parsons *et al.*, 1999). Els ratolins KO per *5-ht1b* (-/-) presenten increments en l'auto-administració de cocaïna (Rocha *et al.*, 1997; Belzung *et al.*, 2000; Castanon *et al.*, 2000), sense augments en la CPP (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). Els ratolins que sobreexpressen *5-ht3* tenen reduïda la CPP, però són lleugerament més sensibles a baixes dosis de cocaïna (Allan *et al.*, 2001). Els ratolins KO per *5-ht7* (-/-) s'ha observat que augmenta els atacs induïts per la cocaïna i la letalitat (Witkin *et al.*, 2007).

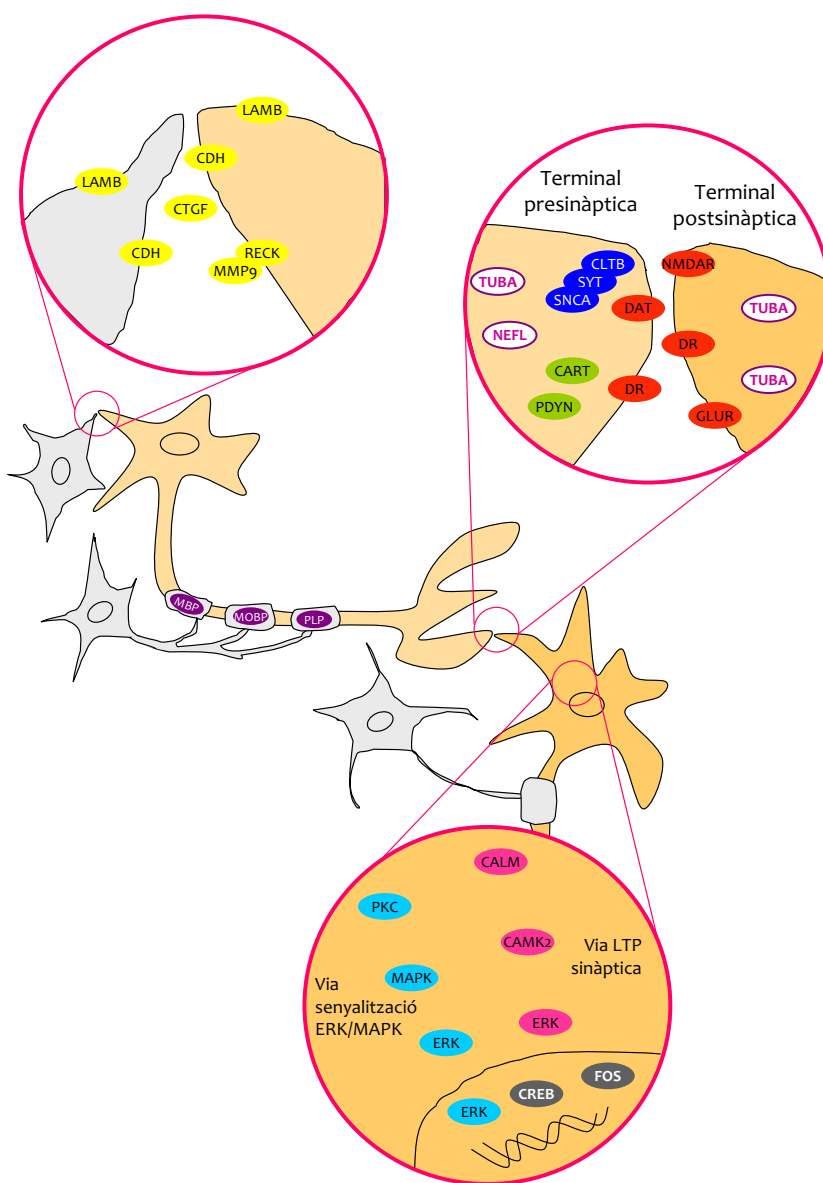
#### **2.1.4.2. Efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica**

Un concepte important en la recerca de les addiccions és que el cervell es remodela en el transcurs del desenvolupament de la dependència de la droga i que alteracions en la regulació transcripcional provocades pel consum juguen un paper molt important en aquest remodelatge. L'administració aguda i repetida de cocaïna altera l'expressió de nombrosos gens i vies de neurotransmissió. La majoria de les alteracions en l'expressió gènica conegudes són transitòries, i s'hipotetitza que representen adaptacions compensatòries per mantenir l'homeòstasi reduint els efectes de la droga. En canvi, les alteracions que persisteixen podrien participar en els processos d'addicció, de l'abstinència i de la recaiguda (Yuferov *et al.*, 2005).

S'han realitzat nombrosos estudis per avaluar l'efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica, tant en animals com en humans. Hi ha molt pocs estudis que s'hagin realitzat en cervells humans *post-mortem*, a causa de la dificultat d'aconseguir les mostres i per les limitacions inherents d'aquests estudis (variabilitat en el temps transcorregut des de la mort fins a l'obtenció de la mostra, quantificació del consum de droga, consum d'altres drogues, condicions comòrbides com altres diagnòstics psiquiàtrics, i les causes de la mort i l'estat agònic). La majoria d'estudis, doncs, s'han realitzat amb models animals (ratolí, rata i primats), que tot i que no mimetitzen tots els aspectes de l'addicció a cocaïna en humans, presenten variabilitat genètica més reduïda i exposició quantificada a la cocaïna sense les complicacions del consum d'altres drogues. A més els estudis d'expressió gènica amb animals han permès avaluar els efectes de períodes d'abstinència i recaiguda en el consum. Aquests estudis han permès estudiar tant l'efecte agut com repetit i crònic del consum de cocaïna a diferents temps d'exposició, les conseqüències de l'administració passiva i l'autoadministració de la droga i l'efecte del consum de diferents quantitats de droga i de diferents intervals de temps entre l'última administració i el sacrifici. Tant en els estudis amb animals com en humans s'han analitzat diferents zones dels cervell implicades en la cocaïna com el nucli estriat, el NAc, l'hipocamp, l'escorça prefrontal i la VTA (Lull *et al.*, 2008).

Per tal d'evitar una revisió exhaustiva dels centenars d'estudis realitzats sobre l'efecte de la cocaïna en l'expressió gènica, ens centrarem sobretot en els estudis realitzats en humans. Aquests treballs es basen en la utilització de tècniques de microxips de DNA (coneguts també com a *microarrays*), que contenen una extensa col·lecció de sondes i permeten l'anàlisi de l'expressió diferencial de gens a gran escala. Aquests estudis han assenyalat més de 100 gens diferencialment expressats en els cervells d'individus addictes a cocaïna (se'n mostren alguns a la Taula 8), com ara gens que codifiquen proteïnes relacionades amb la matriu extracel·lular, oligodendròcits i mielina, comunicació sinàptica i neuroplasticitat, receptors, transportadors i canals iònics, apoptosi i mort cel·lular, funció mitocondrial, transducció de senyals i factors de transcripció (Taula 8 i Fig. 13). A continuació es detallen aquests canvis agrupats per funció.

**Figura 13.** Processos neuronals afectats per l'abús de cocaïna en humans. Les neurones pre- i post-sinàptiques s'indiquen amb color carabassa i els oligodendròcits en gris. Expressió gènica alterada per la cocaïna: en groc, gens implicats en l'estructura i funció de la matriu extracel·lular; en violeta, gens de mielinització i expressats en oligodendròcits; en blau fosc, gens implicats en funció i manteniment de les vesícules sinàptiques; en verd, gens que codifiquen neuropèptids; en vermell, receptors i transportadors; en blanc, gens que codifiquen proteïnes del citoesquelet; en blau clar, gens implicats en la via de senyalització de ERK/MAPK; en rosa, gens de la potenciació sinàptica a llarg termini (LTP); i en gris, gens que codifiquen factors de transcripció.



**Taula 8.** Canvis en l'expressió gènica en humans en resposta a cocaïna (Lull et al., 2008).

Gens representatius	Símbol del gen	Referències
<b>Matriu extracel·lular</b>		
Proteïna inductora de reversió amb motius kazal rica en cisteïnes	RECK	Lehrmann et al., 2003; Albertson et al., 2004;
Metaloproteïnasa 9 de matriu	MMP9	Mash et al., 2007
Factor de creixement de teixit connectiu	CTGF	
Protocadherina 8	PCDH8	
Laminina, beta 1	LAMB1	
Cadherina 1	CDH1	
Cadherina 17	CDH17	
Proteïna 1 d'unió a Integrina beta 1	ITGB1BP1	
<b>Comunicació sinàptica i neuroplasticitat</b>		
Oligofrenina 1	OPHN1	Chen et al., 199944;
Liprina beta 1	PPFIBP1	Lehrmann et al., 2003;
Axotrofina	MARCH7	Albertson et al., 2004;
Semaforina 6A	SEMA6A	Lehrmann et al., 2006;
$\alpha$ -sinucleïna	SNCA	Mash et al., 2007
Sinaptotagmina XI	SYT11	
Clatrina, polipèptid lleuger	CLTB	
Complex proteic adaptador 2, subunitat sigma 1 1	AP2S1	
Proteïna càpig-actina, beta	CAPZB	
Glutamat decarboxilasa 1	GAD1	
Factor de secreció sensible a N-etilmaleimida	NSF	
Prodinorfina	PDYN	
Proenceefalina	PENK	
Proteïna 43 associada a creixement	GAP43	
Transcrit relacionat amb cocaïna i amfetamina	CARTPT	
Polipèptid lleuger de neurofilament	NEFL	
Tubulina, alpha1	TUBA4A	
Receptor d'efrina B4	EPHB4	
<b>Receptors, transportadors i canals iònics</b>		
Transportador de dopamina	SLC6A3	Hurd and Herkenham, 1993;
Receptor D3 de dopamina	DRD3	Segal et al., 1997;
Receptor D2 dopamine	DRD2	Mash and Staley, 1999;
Receptor B de colecistoquinina	CCKBR	Lehrmann et al., 200315;
Receptor opioide $\mu$	OPRM1	Tang et al., 2003;
Receptor opioide $\kappa$	OPRK1	Hemby et al., 2005;
Receptor NMDA 1 de glutamat, ionotrópic	GRIN1	Mash et al., 2007
Receptor AMPA 2 de glutamat, ionotrópic	GRIA2	
Receptor Kainat 1 de glutamat, ionotrópic	GRIK1	
Receptor Kainat 5 de glutamat, ionotrópic	GRIK5	
<b>Relacionat amb oligodendròcits i mielina</b>		
Proteïna bàsica de mielina	MBP	Lehrmann et al., 2003;
Proteïna proteolipídica	PLP1	Albertson et al., 2004
Proteïna bàsica associada a mielina oligodendrocítica	MOBP	
Fosfatasa àcida fosfatídica 2C	PPAP2C	

Taula 8. (Continuació)

Gens representatius	Símbol del gen	Referències
<b>Apoptosi i mort cel·lular</b>		
Mort cel·lular programada 7	PDCD7	Mash <i>et al.</i> , 2007
Mort cel·lular programada 8	AIFM1	
Gen amb dit de zinc de resposta a apoptosi, rèquiem	DPF2	
<b>Funció mitocondrial</b>		
Superòxid dismutasa	SOD1	Lehrmann <i>et al.</i> , 2003
Enolasa gamma	ENO2	
ATP sintasa mitocondrial	ATP5G3	
Malat deshidrogenasa 1	MDH1	
<b>Transducció de senyal</b>		
Proteïna cinasa 10 activada per mitogen	MAPK10	Lehrmann <i>et al.</i> , 2003;
Proteïna cinasa 1 relacionada amb senyal	MAPK3	Tang <i>et al.</i> , 2003;
MAP cinasa cinasa	MAP2K1	Albertson <i>et al.</i> , 2004;
Cinasa d'adhesió focal	PTK2	Lehrmann <i>et al.</i> , 2006;
Fosfatasa de tirosina-proteïna de tipus receptor, $\alpha$	PTPRA	Mash <i>et al.</i> , 2007
Fosfatasa de tirosina-proteïna de tipus receptor, $\beta$	PTPRB	
Proteïna cinasa C, beta 1	PRKCB1	
Calmodulina 1	CALM1	
Calmodulina 2	CALM2	
Calmodulina cinasa 2B	CAMK2B	
Proteïna fosfatasa 2, subunitat reguladora B, isoforma gamma	PPP2R2	
<b>Factors de transcripció</b>		
Receptor nuclear 4A2	NR4A2	Lehrmann <i>et al.</i> , 2003;
Antigen similar a Fos 1	FOSL1	Bannon <i>et al.</i> , 2002;
Factor de transcripció AP-4	TFAP4	Bannon <i>et al.</i> , 20041;
Caixa aparellada 8	PAX8	Mash <i>et al.</i> , 2007
Factor de transcripció nuclear $\gamma$ $\beta$	NFYB	

### Matriu extracel·lular

Les proteïnes de la matriu extracel·lular, sobretot les integrines, cadherines, i laminines, són responsables de la comunicació cèl·lula-cèl·lula i donen suport estructural. L'expressió dels gens que les codifiquen està alterada en resposta a cocaïna (Lehrmann *et al.*, 2003; Albertson *et al.*, 2004; Mash *et al.*, 2007). L'expressió d'aquests gens es pot separar en dos grups en funció de si els subjectes han consumit recentment cocaïna (expressió incrementada) o no (expressió disminuïda). Altres gens de la matriu extracel·lular alterats pel consum de cocaïna codifiquen proteïnes no estructurals, com la metal·loproteïnasa de matriu 9 (MMP9) i l'inhibidor de MMP, la proteïna inductora de reversió amb motius kazal rica en cisteïnes (RECK), ambdues implicades en l'organització de la matriu. Tant les proteïnes estructurals com les no estructurals estan implicades en la comunicació sinàptica i el remodelatge durant el procés de potenciació a llarg

termini (*long-term potentiation*, LTP), procés que es basa en una intensificació perllongada de la transmissió de senyals entre dues neurones i que és la base dels processos d'aprenentatge i memòria (Huntley *et al.*, 2002; Oray *et al.*, 2004). Encara que aquests canvis en l'expressió gènica no s'han documentat en models animals, s'ha vist que les rates exposades a inhibidors de MMP disminueixen la CPP i la recaiguda (Brown *et al.*, 2007).

#### *Comunicació sinàptica i neuroplasticitat*

L'observació de canvis neuroanatòmics en l'estructura sinàptica amb el consum crònic de cocaïna, fa pensar en l'existència de canvis d'expressió en els 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), que codifiquen neuropèptids (com la prodinorfina i el transcrit regulat per cocaïna i amfetamina o CART) i relacionats amb la síntesi de neurotransmissors (glutamat decarboxilasa 1), plasticitat neuronal (com la tubulina i l'axotrofina) i guia axonal (com la semaforina 6A i l'oligofrenina) (Chen *et al.*, 1999; Lehrmann *et al.*, 2003; Albertson *et al.*, 2004; Lehrmann *et al.*, 2006; Mash *et al.*, 2007). 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 relacionats amb l'augment de LTP i l'aprenentatge espacial que s'observen en models animals d'abús de cocaïna (Del Olmo *et al.*, 2006; Del Olmo *et al.*, 2007; Schoenbaum & Shaham, 2008).

#### *Receptors, canals iònics i transportadors*

A la sinapsi, els receptors, els transportadors i els canals iònics estan situats tant a la membrana presinàptica com a la post-sinàptica. El canvi més descrit és la disminució de l'expressió del transportador DAT/SLC6A3 (Chen *et al.*, 1999; Bannon *et al.*, 2002). També estan alterats els receptors de DA, com el receptor D2 i D3. Altres sistemes de neurotransmissió pateixen canvis en l'expressió dels seus receptors, com és el cas dels receptors glutamatèrgics (GRIN1, GRIA2, GRIK 1 i GRIK5) i opioides (mu i kappa) (Hurd & Herkenham, 1993; Segal *et al.*, 1997; Mash & Staley, 1999; Lehrmann *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003; Hemby *et al.*, 2005; Mash *et al.*, 2007). Aquests canvis d'expressió en els sistemes de neurotransmissió esmentats anteriorment són consistents amb els que s'observen en estudis realitzats en models animals. Tot i que en humans no s'ha descrit, en animals també s'ha observat l'alteració de l'expressió d'alguns receptors gabaèrgics (receptors A i B) (Backes & Hemby, 2003).

#### *Oligodendròcits i mielina*

Els oligodendròcits són les cèl·lules responsables de produir mielina, la capa fosfolipídica que recobreix els axons del SNC. La transmissió dels impulsos elèctrics al llarg de la neurona depenen de la presència i bon funcionament d'aquesta capa aïllant. L'expressió de tres components de la mielina està disminuïda en individus que abusen de la cocaïna (Lehrmann *et al.*, 2003; Albertson *et al.*, 2004; Bannon *et al.*, 2005): els dos components majoritaris de la mielina (proteïna bàsica de la mielina, MBP, i la proteïna proteolipídica 1, PLP1) i també la proteïna bàsica associada a



mielina oligodendrocítica (MOBP). De forma consistent, un estudi recent de neuroimatge ha detectat alteracions mielíniques en pacients dependents de cocaïna (Moeller *et al.*, 2007). En animals, en canvi, no s'han descrit alteracions de l'expressió gènica associades a la mielina.

#### *Apoptosi i mort cel·lular*

Canvis en l'expressió de proteïnes intracel·lulars de diferents funcions podrien contribuir als efectes neurotòxics de les drogues d'abús. Un augment de l'apoptosi neuronal podria jugar un paper important en els canvis anatòmics i comportamentals que es produeixen després de l'exposició a cocaïna. 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 requiem (*DPF2*) (Mash *et al.*, 2007). Encara que s'ha observat apoptosi induïda per cocaïna en cèl·lules *in vitro* fetals, de progenitor neuronal i PC12 (Oliveira *et al.*, 2003; Dey & Snow, 2007; Poon *et al.*, 2007), els efectes *in vivo* en models animals són menys concloents. En animals adults no s'han identificat canvis en l'expressió de gens proapoptòtics, al contrari que en els estudis humans.

#### *Funció mitocondrial*

La funció mitocondrial sembla estar també regulada de forma diferencial en resposta a la cocaïna. S'han observat canvis en gens implicats en el metabolisme i funció mitocondrial com ara l'ATP sintasa mitocondrial i la malat deshidrogenasa (Lehrmann *et al.*, 2003). Això era d'esperar tenint en compte els nombrosos estudis de neuroimatge en humans, primats i ratolins que demostren que hi ha reduccions en l'activitat metabòlica del cervell associades al consum de cocaïna (London *et al.*, 1990; Volkow *et al.*, 1992; Beveridge *et al.*, 2006; Thanos *et al.*, 2008).

#### *Transducció de senyal*

A partir del gran nombre de gens l'expressió dels quals està desregulada pel consum de cocaïna, s'han identificat dues vies de transducció de senyal que, a més, estan alterades per altres drogues d'abús (Li *et al.*, 2008). La primera, la via de les proteïna-cinases activades per mitògens (*mitogen activated protein kinases*, MAPK), és una cascada de senyalització que engloba la regulació de diferents processos, que inclouen la supervivència cel·lular, la neuroplasticitat i l'expressió de diversos gens (Radwanska *et al.*, 2005; Ferguson *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 de glutamat NMDA i AMPA.

#### *Factors de transcripció*

Les cascades de senyalització induïdes per estímuls acostumen a finalitzar amb l'activació de l'expressió de factors de transcripció. Tot i que s'han identificat canvis d'expressió de diferents

factors de transcripció tant en humans com en animals, hi ha un grup de gens identificat únicament en models animals anomenats gens primerencs immediats (*immediate early genes*: IEGs). Els IEGs funcionen com a resposta ràpida i transitòria a estímuls que posteriorment donen lloc a respostes de llarga durada. En els estudis humans no s'han detectat canvis en la seva expressió possiblement perquè l'exposició a la droga és crònica i a través de llargs períodes. Entre els IEGs alterats en animals hi ha c-fos, c-jun, fosB, homer1a i la proteïna associada a activitat relacionada amb el citoesquelet (ARC) (Hope *et al.*, 1992; Nestler, 1993; Couceyro *et al.*, 1994; Berke *et al.*, 1998; Kuzmin & Johansson, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999; Yuferov *et al.*, 2003; Courtin *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2008). El nivell d'expressió d'una variant de *splicing* més curta de fosB ( $\Delta$ fosB) s'altera amb l'administració crònica de cocaïna en rates, amb diverses conseqüències sobre la conducta de l'animal (Hiroi *et al.*, 1997; Winstanley *et al.*, 2007).

Finalment, caldria mencionar un estudi sobre la regulació de la cromatina a nivell genòmic realitzat en ratolí, en què es destaca el paper important de  $\Delta$ fosB i CREB, així com les sirtuïnes 1 i 2 en les vies regulades per la cocaïna (Renthal *et al.*, 2009).

### **2.1.4.3. Factors genètics de susceptibilitat a la dependència de cocaïna**

#### **2.1.4.3.1. Heretabilitat de la dependència de cocaïna**

La dependència de cocaïna és una malaltia complexa i multifactorial, on juguen un paper important factors ambientals i genètics. Estudis familiars i de bessons mostren evidències de l'existència d'una forta component genètica en la dependència de cocaïna. Així, hi ha un major risc de desenvolupar dependència de cocaïna en familiars de primer grau de pacients dependents d'aquesta droga que en familiars d'individus control, amb un risc relatiu 4,4 vegades superior (Merikangas *et al.*, 1998). D'altra banda, estudis en parelles de bessons constaten que hi ha una major concordança entre bessons monozigòtics que en dizigòtics. Aquests estudis permeten estimar una heretabilitat (la proporció de la variació fenotípica atribuïble a la variació genètica) del 65% al 79% en la dependència de cocaïna (Kendler & Prescott, 1998; Stevens, 1999; Kendler *et al.*, 2000).

#### **2.1.4.3.2. Estudis d'associació genètica amb la dependència de cocaïna**

Una de les metodologies més emprades per a la identificació de factors genètics de susceptibilitat a les malalties complexes (com la dependència de cocaïna) és la dels estudis d'associació de tipus cas-control. 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: (a) poblacionals, en què la mostra control consisteix en individus no relacionats amb els casos (els més utilitzats fins ara en el cas de la dependència de cocaïna) i (b) familiars, en què s'utilitzen normalment famílies nuclears amb un únic fill afectat, i on la mostra control consisteix en els al·lèls 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, amb l'adveniment de les tecnologies de seqüenciació massiva o *next-generation sequencing (NGS)*, s'estan començant a considerar també variants poc comunes 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.

D'altra banda, els estudis d'associació amb 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, 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 variacions del número de còpies (*Copy Number Variation, CNV*), que també han estat i són objecte d'estudi.

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 d'estudis previs com ara estudis farmacològics, d'expressió, de neuroimatge, estudis realitzats en animals genoanul·lats o transgènics; ii) Estudis a escala genòmica (*Genome Wide Association Studies, GWAS*) que analitzen polimorfismes que cobreixen tot el genoma.

#### *Estudis d'associació amb gens candidats*

D'entre els gens candidats estudiats en relació a la dependència de cocaïna hi ha gens del sistema dopaminèrgic, serotoninèrgic, opioide, endocannabinoide, colinèrgic, gens que codifiquen proteïnes implicades en la síntesi i degradació de neurotransmissors, neuropèptids, factors neurotròfics, moduladors de l'activitat sinàptica, enzims detoxificants i gens implicats en el control dels ritmes circadians (Taula 9). Tot i que la majoria de treballs s'han centrat en els sistemes de neurotransmissió dopaminèrgica i serotoninèrgica, els resultats obtinguts són poc consistents quan es comparen aquells que han analitzat els mateixos polimorfismes en un mateix gen.

**Taula 9.** Resum dels estudis d'associació realitzats en gens candidats i dependència de cocaïna.

Gen	Polimorfisme	Al·lel o genotip associat	N (casos / controls)	valor P	Població	Referència
<b>Sistema dopaminèrgic</b>						
SLC6A3 (DAT)	3' UTR VNTR	9R*	58 i 45*	0,047	Am Europ i Am Afr	Gelernter et al., 1994
		-	699 <sup>CA</sup> / 866	NS	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Guindalini et al., 2006
		-	97 / 88	NS	Carib Afr	Ballon et al., 2007
		-	347 / 257	NS	Am Afr	Lohoff et al., 2010
	Int 8 VNTR	6R 6R/6R	699 <sup>CA</sup> / 866	0,036 8 e-04	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Guindalini et al., 2006
	Int 14 Indel	-	699 <sup>CA</sup> / 866	NS	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Guindalini et al., 2006
	37-bp VNTR	-	699 <sup>CA</sup> / 866	NS	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Guindalini et al., 2006
DRD2	TaqIA	A1 (T)	53 / 265	< e-04	Am Europ	Noble et al., 1993
		-	96 / 87 i 77 / 45	NS	Am Europ i Am Afr	Gelernter et al., 1999
		-	730 / 782	NS	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Messas et al., 2005
		-	97 / 88	NS	Carib Afr	Ballon et al., 2007
		-	347 / 257	NS	Am Afr	Lohoff et al., 2010
	TaqIB	B1 (A)	52 / 53	< e-02	Europ Am	Noble et al., 1993
	TaqID	-	96 / 87 i 77 / 45	NS	Am Europ i Am Afr	Gelernter et al., 1999
DRD3	Ball	-	62 i 62	NS	Am Europ i Am Afr	Freimer et al., 1996
		heterozigot	47 / 305	0,028	Caucàsics	Comings et al., 1999
	-	730 / 782	NS	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Messas et al., 2005	
	-	97 / 88	NS	Carib Afr	Ballon et al., 2007	
DRD4	Exó 3 VNTR	-	97 / 88	NS	Carib Afr	Ballon et al., 2007
	9 SNPs	-	348 / 257	NS	Am Afr	Bloch et al., 2009
<b>Sistema serotoninèrgic</b>						
SLC6A4 (SERT)	VNTR	-	105 / 44	NS	Am Afr	Patkar et al., 2002
		-	156 / 82	NS	Am Afr	Patkar et al., 2002
	LPR	L	197 / 101	0,01	Am Afr / Am Afr+Eur	Patkar et al., 2001
		-	105 / 44	NS	Am Afr	Patkar et al., 2002
		-	138 / 60	NS	Am Afr	Patkar et al., 2004
		-	141	NS	Am Afr	Mannelli et al., 2005
LPR + rs25531	SS+SL <sub>G</sub> +L <sub>G</sub> L <sub>G</sub> baixa activitat	120 <sup>HD</sup> / 172	0,011	Am Afr	Enoch et al., 2010	
5-HT1B	T-261G -184/-183 del -182/-181 del A-161T C129T G861C A1180G	-	63 + 23 <sup>CA</sup> / 94	NS	Am (Cau, Afr i Hisp)	Cigler et al., 2001
5-HT3A	7 SNPs	-	131 <sup>HD</sup> / 177	NS	Am Afr	Enoch et al., 2010
5-HT3B	9 SNPs	-	131 <sup>HD</sup> / 177	NS	Am Afr	Enoch et al., 2010

Taula 9. (Continuació)

Gen	Polimorfisme	Al·lel o genotip associat	N (casos / controls)	valor P	Població	Referència
<b>Sistema opioide</b>						
OPRM1	A118G	-	total 891 (ND)	NS	Diverses poblacions <sup>&amp;</sup>	Gelernter et al., 1999
		-	52/358 i 54/110	NS	Am Europ i Am Afr	Luo et al., 2003
	C17T	-	total 891 (ND)	NS	Diverses poblacions <sup>&amp;</sup>	Gelernter et al., 1999
		-	52/358 i 54/110	NS	Am Europ i Am Afr	Luo et al., 2003
C-2044A T-1793A T-1469C	-		NS	Am Europ i Am Afr	Luo et al., 2003	
OPRD1	11 SNPs	GCAACT	225 / 443	2 e-03	Am Europ	Zhang et al., 2008
OPRK1	7 SNPs	-	177 / 358	NS	Am Europ	Zhang et al., 2008
<b>Sistema endocannabinoide</b>						
CNR1	(AAT) <sub>n</sub>	12R	97 <sup>E</sup> + 45 <sup>NE</sup> / 88	< e-04	Carib Afr	Ballon et al., 2006
	rs6928499 rs806379 rs1535255 rs2023239	-	340/388 i 268/84	NS	Eur Am i Afr Am	Herman et al., 2006
	8 SNPs	Interacció rs6454674 G/- i rs806368 T/T	734/862 i 834/619	7 e-03	Am Europ i Am Afr	Zuo et al., 2009
<b>Sistema colinèrgic</b>						
CHRNA5	rs16969968	G	504 / 814	4 e-03	Am Europ	Grucza et al., 2008
<b>Síntesi i degradació de neurotransmissors</b>						
DBH	5' Indel 444G>A	Haplotip Del- a**	45 / 145	3 e-04	Am Europ	Cubells et al., 2000
	-1021 C>T	-	689 / 832	NS	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Guindalini et al., 2008
TPH2	6 SNPs	-	299 / 208	NS	Am Europ	Dahl et al., 2006
COMT	rs737865 Val158Met rs165599	158Met	330 / 255	4 e-03	Am Afr	Lohoff et al., 2008
<b>Neuropèptids</b>						
PDYN	5' UTR VNTR	1R + 2R	61 + 22 <sup>CA</sup> / 91	0,042	Am Eur, Afr i hisp	Chen et al., 2002
		3R + 4R	167 / 88	0,018	Am Afr	Dahl et al., 2005
		3R + 4R	82 + 93 <sup>AD</sup> / 127	ND	Am Afr, cau i hisp	Williams et al., 2007
	6 SNPs	rs910080/ rs910079/ rs2235749 CTT	61 + 67 <sup>AD</sup> / 76 17 + 24 <sup>AD</sup> / 65	7 e-03	Am Europ i Am Afr	Yuferov et al., 2009
CARTPT	rs6894758 rs11575893 rs17358300	-	348 / 256	NS	Am Afr	Lohoff et al., 2008
NPY	7 SNPs	-	47 + 208 <sup>AD</sup> / 1000	NS	Am Europ (E. Fam)	Wetherill et al., 2008

Taula 9. (Continuació)

Gen	Polimorfisme	Al·lel o genotip associat	N (casos / controls)	valor P	Població	Referència
NPY1R	10 SNPs	-	47 + 208 <sup>AD</sup> / 1000	NS	Am Europ (E. Fam)	Wetherill et al., 2008
NPY2R	15 SNPs	rs4425326 rs2342675 rs4333136 rs6857715 rs17304901	47 + 208 <sup>AD</sup> / 1000	0,02 0,03 4 e-03 5 e-04 5 e-03	Am Europ (E. Fam)	Wetherill et al., 2008
NPY5R	7 SNPs	-	47 + 208 <sup>AD</sup> / 1000	NS	Am Europ (E. Fam)	Wetherill et al., 2008
TACR3	30 SNPs	rs2765 rs4580655 rs1813782 rs11722288 rs1384401 rs3796962 rs11725038	47 + 208 <sup>AD</sup> / 1000	7 e-03 9 e-03 0,04 0,02 0,02 0,01 6 e-03	Am Europ (E. Fam)	Foroud et al., 2008

### Factors neurotròfics

CDNF	rs11259365 rs7094179 rs7900873	-	351 / 257	NS	Am Afr	Lohoff et al., 2009
------	--------------------------------------	---	-----------	----	--------	---------------------

### Moduladors activitat sinàptica

HOMER1	rs6871510 rs772760 rs2290639	rs6871510 C/C	170 / 90	0,029	Am Afr	Dahl et al., 2005
HOMER2	rs17294476 rs2271275 rs7174089	-	170 / 90	NS	Am Afr	Dahl et al., 2005
PAR-4	rs10862006 rs10778686 rs872455 rs12825416 rs23072200	-	172 / 92	NS	Am Afr	Weller et al., 2006
GRK3	rs576895 rs558934 rs5761116	-	711 <sup>CA</sup> / 862	NS	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Guindalini et al., 2007
CALCYON	29521 A>G 297 G>T	-	90 / 46 i 118 / 207	NS	Am Europ i Am Afr	Luo et al., 2004

### Enzims detoxificants

GSTP1	Ile105Val	Ile/Ile Ile	645 / 572	0,03 0,01	Brasil (Cau, Afr i Asia)	Guindalini et al., 2005
ADH4	7 SNPs	rs1042363	317 / 317	7 e-03	Am Europ	Luo et al., 2005

### Ritmes circadians

CLOCK	3111 T>C	-	202/480 70/66	NS	Am Europ i Am Afr	Malison et al., 2006
PER1	2548 A>G	-	202/480 70/66	NS	Am Europ i Am Afr	Malison et al., 2006
PER2	Glu1244Gly	-	202/480 70/66	NS	Am Europ i Am Afr	Malison et al., 2006

NS, no significatiu; ND, accés a la informació no disponible. SLC6A3, transportador de dopamina; DRD2, DRD3 i DRD4, receptors de dopamina D2, D3 i D4 respectivament; SLC6A4, transportador de serotonina; 5-HT1B, 5-HT3A i 5-HT3B, receptors de serotonina 1B, 3A i 3B respectivament; OPRM1, OPRD1 i OPRK1, receptors opioides mu, delta i kappa respectivament; CNR1, receptor cannabinoide 1; CHRNA5, subunitat  $\alpha 5$  del receptor nicotínic d'acetilcolina; DBH,

dopamina beta-hidroxilasa; *TPH2*, triptòfan hidroxilasa 2; *COMT*, catecol-O-metiltransferasa; *PDYN*, prodinorfina; *CARTPT*, transcrit regulat per cocaïna i amfetamina; *NPY*, neuropeptid Y; *NPY1R*, *NPY2R* i *NPY5R*, receptors del neuropeptid Y tipus 1, 2 i 5 respectivament; *TACR3*, receptor 3 de la taxiquinina i B de la neuroquinina; *CDNF*, factor neurotròfic cerebral de dopamina; *HOMER1* i *HOMER2*, homòlegs 1 i 2 d'homer (drosòfila); *PAR-4*, proteïna 4 de resposta a apoptosi a pròstata; *CALCYON*, proteïna vesicular específica de neurona calcyon; *GSTP1*, glutatí S-transferasa pi 1; *ADH4*, alcohol deshidrogenasa 4; *CLOCK*, proteïna *circadian locomoter output cycles kaput*; *PER1* i *PER2*, homòlegs 1 i 2 de period (drosòfila).

<sup>AD</sup> Casos dependents de cocaïna i d'alcohol; <sup>HD</sup> Dependents de cocaïna i d'heroïna; <sup>CA</sup> Casos només amb abús de cocaïna; <sup>E</sup> Casos dependents de cocaïna que presenten esquizofrenia; <sup>NE</sup> Casos dependents de cocaïna i sense esquizofrenia. Am Europ, americans d'origen europeu; Am Afr, americans d'origen africà; Am Hisp, americans d'origen hispànic; Cau, caucàsic; E. Fam, estudi familiar. <sup>&</sup> Americans d'origen europeu, americans d'origen africà, americans d'origen hispànic i japonesos, etiòps, beduïns i jueus Ashkenazi.

\* Estudi realitzat només en individus dependents de cocaïna amb i sense paranoia induïda per la cocaïna. Valor P corresponent a població blanca. \*\* Haplotip associat a paranoia induïda per cocaïna (comparació entre individus que presenten paranoia vs individus que no la presenten).

### Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS)

S'ha realitzat també alguns estudis a escala genòmica (GWAS) amb abús o dependència de drogues (Uhl *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008; Drgon *et al.*, 2010) (Taula 10), en què, majoritàriament, es considerava conjuntament una mostra de casos formada per individus que presentaven abús o dependència d'una droga, com a mínim. Aquests estudis han permès identificar associacions significatives amb alguns gens interessants com els que codifiquen proteïnes implicades en adhesió cel·lular, neurotrofines (*BDNF*), moduladors sinàptics (*NRXN3*), receptors de glutamat, gens que codifiquen proteïnes implicades en senyalització cel·lular (com diferents subunitats de la proteïnasa k) i factors de transcripció, entre d'altres.

**Taula 10.** Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS) amb abús o dependència de drogues.

N (casos/controls)	Població	Nº SNPs	Gens	Referència
415 <sup>SD</sup> / 239 i 252 <sup>SD</sup> / 99	Am Europ i Am Afr	1.494	<i>ADH3</i> i <i>BDNF</i>	Uhl <i>et al.</i> , 2001
392 <sup>SD</sup> / 240 i 440 <sup>SD</sup> / 181	Am Europ i Am Afr	11.482	<i>RGS5</i> , <i>TSSC1</i> , <i>PDE11A</i> , <i>KIAA1276</i> , <i>PPP3CA</i> , <i>PHF15</i> , <i>HB1</i> , <i>LSM11</i> , <i>OFCC1</i> , <i>Utrophin</i> , <i>TM4SF13</i> , <i>cordon-bleu hom</i> , <i>Atrophin interaction proein t1</i> , <i>PPP1R3A</i> , <i>SLC35B4</i> , <i>GATA binding protein</i> , <i>OR5AK2/3</i> , <i>SYT14L</i> , <i>NRXN 3</i> , <i>RYR3</i> , <i>FLJ40319</i>	Liu <i>et al.</i> , 2005
420 <sup>SD</sup> / 320 i 560 <sup>SD</sup> / 360	Am Europ i Am Afr	639.401	> 80 gens Cluster adhesió cel·lular	Liu <i>et al.</i> , 2006
575 <sup>CD</sup> i 709 <sup>CD</sup>	Am Europ i Am Afr (E. Fam)	5.633	<i>LRRC7</i> , <i>SYT13</i> , <i>KLHL5</i> , <i>ODZ3</i> , <i>ATP9B</i> , <i>MGC48628</i> , <i>MANEA*</i> , <i>DHAH8*</i> , <i>NARG2*</i> , <i>TYK2*</i>	Yu <i>et al.</i> , 2008
400 <sup>SD</sup> / 280 i 700 <sup>SD</sup> / 240	Am Europ i Am Afr	1 milió	> 100 gens Interessants: <i>NRXN3</i> , <i>GABBR2</i> , <i>GRIK2</i> , <i>GRIA4</i> , <i>SEMA6D</i> , <i>PRKCE</i> , <i>PRKCH</i> , <i>OPRD1</i> , <i>GRM7</i> i <i>GRM5</i>	Drgon <i>et al.</i> , 2010

<sup>SD</sup> Individus amb abús de drogues i dependència com a mínim d'una d'elles, <sup>CD</sup> individus dependents de cocaïna. Am Europ, americans d'origen europeu; Am Afr, americans d'origen africà; E. Fam, estudi familiar. \* Gens associats amb paranoia induïda per cocaïna.

### **2.1.4.3.3. Gens candidats a participar en la susceptibilitat a la dependència de cocaïna estudiats en aquest treball**

En aquest treball s'ha avaluat la possible contribució a la susceptibilitat genètica a la dependència de cocaïna de gens relacionats amb els sistemes de neurotransmissió dopaminèrgica i serotoninèrgica (veure Caixes 4 i 5), per la implicació d'ambdós sistemes en la dependència de cocaïna demostrada en els estudis que s'han mencionat anteriorment. També s'han avaluat gens que codifiquen factors neurotròfics i els seus receptors, implicats en neuroadaptacions i plasticitat sinàptica, i gens que codifiquen molècules implicades en la regulació de la neurosecreció.

#### **2.1.4.3.3.1. Factors neurotròfics**

Els factors neurotròfics (*Neurotrophic Factors*, NTFs) són un grup important de proteïnes secretades que regulen la vida i mort de les neurones durant el desenvolupament. Diferents NTFs afecten grups específics de subpoblacions neuronals que presenten els seus receptors. Durant el desenvolupament, els NTFs protegeixen contra l'apoptosi i regulen el nombre de neurones que innerven el teixit diana. A més els NTFs regulen la migració, diferenciació i maduració dels precursors mitòtics neuronals (Hagg, 2009; Lindholm & Saarma, 2010). Hi ha tres famílies de NTFs: i) La família del factor neurotròfic derivat de línia cel·lular de la glia (GDNF); ii) Neurotrofines; iii) Citoquines neuropoiètiques també conegudes com la família de la interleuquina 6; iv) Família dels factors neurotròfics de dopamina cerebral (CDNF) i del derivat d'astròcits mesencefàlics (MANF), descoberta recentment.

En aquest treball ens hem centrat en les neurotrofines i en el factor neurotròfic ciliar (CNTF) de la família de les citoquines.

Les neurotrofines són un tipus de factor neurotròfic específic del sistema nerviós dels vertebrats amb un paper essencial en la supervivència, diferenciació i proliferació neuronal durant el desenvolupament del sistema nerviós central i perifèric. Aquestes molècules estimulen el creixement axonal i tenen influència sobre les connexions axó-teixit diana per l'establiment de connexions sinàptiques (Thoenen *et al.*, 1987b; Grimes *et al.*, 1996; Yuen & Mobley, 1996; Connor & Dragunow, 1998). En el sistema nerviós adult, les neurotrofines controlen la plasticitat i eficiència sinàptica, i són essencials per al manteniment del fenotip i les funcions neuronals (Knipper *et al.*, 1994; Prakash *et al.*, 1996; Altar *et al.*, 1997; Bartrup *et al.*, 1997). A més de promoure la diferenciació i creixement de les neurones durant el desenvolupament i la seva supervivència i manteniment en l'adult, hi ha evidències que suggereixen que algunes neurotrofines juguen un paper essencial en la protecció neuronal del sistema nerviós dels vertebrats, modulant la plasticitat neuronal necessària durant l'envelliment o sota condicions traumàtiques i degeneratives (Blesch *et al.*, 1998). La família de les neurotrofines està formada per diferents membres altament homòlegs que inclouen el factor de creixement nerviós (NGF; (Levi-Montalcini & Angeletti, 1968; Levi-Montalcini, 1987; Thoenen *et al.*, 1987a)); el factor



neurotròfic derivat de cervell (BDNF; (Leibrock *et al.*, 1989)), la neurotrofina 3 (NT3; (Snider & Johnson, 1989; Hohn *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990)) i la neurotrofina 4/5 (NT4/5; (Berkemeier *et al.*, 1991; Hallbook *et al.*, 1991)). La neurotrofina-6 (NT-6) i la neurotrofina-7 (NT-7) tenen una gran homologia amb totes les anteriors però s'han identificat únicament en el peix teleosti *Xiphophorus* (Gotz *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1998). Les neurotrofines se secreten de forma constitutiva i regulada en neurones i cèl·lules neuroendocrines o únicament de forma constitutiva en cèl·lules no neuronals (Seidah *et al.*, 1996). Actuen mitjançant la seva unió a receptors específics d'alta afinitat de la família de les tirosines cinasa (NTRKs o TRKs). Així, NTRK1 (o TRKA) és el receptor d'alta afinitat de NGF, mentre que NTRK2 (o TRKB) s'uneix a BDNF i NT4/5 (Kaplan *et al.*, 1991; Klein *et al.*, 1991). Alhora, aquests dos receptors reconeixen NT3 com a lligand secundari. Per altra banda, NTRK3 (o TRKC) és el receptor específic de NT3 i reconeix a NT4/5 amb menor afinitat (Barbacid *et al.*, 1991; Lamballe *et al.*, 1991; Rodriguez-Tebar *et al.*, 1992; Lindsay *et al.*, 1994; Barbacid, 1995). A més, totes les neurotrofines s'uneixen a un únic receptor de baixa afinitat conegut com a p75 (Rodriguez-Tebar *et al.*, 1992; Barbacid, 1995). Els receptors NTRKs tenen un domini intracel·lular tirosina cinasa, un petit domini transmembranós i un domini extracel·lular d'unió a lligand que interactua selectivament amb les diferents neurotrofines. Un cop la neurotrofina s'uneix al seu receptor NTRK específic, aquest dimeritza, s'autofosforila i s'inicien cascades complexes de senyalització intracel·lular que, en darrer terme, determinaran canvis transcripcionals com a resposta de la cèl·lula diana (Barbacid *et al.*, 1991; Barbacid, 1995). El patró d'expressió de les diferents neurotrofines se solapa en algunes regions del SNC i la seva acció afecta majoritàriament diferents subpoblacions neuronals. Així, l'expressió del NGF està restringida a l'hipocamp i el neocòrtex i actua sobre les neurones colinèrgiques del prosencèfal basal que projecten a l'hipocamp i a l'escorça (Thoenen *et al.*, 1987a; Maisonpierre *et al.*, 1991). BDNF s'expressa de forma abundant a l'hipocamp, neocòrtex, amígdala, cerebel i hipotàlem i manté la supervivència i diferenciació de les neurones colinèrgiques, noradrenèrgiques, dopaminèrgiques, serotoninèrgiques, GABAèrgic i neuropeptídiques de l'hipotàlem (Alderson *et al.*, 1990; Hyman *et al.*, 1991; Knusel *et al.*, 1991; Maisonpierre *et al.*, 1991; Altar *et al.*, 1992; Friedman *et al.*, 1993; Altar *et al.*, 1994; Mizuno *et al.*, 1994; Rylett & Williams, 1994; Shen *et al.*, 1994; Mamounas *et al.*, 1995; Sklair-Tavron & Nestler, 1995; Siuciak *et al.*, 1996; Siuciak *et al.*, 1998; Horger *et al.*, 1999; Mamounas *et al.*, 2000; Akbarian *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2002; Fumagalli *et al.*, 2003). NT-3 s'expressa quasi de forma ubíqua al SNC, majoritàriament a l'escorça, hipocamp, tàlem i cerebel, i s'encarrega de la supervivència de les neurones noradrenèrgiques (Arenas & Persson, 1994; Zhou & Rush, 1994). Finalment, NT4/5 s'expressa a l'hipocamp, neocòrtex, cerebel i nuclis del tàlem postnats i la seva funció sembla que se solapa amb l'acció de BDNF (Friedman *et al.*, 1998).

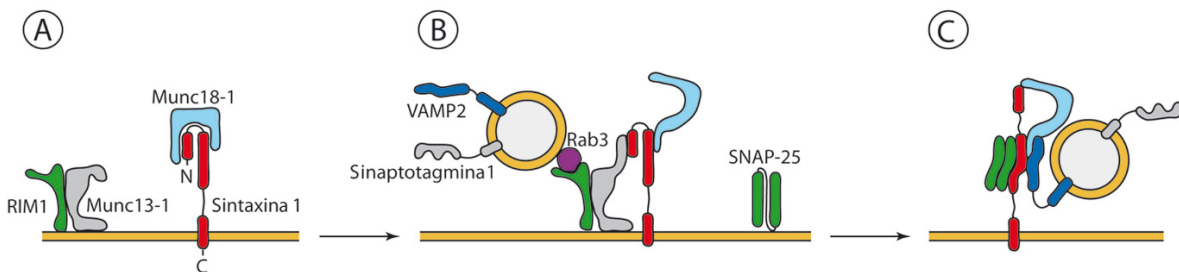
Les citoquines neuronals constitueixen una família de NTFs heterogènies entre les quals s'inclouen el CNTF, factor inhibitori de leucèmia (LIF), l'oncoestatina M (OSM) i l'interleuquina 6 (IL6). El CNTF té un paper molt important en la neurogènesi del SNC i el SNP en l'individu adult i actua a través del seu receptor CNTFR (que té una gran homologia amb el receptor d'IL6). CNTF promou la síntesi de neurotransmissors i el creixement de neurites en diverses

poblacions neuronals, però també intervé en la diferenciació dels astròcits i en la supervivència i maduració dels oligodendròcits (Ip & Yancopoulos, 1996). A més s'ha vist que està lligat a la DA: s'ha descrit que és un component regulador endògen de la neurogènesi dependent de receptor D2 de DA a la regió subventricular i a l'hipocamp (Mori *et al.*, 2008).

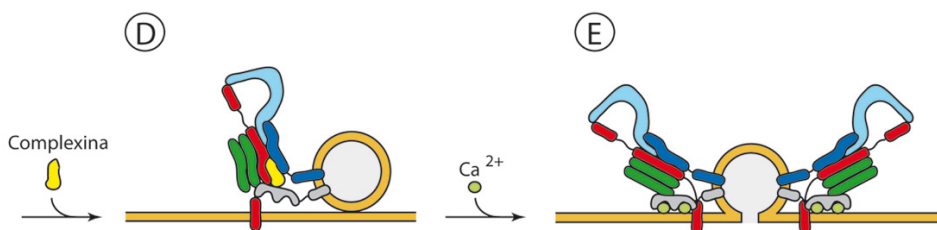
### 2.1.4.3.2. Control de la neurosecreció sinàptica: complex SNARE

L'exocitosis sinàptica és un tipus de fusió de membranes regulada molt finament i d'alta complexitat que requereix una sincronització temporal i espacial molt precises (Rizo & Rosenmund, 2008). Les vesícules sinàptiques estan fixades a la membrana en prevenció d'una fusió prematura en absència de calci. En arribar un potencial d'acció a la zona presinàptica, es produeix una entrada de calci a través dels canals dependents de voltatge i s'alliberen neurotransmissors de forma extremadament ràpida (Carr & Munson, 2007). Entre els components implicats en l'alliberament de neurotransmissors hi ha proteïnes que participen en mecanismes generals de transport, connexió i fixació a membrana (per exemple Munc18-1, Munc13, RIM, sinaptofisina, Rab3), de fusió (sinaptobrevina, syntaxina, SNAP25) i reciclatge (NSF, aSNAP), així com altres proteïnes especialitzades amb funcions de control de l'exocitosi (sinaptotagmina, complexina) (Carr & Munson, 2007; Rizo & Rosenmund, 2008) (Fig. 14). Els efectors en la fusió de membranes són

#### Regulació de l'ensamblatge de SNARE



#### Ensamblatge del SNAREpin i fusió provocada per $Ca^{2+}$

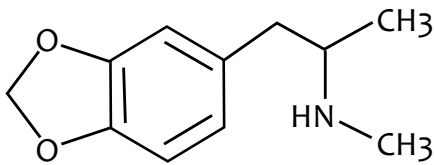


**Figura 14.** Model de formació i fusió de vesícules amb la membrana neuronal desencadenada per calci a la sinapsi. Es mostren els components reguladors principals i el seu lloc d'acció. A) Munc18-1 unit a la conformació "tancada" de la syntaxina1. B) De l'ancoratge d'una vesícula sinàptica en resulta un complex format per RIM1, Rab3 i Munc13-1 que podria catalitzar la conversió de la syntaxina1 a una conformació "oberta". C) SNAP-25 s'uneix a la syntaxina1 per formar el complex trans-SNARE, que és reconegut pel VAMP2 de les vesícules donant lloc a la formació de l'anomenat SNAREpin. D) la complexina s'uneix als SNAREpins i impedeix el tancament del complex SNARE, actuant com a fixador. E) La sinaptotagmina1 fa saltar la complexina quan augmenta la concentració de  $Ca^{2+}$  i provoca l'obertura del porus de fusió. Adaptat de Malsam *et al.*, 2008.

les proteïnes del complex SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor*), amb motius SNARE, que interactuen entre elles per formar aquest complex. La formació d'aquesta estructura és progressiva i comporta canvis conformacionals. S'anomena trans-SNARE quan les proteïnes del complex estan ancorades a membranes aposades i cis-SNARE quan estan unides a la mateixa membrana (Ungar & Hughson, 2003; Carr & Munson, 2007; Malsam *et al.*, 2008; Rizo & Rosenmund, 2008) Yoon i Shin 2008). El plegament de les proteïnes durant la formació de diversos complexos SNARE (entre 3 i 17) disposats formant un anell al voltant del punt de fusió, aporta energia que excedeix la requerida per a la fusió de membranes. Calen diversos elements reguladors per estabilitzar els estadis intermediaris i assistir el complex SNARE perquè completi la reacció de fusió en el moment i lloc precís (Carr & Munson, 2007; Malsam *et al.*, 2008; Rizo & Rosenmund, 2008; Yoon *et al.*, 2008) (Fig. 14). Els complexos SNARE en estat post-fusió estan completament plegats i presenten tots els motius SNARE localitzats a la mateixa membrana (cis-SNARE), són extremadament estables i s'han de disgregar per poder tornar-se a reutilitzar (Malsam *et al.*, 2008; Rizo & Rosenmund, 2008)). La vesícula pre-sinàptica és reclutada gràcies a la formació del trans-SNARE (interacció entre les proteïnes de la vesícula i de la membrana sinàptica) i estabilitzada per impedir la fusió prematura. L'augment de la concentració de  $Ca^{2+}$  intracel·lular, causat per la despolarització de la membrana neuronal, és detectat per la sinaptotagmina i s'allibera la complexina, tot provocant la fusió de la vesícula amb la membrana presinàptica, alliberant-se el contingut de neurotransmissors a l'espai sinàptic (Fig. 14)(Malsam *et al.*, 2008).

## 2.2. ÈXTASI (MDMA)

L'èxtasi o MDMA (3,4-metilendioximetamfetamina) és un derivat de l'amfetamina amb una substitució d'un anell metilendioxi (Fig. 15). Tot i que està estructuralment relacionat amb el compost al·lucinogen mescalina, l'MDMA produeix efectes psicoactius únics que difereixen tant dels efectes al·lucinògens com dels psicoestimulants de la família (fenetilamines) (Baylen & Rosenberg, 2006).



**Figura 15.** Estructura química del MDMA (3,4-metilendioximetamfetamina,  $C_{11}H_{15}NO_2$ ).

L'MDMA es va patentar a Alemanya l'any 1914. Els anys 80 l'MDMA es va començar a utilitzar en psicoteràpia i es creia que augmentava l'autoestima dels pacients i facilitava la comunicació terapèutica. Posteriorment es va il·legalitzar a causa del seu gran potencial d'abús, falta d'aplicació clínica, manca de seguretat per a l'ús mèdic, i l'evidència de que el

3,4-metilendioxi-amfetamina (MDA), metabòlit majoritari de l'MDMA, induïa la degeneració de les terminals de 5-HT en cervell de rata (Ricaurte *et al.*, 1985). Tot i així, l'MDMA ha esdevingut una droga recreacional molt emprada. Donat que es preparen i s'obtenen il·licitament, tant les dosis com la puresa dels comprimits o càpsules d'MDMA varien enormement. L'aparició dels primers efectes de la droga pot tardar entre 20 i 60 minuts amb un pic màxim entre els 60 i 90 minuts després de la ingesta i una durada d'entre 3 i 5 hores (Green *et al.*, 2003; Koob & Le Moal, 2006).

### 2.2.1. Dades epidemiològiques del consum d'èxtasi

S'estima que vora 10 milions d'adults europeus han provat l'èxtasi (una mitjana del 3,1%) i que uns 2,5 milions (0,8%) en van consumir durant l'any 2008 (2009 Annual report on the state of the drugs problem in Europe, EMCDDA). Hi ha variacions considerables entre països: entre el 0,3% i el 7,5% dels adults d'entre 15 i 64 anys han provat aquesta droga en algun moment, i la prevalença de consum al llarg de la vida oscil·la entre l'1 i el 5%. Espanya està entre els països amb la prevalença de consum al llarg de la vida més elevada, amb un 3,8% entre 15 i 64 anys.

El consum d'èxtasi és més gran en homes que en dones, i és molt més freqüent entre els joves adults (15-34 anys), pels quals la prevalença de consum al llarg de la vida a Europa oscil·la entre el 0,6 i el 14,6%.

## 2.2.2. Clínica del consum d'èxtasi

### *Efectes del consum agut d'èxtasi*

L'èxtasi es consumeix amb finalitats recreatives i els consumidors descriuen efectes com eufòria, simpatia i augment d'energia (Taula 11). També descriuen efectes sobre el comportament sexual (excitació sexual, alerta sensual, millora del sexe i major lubricació en dones), percepció sensorial (efectes visuals, al·lucinacions sonores i augment del sentit del tacte), manca de son i disminució de la gana. També s'associen a l'MDMA efectes secundaris no desitjats (ansietat i depressió) i altres conseqüències mèdiques (hipertèrmia, arítmia cardíaca i hipertensió).

**Taula 11.** Efectes aguts de l'èxtasi (Baylen & Rosenberg, 2006; Green *et al.*, 2003).

Somàtics	Emocionals	Cognitius
Canvis temperatura corporal	Eufòria	Pèrdua de memòria
Elevada pressió sanguínia	Alegria	Increment estat d'alerta
Augment ritme cardíac	Energia incrementada	Dificultat de concentració
Nàusees	Felicitat	
Sudoració	Joia	
Tremolors	Cordialitat	
Bruxisme	Simpatia	
Hiperreflèxia	Afecte	
Incontinència urinària	Calma	
Dolor muscular o tensió	Millora de l'estat d'ànim	
Nistagme	Disminució de la desconfiança	
Insomni	Mal humor	
Sequedat bucal	Ansietat	
Pupil·les dilatades	Depressió	
	Irritabilitat	
	Atacs de pànic	
	Il·lusions paranoïdes	

### *Efectes del consum regular d'èxtasi*

Tot i que els efectes de l'MDMA sobre la recompensa i el reforç s'han descrit àmpliament, hi ha dades controvertides sobre si aquesta droga provoca dependència, tot i que els consumidors sí que presenten un ús compulsiu i escalat (Degenhardt *et al.*, 2010). El consum crònic d'MDMA pot provocar al·lucinacions visuals i il·lusions paranoïdes en el pic d'efecte de la droga, que a vegades poden persistir durant dies o setmanes juntament amb ansietat, depressió, trastorns de pànic, discapacitats cognitives i altres alteracions del comportament. També s'ha descrit psicosis crònica en alguns consumidors regulars i ansietat fòbica, comportament obsessiu-compulsiu, ansietat, psicoticisme i somatització en consumidors de diverses drogues que a més consumeixen grans quantitats d'èxtasi. És comú, també, en alguns individus que consumeixen regularment èxtasi, l'aparició de deficiències cognitives, especialment tasques relacionades amb funcions temporals, com la memòria espacial. Finalment, també s'han descrit deficiències en la memòria verbal immediata i a llarg termini i en la memòria de treball en consumidors d'MDMA (Green *et al.*, 2003; Baylen & Rosenberg, 2006).

### 2.2.3. Dianes i efecte farmacològic i neurotòxic de l'MDMA

L'MDMA és un potent alliberador i/o inhibidor de la recaptació presinàptica de 5-HT, DA, NE i acetilcolina (ACh). La interacció entre aquests sistemes expliquen els efectes particulars de l'MDMA sobre el comportament (Cole & Sumnall, 2003). L'MDMA té una gran afinitat pel SERT ( $K_i = 610$  nM) i segons el model de "bescanvi i difusió" (Fisher & Cho, 1979) facilita l'alliberament de 5-HT a través de la reversió dels transportadors plasmàtics i vesiculars, de manera que es reverteix el transport des de la terminal presinàptica o les vesícules cap a l'exterior, tot augmentant l'alliberació d'aquest neurotransmissor (Johnson *et al.*, 1986; Schmidt, 1987; Hekmatpanah & Peroutka, 1990; Rudnick & Wall, 1992; Wichems *et al.*, 1995; Crespi *et al.*, 1997; Sabol & Seiden, 1998).

L'MDMA inhibeix les descàrregues neuronals dels nuclis de rafe medials i dorsal (MRN i DRN respectivament) a través de l'activació directa o indirecta dels receptors 5-HT<sub>1A</sub> somatodendrítics (Battaglia & De Souza, 1989; Sprouse *et al.*, 1989; Piercey *et al.*, 1990; Millan & Colpaert, 1991; Darmani & Reeves, 1996) i es distingeix dels clàssics al·lucinògens serotoninèrgics perquè n'inhibeix l'activitat en regions com l'escorça prefrontal (Pan & Wang, 1991b; Pan & Wang, 1991a).

A part de l'efecte de l'MDMA sobre el sistema serotoninèrgic, l'èxtasi provoca un gran efecte en l'eflux de DA (White *et al.*, 1996; Rothman *et al.*, 2001), tot provocant també la inhibició de la recaptació i la reversió del transportador DAT (Yamamoto & Spanos, 1988; Rudnick & Wall, 1992; Crespi *et al.*, 1997; Koch & Galloway, 1997; Metzger *et al.*, 1998). Estudis de microdiàlisi indiquen que el bloqueig de l'alliberament de 5-HT induït per MDMA (ja sigui per lesions neurotòxiques o per antagonistes de SERT o 5-HT<sub>2A</sub>) disminueix significativament el subseqüent alliberament de DA (Schmidt *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995; Gudelsky & Nash, 1996; Koch & Galloway, 1997). A més l'MDMA allibera NE (Rothman *et al.*, 2001), potencia la contracció muscular induïda per NE (Al-Sahli *et al.*, 2001) i estimula l'alliberament cortical i estriatal d'ACh que pot estar controlat per l'activació de receptors d'histamina H<sub>1</sub> (Fischer *et al.*, 2000; Acquas *et al.*, 2001). En rates s'ha descrit que a determinades concentracions l'MDMA té una afinitat moderada per una gran varietat de receptors, com 5-HT<sub>2A</sub>, receptors H<sub>1</sub> d'histamina, i els receptors d'ACh muscarínics M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> (Titeler *et al.*, 1988; Battaglia & De Souza, 1989).

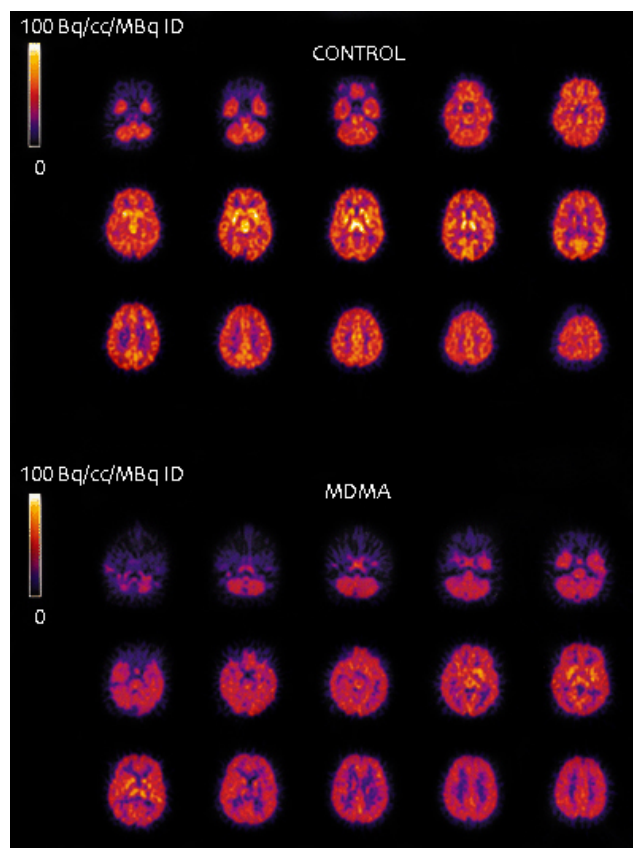
L'MDMA té un fort efecte neurotòxic. Així, aquesta droga de disseny és tòxica per a les neurones serotoninèrgiques en rates, conills d'indies, micos i humans, mentre que produeix toxicitat dopaminèrgica en ratolins a causa de les diferències interespecífiques dels diferents isoenzims implicats en el metabolisme de l'MDMA, que donen lloc a metabòlits amb diferent efecte (De La Torre & Farre, 2004). La principal àrea del cervell afectada per la neurotoxicitat de l'MDMA és l'escorça frontal, amb una activitat serotoninèrgica prominent. Així, s'ha observat que dosis elevades i repetides d'MDMA malmeten els axons de les neurones serotoninèrgiques en primats i rates i els axons de les neurones dopaminèrgiques en ratolins (Lyvers, 2006). A més, estudis en rates i primats no humans mostren que dosis elevades d'MDMA produeixen

reduccions persistents de marcadors d'integritat de les terminals nervioses serotoninèrgiques (activitat triptòfan hidroxilasa, deplecions del teixit cerebral serotoninèrgic i reduccions en la unió de MDMA a SERT). Aquests dèficits de 5-HT s'han observat en diverses regions cerebrals de les rates com l'escorça prefrontal, el nucli estriat, l'hipocamp i l'hipotàlem. Estudis de neuroimatge han aportat evidències de disminucions de nivells de SERT en consumidors d'MDMA abstinents (McCann *et al.*, 1998) (Fig. 16), encara que la neurotoxicitat induïda per l'MDMA en humans encara és motiu de controvèrsia i s'han de realitzar més estudis per clarificar aquest punt. Per altra banda, anàlisis immunohistoquímiques en àrees corticals i subcorticals mostren una aparent pèrdua dels axons i terminals de 5-HT que projecten des del nucli dorsal de rafe en rates tractades amb MDMA (Baumann *et al.*, 2007). L'MDMA augmenta la formació de radicals hidroxil i provoca la peroxidació de lípids, processos que acostumen a anar acompanyats de la formació de radicals lliures, i es formen espècies reactives d'oxigen i nitrogen que juguen un paper important en la neurotoxicitat induïda per MDMA. Diversos estudis mostren que inhibidors de la sintasa d'òxid nítric proporciona protecció contra la depleció induïda per MDMA (Itzhak & Ali, 2006).

Alguns estudis també descriuen que el tractament amb MDMA provoca l'activació de la microglia i indueix astrogliosi (proliferació d'astrocits causada per la mort de neurones circumdants), processos que es poden considerar marcadors de neurotoxicitat induïda per la droga (O'callaghan & Miller, 1994; Thomas *et al.*, 2004). Les cèl·lules de la microglia, les úniques cèl·lules del sistema immune que resideixen al SNC, fan funcions de fagocitosi i regulen la respostes immune i inflamatòries al SNC.

#### 2.2.4. Genètica i MDMA

Diferents estudis en models animals i d'associació han aportat informació sobre els mecanismes d'acció de l'MDMA i els seus efectes.



**Figura 16.** Imatges axials de tomografia d'emissió de positrons (PET) en el grup control i en el grup de consumidors de MDMA, mostrant la distribució de SERT mitjançant  $[^{11}\text{C}]\text{McN-5652}$ . Adaptada de McCann *et al.*, 1998.

### 2.2.4.1. Models animals genoanul·lats i transgènics en MDMA

L'anul·lació del transportador Sert (ratolins Sert KO) elimina l'adquisició d'MDMA per autoadministració (Trigo *et al.*, 2007), així com els efectes estimulants locomotors de la droga (Taula 12). No obstant, aquest efecte no es pot atribuir únicament a la manca de Sert, ja que aquest model animal presenta dèficits cognitius i comportamentals generalitzats en relació a la recompensa per menjar i aigua. D'altra banda, l'increment dels nivells de DA extracel·lular al NAC induït per l'administració d'MDMA en ratolins normals es manté en ratolins sense Sert, però en canvi l'augment dels nivells de 5-HT que es produeix en ratolins normals no s'observa en absència de Sert (Trigo *et al.*, 2007). En els ratolins deficients en Sert també se suprimeix l'alliberament de 5-HT al nucli rafe dorsal i la inhibició conseqüent de les neurones serotoninèrgiques (Renoir *et al.*, 2008).

**Taula 12.** Efecte sobre la locomoció de l'MDMA en ratolins genoanul·lats per transportadors i receptors monoaminèrgics.

Gen KO	Locomoció
<b>Serotonina</b>	
Sert	- [1]
5-ht1b	↓ [2]
<b>Dopamina</b>	
Drd1	↑ [3]
Drd2	↓ [3]
Drd3	+ [3]

+ efecte existent; - manca d'efecte; efecte augmentat comparat amb el ratolí normal; \* disminució de la proliferació cel·lular hipocampal eliminada. 1. Bengel *et al.*, 1998; 2. Scarce-Levie *et al.*, 1999; 3. Risbrough *et al.*, 2006.

Aquests resultats indiquen que canvis en l'activitat serotoninèrgica en ratolins KO per Sert poden tenir com a conseqüència els efectes comportamentals observats després de l'administració d'MDMA. Sert també sembla ser el responsable dels efectes aversius d'aquesta droga: la supersensibilitat del receptor 5-ht1a al nucli rafe dorsal, la disminució de la proliferació cel·lular a l'hipocamp i el comportament depressiu no es donen en ratolins KO per Sert (Renoir *et al.*, 2008).

Els ratolins KO pel receptor serotoninèrgic 5-ht1b (-/-) presenten una atenuació dels efectes estimulants locomotors de l'MDMA (Scarce-Levie *et al.*, 1999) (Taula 12). Finalment, entre els ratolins KO pels receptors de DA, els KO per *Drd1* (-/-) i per *Drd2* (-/-) presenten augments i reduccions dels efectes estimulants locomotors de l'MDMA, respectivament, mentre que el model KO per *Drd3* (-/-) no presenta canvis (Risbrough *et al.*, 2006) (Taula 12).

### 2.2.4.2. Efecte de l'MDMA sobre l'expressió gènica

S'han realitzat pocs estudis a escala genòmica sobre l'efecte de l'administració passiva d'MDMA sobre l'expressió gènica, cap d'ells en cervells *post-mortem* o bé emprant l'autoadministració en models animals. Un estudi que avalua en rates els efectes de l'administració aguda d'MDMA sobre l'escorça va identificar canvis d'expressió en diversos gens que codifiquen receptors serotoninèrgics, molècules de la matriu extracel·lular o el citoesquelet, citoquines, antígens de superfície, elements de senyalització intracel·lular i factors de transcripció (Thiriet *et al.*, 2002). En cervell mitjà de ratolí també s'han identificat canvis en l'expressió d'alguns gens implicats en traducció i transcripció gènica i en transducció de senyals (Xie *et al.*, 2004). Per altra banda, en un altre estudi es van identificar canvis en l'escorça cerebral després de l'exposició repetida



a MDMA en gens implicats en senyalització de la via de les proteïna-cinases activades per mitògens (*Mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i de la via Wnt, LTP, depressió a llarg termini i interacció lligand-receptor (Eun *et al.*, 2009).

Altres estudis de gens candidats també han descrit canvis en l'expressió després de l'exposició a MDMA. Així, l'MDMA altera l'expressió de determinats receptors de 5-HT en diferents àrees de cervell de rata (Kindlundh-Hogberg *et al.*, 2006) i l'administració crònica en rates incrementa l'expressió de 5-HT<sub>1C</sub> i disminueix l'expressió de gens que codifiquen receptors glucocorticoides i mineralocorticoides (Yau *et al.*, 1994; Yau *et al.*, 1997). L'expressió dels receptors de glutamat també es modifica després de l'administració d'MDMA (Kindlundh-Hogberg *et al.*, 2008), així com dels diferents transportadors de GABA (Peng & Simantov, 2003).

En relació a les vies de senyalització i factors de transcripció, l'MDMA augmenta l'expressió d'ERK (Salzmann *et al.*, 2003) i c-fos en les àrees límbiques (Erdtmann-Vourliotis *et al.*, 1999; Stephenson *et al.*, 1999). També s'altera l'expressió de gens implicats en neuroadaptació i plasticitat sinàptica, com Egr-1 i BDNF (Shirayama *et al.*, 2000; Martinez-Turrillas *et al.*, 2006). Finalment, també s'ha descrit que l'MDMA provoca canvis d'expressió en la família de Rho de GTPases (Rnd), implicada en la regulació del citoesquelet (Marie-Claire *et al.*, 2007) i en l'expressió de les variants de splicing anti- i proapoptòtiques de bcl-x1 (Stumm *et al.*, 1999).

### **2.2.4.3. Factors de susceptibilitat genètica en l'abús d'èxtasi**

Com s'ha esmentat anteriorment l'existència de dependència d'èxtasi en humans encara és objecte de debat (Degenhardt *et al.*, 2010). No hi ha estudis d'agregació familiar o d'heretabilitat que posin de manifest que hi ha un component genètic que predisposa a l'abús d'èxtasi. Malgrat això, hi ha diversos estudis d'associació genètics amb diversos trets relacionats amb el consum d'èxtasi, i el gen candidat més estudiat ha estat el que codifica el transportador de serotonina SERT o 5-HTT. S'ha avaluat l'efecte del polimorfisme LPR, una repetició en tàndem d'una unitat de 20-23 nucleòids situat al promotor del gen en tasques relacionades amb la memòria i simptomatologia depressiva i d'ansietat en consumidors d'èxtasi, però no s'ha detectat associació (Reneman *et al.*, 2006; Scott *et al.*, 2010). Altres estudis també han avaluat l'efecte d'aquest polimorfisme en la presa de decisions, memòria, funció executiva i fluïdesa verbal en consumidors d'èxtasi i individus control, tot observant canvis que es correlacionaven amb els genotips: el genotip S/S del polimorfisme 5-HTT LPR s'ha trobat associat en consumidors d'èxtasi a una pèrdua de capacitats en la presa de decisió i fluïdesa verbal (Roiser *et al.*, 2006; Fagundo *et al.*, 2010). També s'ha estudiat el gen que codifica per la catecol-O-metiltransferasa (COMT) en relació a la memòria verbal i a la fluïdesa verbal. Els resultats obtinguts detecten un possible efecte del polimorfisme Val158Met, de tal manera que els portadors de l'al·lel Met serien més sensibles a l'efecte de l'èxtasi sobre la memòria verbal (Schilt *et al.*, 2009; Fagundo *et al.*, 2010).



# OBJECTIUS

“ – (...) Y lo que menos comprendo es por qué no tomas *soma* cuando se te ocurren esta clase de ideas. Si lo tomaras olvidarías todo eso. Y en lugar de sentirte desdichado serías feliz. Muy feliz –.”

*Un mundo feliz, Aldous Huxley*



## OBJECTIUS

Aquest treball ha tingut com a objectiu principal aprofundir en el coneixement dels factors genètics que confereixen susceptibilitat a la dependència de cocaïna i en l'estudi de les alteracions en l'expressió gènica induïdes pel consum d'èxtasi (3,4-metilendioximetanfetamina o MDMA) i de cocaïna, ambdues substàncies psicoestimulants.

Objectius específics:

A. Avaluació de la contribució de diversos sistemes de gens candidats a la dependència de cocaïna mitjançant estudis d'associació cas-control poblacionals:

A.1 Sistema dopaminèrgic:

- Rèplica d'estudis previs centrats en tres gens candidats del sistema dopaminèrgic (*SCL6A3*, *DRD2* i *DBH*).
- Anàlisi de variants polimòrfiques de tipus SNP seleccionades amb criteris de cobertura genètica en 9 gens candidats que codifiquen el transportador i els receptors pre- i postsinàptics de dopamina, així com els enzims implicats en la síntesi i degradació d'aquest neurotransmissor.

A.2. Sistema serotoninèrgic: Anàlisi de polimorfismes de tipus SNP en 19 gens que codifiquen el transportador, els receptors pre- i postsinàptics de serotonina, així com els enzims implicats en el seu metabolisme.

A.3. Factors neurotròfics: Anàlisi de polimorfismes de tipus SNP en 10 gens que codifiquen factors neurotròfics i els seus receptors, que no han estat prèviament considerats en estudis genètics sobre la dependència de cocaïna.

A.4. Regulació de la neurosecreció sinàptica: Anàlisi de polimorfismes de tipus SNP en 16 gens que codifiquen proteïnes implicades en els mecanismes de control i regulació de la secreció de neurotransmissors a la sinapsi neuronal. Aquesta via no s'havia investigat prèviament en relació a la dependència de cocaïna.

B. Avaluació de l'efecte del tractament agut de cocaïna sobre l'expressió gènica en un model neuronal dopaminèrgic (cèl·lules SH-SY5Y diferenciades amb àcid retinoic) mitjançant *microarrays*.

C. Avaluació de l'efecte del consum actiu i passiu d'MDMA sobre l'expressió gènica en un model murí mitjançant *microarrays*, centrat en quatre estructures cerebrals: nucli estriat ventral, escorça frontal, nuclis dorsals del rafe i hipocamp.

C.1 Anàlisi de l'efecte directe de l'MDMA sobre el transcriptoma.

C.2 Comparació dels perfils transcriptòmics entre l'administració activa i passiva d'MDMA per tal d'identificar mecanismes implicats en aprenentatge del consum actiu i la memòria.

# RESULTATS

“A la sazón el *soma* empezaba ya a producir efectos. Los ojos brillaban, las mejillas ardían, la luz interior de la benevolencia universal asomaba a todos los rostros en forma de sonrisas felices, amistosas.”

*Un mundo feliz, Aldous Huxley*





---

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

**Títol de la Tesi:** “GENÈTICA I DROGUES PSICOESTIMULANTS: DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA I CONSUM D'ÈXTASI”

**Autor:** Noèlia Fernández Castillo

**Directors:** Dr. Bru Cormand i Rifà, Dra. Marta Ribasés Haro

### ARTICLE 1 (versió final de l'article a l'Apèndix de la Tesi)

**Títol:** *Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample*

**Autors:** Fernández-Castillo N, Ribasés M, Roncero C, Casas M, Gonzalvo B, Cormand B.

**Publicació:** *Psychiatric Genetics* 2010; 20:317-320

**Índexs de qualitat:** IF2009=2,327, 3r quartil de la categoria GENETICS & HEREDITY.

**Aportació del doctorand a l'article:** Extracció de mostres de DNA de casos i controls. Disseny dels assaigs. Genotipació manual dels polimorfismes. Anàlisi estadística i participació activa en la discussió dels resultats. Redacció del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

### ARTICLE 2

**Títol:** *Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence*

**Autors:** Fernández-Castillo N, Roncero C, Grau-Lopez L, Barral C, Prat G, Vázquez JM, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Ribasés M, Cormand B

**Publicació:** Manuscrit en preparació

**Aportació del doctorand a l'article:** Extracció de mostres de DNA de casos i controls. Preparació de les mostres per a la seva genotipació. Anàlisi estadística i participació activa en la discussió dels resultats. Redacció del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

### ARTICLE 3 (galerades de l'article a l'Apèndix de la Tesi)

**Títol:** *Candidate pathway association study in cocaine dependence: the control of neurotransmitter release*

**Autors:** Fernández-Castillo N, Cormand B, Roncero C, Sánchez-Mora C, Grau-Lopez L, Gonzalvo B, Miquel L, Corominas R, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Ribasés M

**Publicació:** *World Journal of Biological Psychiatry* (en premsa)

**Índexs de qualitat:** IF2009=5,564, 1r decil de la categoria PSYCHIATRY

**Aportació del doctorand a l'article:** Extracció de mostres de DNA de casos i controls. Preparació de les mostres per a la seva genotipació. Anàlisi estadística i participació activa en la discussió dels resultats. Redacció del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

#### ARTICLE 4

**Títol:** *Effect of acute exposure to cocaine on gene expression in differentiated SH-SY5Y cells*

**Autors:** Noelia Fernández-Castillo N, Ribasés M, Casas M, Cormand B

**Publicació:** Manuscrit en preparació

**Aportació del doctorand a l'article:** Cultiu i diferenciació de cèl·lules SH-SY5Y. Experiments de citotoxicitat deguda a l'administració de cocaïna. Tractaments amb cocaïna, extracció de RNA i preparació de pools per a la hibridació amb *microarrays* d'expressió. Pre-processament de les dades, anàlisi estadística i bioinformàtica. Disseny de les sondes i validació mitjançant qRT-PCR, anàlisi dels resultats de la validació i participació activa en la discussió dels resultats. Redacció del primer esborrany de l'article i participació en l'edició final.

#### ARTICLE 5

**Títol:** *Active and passive MDMA ('ecstasy') intake induces differential transcriptional changes in the mouse brain*

**Autors:** Fernández-Castillo N, Orejarena MJ, Ribasés M, Casas M, Robledo P, Maldonado R, Cormand B

**Publicació:** *Genes, Brain & Behavior* (sotmès i en segona revisió)

**Índexs de qualitat:** IF2009=3,795, primer quartil de la categoria BEHAVIORAL SCIENCES.

**Aportació del doctorand a l'article:** Noèlia Fernández-Castillo i María Juliana Orejarena han contribuït de forma equivalent a l'article. Paper de la doctorand: Extracció de RNA de diferents estructures cerebrals de ratolí, preparació de pools de RNA per a la hibridació amb *microarrays* d'expressió, pre-processament de les dades, anàlisi estadística i bioinformàtica, disseny de les sondes i validació mitjançant qRT-PCR, anàlisi dels resultats de la validació, participació activa en la discussió dels resultats, redacció del primer esborrany de l'article i participació en l'edició final.

Barcelona, 25 de febrer de 2011

Signat pels directors:

Dr. Bru Cormand Rifà

Dra. Marta Ribasés Haro

# CAPÍTOL 1. COCAÏNA I SISTEMA DOPAMINÈRGIC, SEROTONINÈRGIC I FACTORS NEUOTRÒFICS: ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ (I)

## Article 1

### Estudi d'associació entre els gens *DAT1*, *DBH* i *DRD2* i la dependència de cocaïna en una mostra espanyola

#### RESUM

L'addicció a drogues és un trastorn neuropsiquiàtric complex en què estan implicats factors genètics i ambientals. Hi ha evidències genètiques i fisiològiques que suggereixen que el sistema dopaminèrgic juga un paper important en l'abús i dependència de cocaïna. Diversos estudis d'associació s'han centrat en gens dopaminèrgics. En aquest estudi s'ha genotipat una repetició en tàndem de nombre variable (VNTR) de l'intró 8 i la regió 3' no traduïda (3'UTR) del transportador de dopamina (*DAT/SLC6A3*), els polimorfismes de tipus SNP *TaqIA* (rs1800497) i *TaqIB* (rs1079597) del gen del receptor de dopamina D<sub>2</sub> (*DRD2*) i una inserció/deleció de 19-bp i l'SNP c.444G>A (rs1108580) del gen de la dopamina β-hidroxilasa (*DBH*) en una mostra espanyola de 169 pacients amb addicció de cocaïna i 169 controls aparellats per sexe. L'estudi d'associació cas-control va mostrar sobrerrepresentació del genotip 5R/5R del VNTR de l'intró 8 del gen *DAT1* en el grup de pacients dependents de cocaïna ( $P = 0,016$ ). No obstant, no es va detectar associació entre aquest fenotip i les combinacions haplotípiques de *DAT1* o la resta de polimorfismes analitzats.

#### REFERÈNCIA

N. Fernández-Castillo, M. Ribasés, C. Roncero, M. Casas, B. Gonzalvo, B. Cormand. Association study between the *DAT1*, *DBH* and *DRD2* genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatric Genetics* 2010, 20:317–320



## ASSOCIATION STUDY BETWEEN THE *DAT1*, *DBH* AND *DRD2* GENES AND COCAINE DEPENDENCE IN A SPANISH SAMPLE

Noelia Fernàndez-Castillo<sup>a,b,c</sup>, Marta Ribasés<sup>d,e</sup>, Carlos Roncero<sup>d,f</sup>, Miquel Casas<sup>d,f</sup>, Begoña Gonzalvo<sup>d</sup>, Bru Cormand<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>b</sup> Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>c</sup> Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Catalonia, Spain

<sup>d</sup> Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>e</sup> Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>f</sup> Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalonia, Spain

Correspondence to Dr Bru Cormand, PhD, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain  
Tel: +34 93 402 10 13; fax: + 34 93 403 44 20; e-mail: bcormand@ub.edu

Received 24 August 2009 Revised 19 April 2010

Accepted 23 April 2010

**Psychiatric Genetics** 2010, 20:317–320

**Keywords:** cocaine dependence; case-control association study; *DAT1*; *SLC6A3*; dopamine transporter; *DBH*; *DRD2*

### ABSTRACT

Drug addiction is a complex neuropsychiatric disorder involving environmental and genetic factors. Genetic and physiological evidences suggest that the dopaminergic system may play an important role in cocaine abuse and dependence. Several association studies have focused on dopaminergic genes. We genotyped the Int8 and 3'UTR variable number of tandem repeats of the dopamine transporter gene (*DAT1/SLC6A3*), the *TaqIA* (rs1800497) and *TaqIB* (rs1079597) SNP polymorphisms within the dopamine receptor D2 gene (*DRD2*) and the 19-bp insertion/deletion and c.444G>A (rs1108580) polymorphisms of the dopamine  $\beta$ -hydroxylase gene (*DBH*) in a Spanish sample of 169 patients with cocaine addiction and 169 sex-matched controls. The case-control study showed a nominal overrepresentation of the 5R/5R genotype of the Int8 variable number of tandem repeats within *DAT1* in cocaine abusers ( $P=0.016$ ). However, no significant associations were detected when *DAT1* haplotype frequencies or polymorphisms within the other dopaminergic genes were considered. Sample size is limited and further studies should be performed in a larger cohort.

### INTRODUCTION

Cocaine addiction is a complex psychiatric disorder that results from the interaction of different genetic and environmental factors. The dopaminergic system plays an important role in drug addiction. Cocaine blocks the dopamine transporter (*DAT1*) (Volkow *et al.*, 1996) and this binding

causes an increase of dopamine in the synapse that results in stimulation of the reward system and reinforcement (Volkow *et al.*, 1999; Volkow *et al.*, 2002). In addition, according to the “the reward deficiency syndrome” hypothesis (Comings and Blum 2000), high dopamine reuptake or high levels of dopamine degradation, as well as low density of dopamine receptors, could predispose to cocaine addiction.

In this regard, several association studies in cocaine dependence have focused on dopaminergic genes, such as genes encoding DAT1 (Persico *et al.*, 1993; Gelernter *et al.*, 1994; Guindalini *et al.*, 2006; Ballon *et al.*, 2007), the dopamine receptors DRD2 (Noble *et al.*, 1993; Persico *et al.*, 1996; Gelernter *et al.*, 1999; Ballon *et al.*, 2007; Messas *et al.*, 2005), DRD3 (Freimer *et al.*, 1996; Comings *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Block *et al.*, 2009) and DRD4 (Ballon *et al.*, 2007) and dopamine beta hydroxylase (DBH) (Cubells *et al.*, 2000; Kalayasiri *et al.*, 2007; Guindalini *et al.*, 2008), and displayed conflicting results.

We aimed to study several polymorphisms in DAT1 (two variable number of tandem repeats (VNTRs) in the 3' untranslated region (3'UTR) and in intron 8), DRD2 (*TaqIA* and *TaqIB* single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 3'UTR and in intron 1, respectively) and DBH (19-bp insertion/deletion in 5'UTR and c.444G>A in exon 2) in an ethnically homogeneous sample of 169 Spanish Caucasian cocaine dependent patients and 169 sex-matched unrelated healthy controls.

## MATERIAL AND METHODS

The patients sample consisted of 169 cocaine dependent patients (mean age  $37 \pm 7$  years and 84 % males ( $n = 142$ )) recruited and evaluated at the Drugs Unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) according to *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Fourth Edition Text Revision criteria. One hundred and sixty-nine sex-matched unrelated controls (mean age  $39 \pm 9$  years) were obtained at the Blood and Tissues Bank of the Hospital Universitari Vall d'Hebron.

**Table 1.** Genotypic and allelic distributions of six polymorphisms within the DAT1, DRD2 and DBH genes in 169 cocaine dependent patients and 169 controls from Spain

Gene	Polymorphism	HWE		Genotypes			
		Cases	Controls	Cases			
		P	P	N (%)			
DAT1	3'UTR VNTR	0.31	0.54	9R/9R 19 (11.2)	9R/10R 69 (40.8)	10R/10R 77 (45.6)	Others <sup>a</sup> 4 (2.4)
	Int8 VNTR	0.06	0.55	5R/5R 15 (8.9)	5R/6R 52 (30.8)	6R/6R 100 (59.2)	Others <sup>a</sup> 2 (1.2)
DRD2	<i>TaqIA</i>	0.24	1.00	CC 123 (72.8)	TC 40 (23.7)	TT 6 (3.6)	
	<i>TaqIB</i>	0.67	0.37	AA 2 (1.2)	AG 30 (17.8)	GG 137 (81.1)	
DBH	5'UTR Ins/del	0.65	0.63	in/in 42 (24.9)	in/del 88 (52.1)	del/del 39 (23.1)	
	c.444G>A	1	1.00	GG 43 (25.4)	GA 85 (50.3)	AA 41 (24.3)	

DAT1, dopamine transporter; DBH, dopamine  $\beta$ -hydroxylase; DRD2, dopamine receptor D2; HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium; VNTR, variable number of tandem repeats. <sup>a</sup> Genotypes and alleles with frequencies under 0.05 were grouped in a single class. <sup>b</sup> For the Int8 VNTR in DAT1, the comparison of the 5R/5R genotype vs all the others displayed a p-value of 0.016 (not shown in the Table), with an odds ratio (OR) of 4.02 (95% CI: 1.3-12.4) that was not statistically significant after the Bonferroni correction for multiple testing.

All of them were non-smoker blood donors that had never injected drugs intravenously. Both patients and controls were Spanish and Caucasian, with the last names of the parents being of Spanish origin. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using the *salting-out* method (Miller *et al.*, 1988).

Fourty and 30-bp VNTRs in the 3'UTR and in intron 8 of the *DAT1* gene were genotyped as described earlier (Qian *et al.*, 2004; Brookes *et al.*, 2006). Genotyping of the *TaqIA* (rs1800497) and *TaqIB* (rs1079597) SNPs within the *DRD2* gene as well as the 19-bp insertion/deletion and the c.444G>A (rs1108580) SNP of the *DBH* gene has also been described earlier (Tan *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003; respectively).

Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was assessed for all genotypes using the HWE software ([www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/hwenj.html](http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/hwenj.html)). Genetic Power Calculator ([pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc](http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc)) was used to estimate the statistical power of the sample assuming an odds ratio (OR) of 1.5, a disease prevalence of 0.03, a calculated average Minor Allele Frequency (MAF) of 0.27 and a significance level of 0.05. Genotype frequencies under a codominant model and allele frequencies were compared between cases and controls using the Fisher exact test. Genotypes and alleles of VNTRs with a frequency under 0.05 were grouped in a single class. OR and confidence intervals (CI) were estimated using SPSS v14.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Logistic regression was used to adjust by age. The significance threshold was set at  $2P < 0.0042$  after the multiple comparison correction of Bonferroni considering genotype and allele

comparisons for 6 different polymorphisms. When a nominal association was found, genotypes under recessive and dominant models were also compared. Haplotypes were estimated using the UNPHASED software ([homepages.lsh.ac.uk/frankdudbridge/software/unphased/](http://homepages.lsh.ac.uk/frankdudbridge/software/unphased/)).

**Table 1.** (Continued)

Controls				Alleles	
N (%)				P	P
9R/9R	9R/10R	10R/10R	Others <sup>a</sup>	0.74	0.49
18 (10.7)	68 (40.2)	75 (44.4)	8 (4.7)		
5R/5R	5R/6R	6R/6R	Others <sup>a</sup>	0.047 <sup>b</sup>	0.13
4 (2.4)	56 (33.1)	108 (63.9)	1 (0.6)		
CC	TC	TT		0.56	0.68
117 (69.2)	48 (28.4)	4 (2.4)			
AA	AG	GG		0.55	0.90
0 (0)	32 (18.9)	137 (81.1)			
in/in	in/del	del/del		0.16	0.09
58 (34.3)	79 (46.7)	32 (18.9)			
GG	GA	AA		0.79	0.54
48 (28.4)	84 (49.7)	37 (21.9)			

for the *DRD2* and *DBH* genes (Table 1). Instead, a nominal association was identified under a codominant model for the Int8 VNTR in *DAT1* ( $P = 0.047$ ), with an overrepresentation of the 5R/5R genotype in cocaine addicts ( $P = 0.016$ , OR = 4.02 (95% CI = 1.3-12.4)) that was also nominally

**Table 2.** Haplotype analysis of the *DBH* and *DAT1* genes

Haplotype	Cases N (%)	Controls N (%)
<b>DBH: 5'UTR 19-bp insertion/deletion – c.444G&gt;A<sup>a</sup></b>		
Del-A	114 (33.6)	93 (27.8)
Del-G	52 (15.5)	50 (15)
Ins-A	53 (15.8)	63 (18.9)
Ins-G	119 (35.1)	128 (38.3)
<b>DAT1: Int8 VNTR – 3'UTR VNTR<sup>b</sup></b>		
5R - 9R	64 (20.9)	55 (17.9)
6R - 9R	40 (13.1)	44 (14.3)
6R - 10R	202 (66.0)	209 (67.8)

DAT1, dopamine transporter; DBH, dopamine  $\beta$ -hydroxylase; VNTR, variable number of tandem repeats.

<sup>a</sup> Overall association  $\chi^2 = 3.027$ ;  $df = 3$ ;  $P = 0.3875$ .

<sup>b</sup> Overall association  $\chi^2 = 0.9846$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.6112$ .

significant when adjusting by age ( $P = 0.015$ ,  $OR = 1.13$  (95%  $CI = 1.02 - 1.26$ )). However, these differences were not statistically significant after applying the Bonferroni correction. We further estimated *DAT1* haplotype frequencies considering the Int8 and the 3'UTR VNTRs but their comparison between cases and controls showed no significant differences (Table 2). Although the *DBH* polymorphisms did not show association signals in the single-marker analysis, we also tested the 19-bp deletion-c.444G>A haplotype as it had previously been found associated with cocaine dependence (Cubells *et al.*, 2000), but no significant association was detected in our sample (Table 2).

## DISCUSSION

In this study a nominal association between cocaine dependence and the 5R/5R genotype of the Int8 VNTR polymorphism in the *DAT1* gene has been detected in a Caucasian Spanish population. A previous study in a Brazilian sample also found association between cocaine dependence and this polymorphism (Guindalini *et al.*, 2006). However, in this cohort the 6R allele (named allele 3 by the authors) and the 6R/6R genotype were more frequent in cases. This work also demonstrated an influence of the 5R and 6R alleles on *DAT1* expression, as both showed decreased transcription levels when inserted into intronic or into 5' sequences of a reporter gene and transfected into appropriate cell lines, the 6R allele reaching lower values than the 5R allele. In addition, the 6R allele showed a further decreased expression upon cocaine treatment (Guindalini *et al.*, 2006). These data prompted the authors to suggest that 6R/6R subjects may exhibit a differential response via altered *DAT1* gene expression when exposed to cocaine. However, the conflicting results observed in association studies, including ours, suggest that the Int8 VNTR polymorphism may not be the only functional variation in the gene that is related to the tested phenotype, or that other elements such as environmental risk factors or genetic background have a distorting effect on the analyses. Alternatively, we cannot discard a false positive result in our study, since the single-marker results were not statistically significant after the Bonferroni correction for multiple testing, and the multiple-marker analysis of the Int8 and the 3'UTR VNTRs in the *DAT1* gene did not show any haplotype overrepresented in patients.

No significant association was found between cocaine dependence and the 3'UTR VNTR of *DAT1*, the *TaqIA* and *TaqIB* of *DRD2* and the 19-bp insertion/deletion and c.444G>A of *DBH*, although a complete coverage of these genes is required to properly assess their involvement in this psychiatric disorder. The comparison of allele and genotype frequencies at all the studied



polymorphisms between our control cohort and several European populations showed similar figures (Franke *et al.*, 2008; Togsverd *et al.* 2008; Schooser *et al.* 2010; [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). As reviewed earlier (Ballon *et al.*, 2007), no association has been reported between cocaine addiction and the 3'UTR VNTR polymorphism in the *DAT1* gene (Persico *et al.*, 1993; Gelernter *et al.*, 1994; Guindalini *et al.*, 2006; Ballon *et al.*, 2007), although a positive association was detected in a subgroup of Caucasian cocaine addicts which also presented cocaine-induced paranoia (Gelernter *et al.*, 1994). Two studies reported a positive association with the *DRD2* *Taq1A* and *Taq1B* variations (Noble *et al.*, 1993; Persico *et al.*, 1996), but others did not replicate this association (Gelernter *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005). A more recent study described an association between cocaine dependence with comorbid childhood ADHD and the *DRD2* *Taq1A* polymorphism as well as a repeat in exon 3 of the *DRD4* gene (Ballon *et al.*, 2007). These conflicting results, together with those described between cocaine addiction and the *DRD3* *Ball* polymorphism (Freimer *et al.*, 1996; Comings *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Block *et al.*, 2009) highlight the need for more extensive association studies in terms of sample size and genetic coverage.

Polymorphisms in the *DBH* gene coding for dopamine-beta hydroxylase, that catalyzes the conversion of dopamine to norepinephrine, have also been studied. The 19-bp deletion-c.444A haplotype of the *DBH* gene had been earlier associated with cocaine-induced paranoia and low *DBH* activity in plasma (Cubells *et al.*, 2000). In our sample we did not detect significant differences between cases and controls, although a slight overrepresentation of this allelic combination was observed in cases (33.6% in cases vs 27.8% in controls; Table 2). Other polymorphisms within the gene have also been considered in previous studies. In this regard, the -1021T>C (rs161115) SNP in the *DBH* 5'UTR was associated with an increased propensity to paranoia over time during cocaine self-administration (Kalayasiri *et al.*, 2007) but showed no association with cocaine addiction (Guindalini *et al.*, 2008).

Limited sample size and heterogeneity at different levels may explain the observed conflicting results. In this regard, ethnicity, gender, comorbidity with other psychiatric disorders, environmental risk factors as well as different endophenotypes, such as cocaine-induced paranoia, may bias association results and might be important issues to consider in future studies in order to disentangle the genetic background of cocaine dependence.

In conclusion, we found nominal association between cocaine dependence and the 5R/5R genotype of the Int8 VNTR within the *DAT1* gene. Nevertheless, although our Spanish sample is ethnically homogeneous, cases and controls were individually sex-matched, sample size is still limited and further studies should be performed in a larger cohort.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to patients and controls for their participation in the study, to Rebeca Resmella and Constanza Daigre (Outpatient Drug clinic Vall d'Hebron) for their participation in the clinical assessment and collection of blood samples and to M. Dolores Castellar and others from the "Banc de Sang i Teixits (Hospital Vall d'Hebron) for their collaboration in the recruitment of controls. NF-C and MR are recipients of a BRD and a Miguel de Servet contracts from the University

of Barcelona and from the Instituto de Salud Carlos III (Spain), respectively.

This study was supported by "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR" (2009-SGR-00971), Generalitat de Catalunya, Spain.

## REFERENCES

- Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Olie JP, Charles-Nicolas A, *et al.* (2007). 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* **144B**:1034-1041.
- Bloch PJ, Nall AH, Weller AE, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, *et al.* (2009). Association analysis between polymorphisms in the dopamine D3 receptor (DRD3) gene and cocaine dependence. *Psychiatr Genet* **19**: 275-276.
- Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X, Knight J, *et al.* (2006). A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry* **63**:74-81.
- Comings DE, Blum K. (2000). Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res* **126**:325-341.
- Comings DE, Gonzalez N, Wu S, Saucier G, Johnson P, Verde R, *et al.* (1999). Homozygosity at the dopamine DRD3 receptor gene in cocaine dependence. *Mol Psychiatry* **4**:484-487.
- Cubells JF, Kranzler HR, McCance-Katz E, Anderson GM, Malison RT, Price LH, *et al.* (2000). A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol Psychiatry* **5**:56-63.
- Franke B, Hoogman M, Arias Vasquez A, Heister JG, Savelkoul PJ, Naber M, *et al.* (2008). Association of the dopamine transporter (SLC6A3/DAT1) gene 9-6 haplotype with adult ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**:1576-1579.
- Freimer M, Kranzler H, Satel S, Lacobelle J, Skipsey K, Charney D, *et al.* (1996). No association between D3 dopamine receptor (DRD3) alleles and cocaine dependence. *Addict Biol* **1**: 281-287.
- Gelernter J, Kranzler H, Satel SL. (1999). No association between D2 dopamine receptor (DRD2) alleles or haplotypes and cocaine dependence or severity of cocaine dependence in European- and African-Americans. *Biol Psychiatry* **45**:340-345.
- Gelernter J, Kranzler HR, Satel SL, Rao PA. (1994). Genetic association between dopamine transporter protein alleles and cocaine-induced paranoia. *Neuropsychopharmacology* **11**:195-200.
- Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N, *et al.* (2006). A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:4552-4557.
- Guindalini C, Laranjeira R, Collier D, Messas G, Vallada H, Breen G. (2008). Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct* **4**:1.
- Kalayasiri R, Sughondhabirom A, Gueorguieva R, Coric V, Lynch WJ, Lappalainen J, *et al.* (2007). Dopamine beta-hydroxylase gene (DbetaH) -1021C->T influences self-reported paranoia during cocaine self-administration. *Biol Psychiatry* **61**:1310-1313.
- Messas G, Meira-Lima I, Turchi M, Franco O, Guindalini C, Castelo A, *et al.* (2005). Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr Genet* **15**:171-174.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human

- nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**:1215.
- Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, Wood RC, et al. (1993). Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* **33**:271-285.
- Persico AM, Bird G, Gabbay FH, Uhl GR. (1996). D2 dopamine receptor gene TaqI A1 and B1 restriction fragment length polymorphisms: enhanced frequencies in psychostimulant-preferring polysubstance abusers. *Biol Psychiatry* **40**:776-784.
- Persico AM, Vandenbergh DJ, Smith SS, Uhl GR. (1993). Dopamine transporter gene polymorphisms are not associated with polysubstance abuse. *Biol Psychiatry* **34**:265-267.
- Qian QJ, Wang YF, Zhou RL, Yang L, Li J. (2004). Association studies of G352A polymorphism of dopamine transporter gene in Han Chinese attention deficit hyperactivity disorder patients. *Beijing Da Xue Xue Bao* **36**:626-629.
- Schossler A, Fuchs K, Scharl T, Schloegelhofer M, Kindler J, Mossaheb N, et al. (2010). Interaction between serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and dopamine transporter (DAT1) gene polymorphisms influences personality trait of persistence in Austrian Caucasians. *World J Biol Psychiatry* **11**:417-424.
- Tan EK, Tan Y, Chai A, Tan C, Shen H, Lum SY, et al. (2003). Dopamine D2 receptor TaqIA and TaqIB polymorphisms in Parkinson's disease. *Mov Disord* **18**:593-595.
- Togsverd M, Werge TM, Tankó LB, Bagger YZ, Hansen T, Qin G, et al. (2008). Association of a dopamine beta-hydroxylase gene variant with depression in elderly women possibly reflecting noradrenergic dysfunction. *J Affect Disord* **106**:169-172.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. (1999). Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J Psychopharmacol* **13**:337-345.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Goldstein RZ. (2002). Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem* **78**:610-624.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Ding YS, Logan J, et al. (1996). Relationship between psychostimulant-induced "high" and dopamine transporter occupancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10388-10392.
- Yamamoto K, Cubells JF, Gelernter J, Benkelfat C, Lalonde P, Bloom D, et al. (2003). Dopamine beta-hydroxylase (DBH) gene and schizophrenia phenotypic variability: a genetic association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **117**:33-38.



## CAPÍTOL 1. COCAÏNA I SISTEMA DOPAMINÈRGIC, SEROTONINÈRGIC I FACTORS NEUROTRÒFICS: ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ (II)

### Article 2

### Estudi d'associació de 37 gens relacionats amb la neurotransmissió serotoninèrgica i dopaminèrgica, factors neurotròfics i els seus receptors en la dependència de cocaïna

#### RESUM

La dependència de cocaïna és un trastorn neuropsiquiàtric què estan implicats tant factors ambientals com genètics. Diversos processos, com ara els relacionats amb la recompensa i les neuroadaptacions, participen en la transició des del consum a la dependència. En aquest sentit, els sistemes de neurotransmissió dopaminèrgic i serotoninèrgic estan clarament implicats en la recompensa i els efectes de la cocaïna, i els factors neurotròfics podrien ser responsables de les neuroadaptacions. En aquest estudi s'ha examinat la contribució de 37 gens relacionats amb els sistemes dopaminèrgic i serotoninèrgic i els factors neurotròfics i els seus receptors. Es va realitzar un estudi d'associació cas-control considerant 319 SNPs seleccionats segons criteris de cobertura genètica en 432 pacients dependents de cocaïna i 482 controls aparellats per sexe. Les anàlisis de marcadors individuals i haplotips han proporcionat evidències d'associació entre el receptor de serotonina *5HT1E* i la dependència de cocaïna ( $P = 5,3 \times 10^{-4}$ , OR = 2,04 (1,35-3,12) i  $P = 7,2 \times 10^{-3}$ ; OR = 1,22 (1,05-1,40) respectivament). Quan es va subdividir el grup de pacients segons la presència o absència de símptomes psicòtics, es mantenia l'associació entre dependència de cocaïna i el gen *5HT1E* només en el grup de pacients no-psicòtics ( $P = 0,020$ ; OR = 1,27 (1,04-1,55)). Aquests resultats mostren evidències preliminars de la importància del sistema serotoninèrgic en la susceptibilitat genètica a la dependència de cocaïna.

#### REFERÈNCIA

N. Fernández-Castillo, C. Roncero, L. Grau-López, C. Barral, G. Prat, J.M. Vázquez, J.A. Ramos-Quiroga, M. Casas, M. Ribasés, B. Cormand. Association study of 37 genes related to serotonin and dopamine neurotransmission and neurotrophic factors in cocaine dependence [Manuscrit en preparació].



## ASSOCIATION STUDY OF 37 GENES RELATED TO SEROTONIN AND DOPAMINE NEUROTRANSMISSION AND NEUROTROPHIC FACTORS IN COCAINE DEPENDENCE

Noèlia Fernández-Castillo<sup>1,2,3</sup>, Carlos Roncero<sup>4,5,6</sup>, Lara Grau-Lopez<sup>6</sup>, Carmen Barral<sup>6</sup>, Gemma Prat<sup>7</sup>, José M. Vázquez<sup>8</sup>, Josep Antoni Ramos-Quiroga<sup>4,5</sup>, Miquel Casas<sup>4,5</sup>, Marta Ribasés<sup>4,9</sup>, Bru Cormand<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>2</sup> CIBER Enfermedades Raras, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>3</sup> Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Catalonia, Spain

<sup>4</sup> Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>5</sup> Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>6</sup> Outpatient Drug Clinic Vall Hebron. Psychiatry Services. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>7</sup> Fundación Althaia, Hospital General de Manresa, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>8</sup> CAS Sants, ABD-ASPB, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>9</sup> Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

### Corresponding author:

Bru Cormand. Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain, Avinguda Diagonal 645, edifici annex, 3<sup>a</sup> planta, 08028, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: (+34) 93 4021013. Fax: (+34) 93 4034420; Email: bcormand@ub.edu

**Running title:** Association study of cocaine dependence with gene systems

**Keywords:** cocaine dependence, neurotransmission, neurotrophic factors, *5-HT1E*, case-control association study

### ABSTRACT

Cocaine dependence is a neuropsychiatric disorder in which both environmental and genetic factors are involved. Several processes, that include reward and neuroadaptations, are involved in the transition from use to dependence. In this sense, dopamine and serotonin neurotransmission systems are clearly involved in reward and other cocaine-related effects, whereas neurotrophic factors may be responsible for neuroadaptations associated with cocaine dependence. We examined the contribution to cocaine dependence of 37 genes related to the dopaminergic and serotonergic systems, neurotrophic factors and their receptors through a case-control association study with 319 SNPs selected according to genetic coverage criteria in 432 cocaine dependent patients and 482 sex-matched unrelated controls. Single and multiple-marker analyses provided evidence for association of the serotonin receptor *5-HT1E* with cocaine dependence ( $P = 5.3e-04$ , OR = 2.04 (1.35-3.12) and  $P = 7.2e-03$ ; OR = 1.22 (1.05-1.40), respectively). When patients were subdivided according to the presence or absence of psychotic symptoms, we also observed association between cocaine dependence and *5-HT1E* in the subgroup of non-

psychotic patients ( $P = 0.020$ ;  $OR = 1.27 (1.04-1.55)$ ). Our data show preliminary evidence of the importance of the serotonergic system in the genetic susceptibility to cocaine dependence.

## INTRODUCTION

Cocaine dependence is a neuropsychiatric disorder characterized by persistent, compulsive and uncontrolled use of cocaine. Both environmental and genetic factors underlie cocaine dependence. Although, some studies have estimated a heritability of cocaine dependence around 60-70% (Kendler & Prescott, 1998; Tsuang *et al.*, 1998; Kendler *et al.*, 2000), specific genetic susceptibility factors are not well understood. Several processes, such as reward and neuroadaptations, are involved in the transition from the first cocaine use to compulsive use, loss of control and development of dependence.

Both the dopaminergic and serotonergic neurotransmission systems have been widely described to play an important role in cocaine reward and other effects of the drug. Cocaine inhibits dopamine (DA) and serotonin (5-HT) reuptake and increases their levels in the synaptic cleft (Kuhar *et al.*, 1991; Kalivas, 2007). In addition, dopamine neurotransmission has been established as the main mediator of cocaine reward and its pleasurable effects and responses (Ritz *et al.*, 1988; Kuhar *et al.*, 1991; Spealman, 1993; Volkow *et al.*, 1997a), while serotonin neurotransmission plays an important role in hyperlocomotor effects, reinforcing and discriminative effects and sensitization (Spealman, 1993; Walsh & Cunningham, 1997; Filip *et al.*, 2001; Filip *et al.*, 2004; Filip, 2005). Studies with knockout mice lacking the dopamine (DAT) and/or serotonin (SERT) transporters showed that the rewarding effect of cocaine in the conditioned place preference model was abolished in DAT  $-/-$  SERT  $-/-$  and DAT  $-/-$  SERT  $+/-$ , but not DAT  $-/-$  or SERT  $-/-$ , knockout mice (Sora *et al.*, 2001; Hall *et al.*, 2002; Uhl *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2004), which underscores the relevance of both neurotransmission systems in cocaine reward. In this regard, several association studies have also considered dopaminergic or serotonergic genes as candidates for cocaine dependence. Positive associations have been described between cocaine dependence and polymorphisms in genes of the dopaminergic neurotransmission system (DAT1 and the dopamine receptors DRD2, DRD3 and DRD4) (Noble *et al.*, 1993; Comings *et al.*, 1999; Guindalini *et al.*, 2006; Ballon *et al.*, 2007; Fernandez-Castillo *et al.*, 2010), although some of them display conflicting results with other studies (Freimer *et al.*, 1996; Gelernter *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Bloch *et al.*, 2009; Fernandez-Castillo *et al.*, 2010; Lohoff *et al.*, 2010). However, association studies focusing on serotonergic genes failed to detect association with cocaine dependence (serotonin receptors 5-HT1B, 5-HT3A, 5-HT3B) (Cigler *et al.*, 2001; Enoch *et al.*, 2010) or showed controversial results (SERT) (Patkar *et al.*, 2001; Patkar *et al.*, 2002; Patkar *et al.*, 2004; Mannelli *et al.*, 2005; Enoch *et al.*, 2010).

In addition to its reward and reinforcing effects, cocaine also induces neuroplasticity changes that may be involved in mechanisms underlying cocaine dependence, such as reward-related



learning and memory as well as drug induced neuroadaptations (Beitner-Johnson & Nestler, 1991; Sorg *et al.*, 1993; Vrana *et al.*, 1993; Berhow *et al.*, 1996; Volkow *et al.*, 1997b; Wu *et al.*, 1997; Nestler, 2002; Wolf *et al.*, 2004; Everitt & Robbins, 2005; Kalivas & O'Brien, 2008). Neurotrophins, which are neurotrophic factors (NTFs) involved in neuronal survival, differentiation, function and plasticity in the developing and adult central nervous system, may be involved in these cocaine-induced neuroadaptive changes (Berhow *et al.*, 1995; Schoenbaum *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2008). Neurotrophic factors play important roles in brain cells involved in the action of psychostimulants, such as dopaminergic or serotonergic neurons, and participate, besides neuronal survival and death, in activity-dependent plasticity and modulation of cocaine induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system (Berhow *et al.*, 1995; Angelucci *et al.*, 2009). The most studied neurotrophin in cocaine research is the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its signalling pathway, which have been involved in neuroadaptive changes underlying psychostimulant abuse and dependence (Horger *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 1999; Grimm *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004; Valjent *et al.*, 2005; Filip *et al.*, 2006b). Interestingly, infusion of BDNF into subcortical structures in rats, like the nucleus accumbens (NAc) and the ventral tegmental area (VTA), enhance motor activity, cocaine-seeking behaviour and cocaine reinstatement after extended abstinence, as well as sensitization and cocaine-conditioned cues (Altar *et al.*, 1992; Martin-Iverson *et al.*, 1994; Martin-Iverson & Altar, 1996; Horger *et al.*, 1999; Guillin *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2004; Graham *et al.*, 2007; Bahi *et al.*, 2008). On the other hand, BDNF infusions in prefrontal cortex, a critical region for impulse control, suppresses cocaine-seeking and relapse (Berglind *et al.*, 2007). In addition, cocaine abuse is associated with decrease of BDNF and nerve growth factor (NGF) in serum of patients (Angelucci *et al.*, 2007). Neurotrophin-3 (NT-3) contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine (Pierce *et al.*, 1999), and NT-3 neutralization by an antibody enhances sensitization to repeated cocaine injections when microinjected in the VTA and increases behavioural response to cocaine in NAc but impairs the further development of behavioural sensitization (Freeman & Pierce, 2002).

To our knowledge, no association studies focusing on candidate genes for cocaine dependence have considered neurotrophins and their receptors, although Lohoff *et al.* (Lohoff *et al.*, 2009) failed to detect association with several SNPs in the recently described Conserved Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF). However, a genomewide association study (GWAS) detected association between polysubstance abuse and several markers flanking *BDNF* (Uhl *et al.*, 2001).

In the present study we aimed to examine genes related to serotonergic and dopaminergic neurotransmission systems, as well as several neurotrophic factors, including neurotrophins, and their receptors. For that purpose we performed a case-control population-based association study in a Spanish sample of 432 cocaine dependent patients and 482 sex-matched unrelated controls, with SNPs covering 38 candidate genes that encode 14 serotonin receptors (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>1F</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3A</sub>, 5-HT<sub>3B</sub>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>,

5-HT<sub>6</sub> and 5-HT<sub>7</sub>), five dopamine receptors (*DRD1*, *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* and *DRD5*), the serotonin and dopamine transporters (*SLC6A4* and *SLC6A3*, respectively), enzymes involved in serotonin and dopamine synthesis and degradation (*TH*, *TPH1*, *DDC*, *MAOA*, *MAOB*, *COMT* and *DBH*), five neurotrophic factors (*NGF*, *BDNF*, *NTF3*, *NTF4/5* and *CNTF*) and their receptors (*NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *NGFR*, and *CNTFR*).

## MATERIALS AND METHODS

### *Subjects*

The clinical sample consisted of 432 patients (mean age  $34.5 \pm 7.6$  years and 82.6% males ( $n = 357$ )) recruited and evaluated according to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders criteria for cocaine dependence (DSM-IV TR) at the Psychiatry Department of the Hospital Universitari Vall d'Hebron and the Hospital General de Manresa (Barcelona, Spain) between 2005 and 2010. The Structured Clinical Interview (SCID) (First *et al.*, 1997) was administered and volunteers with current DSM-IV diagnosis of cocaine dependence were included in the study. Seventy-nine per cent of the patients were evaluated for the presence ( $n = 195$ ) or absence ( $n = 145$ ) of psychotic symptoms, and 76% ( $n = 329$ ) reported age at the initial consumption as well as age at dependence onset.

The control sample consisted of 482 unrelated blood donors (mean age  $43.3 \pm 14.4$  years and 82.6% males ( $n = 398$ )) recruited at the Blood and Tissues Bank of the Hospital Universitari Vall d'Hebron. None of them had injected drugs intravenously. Both patients and controls were Spanish, Caucasian and frequency sex-matched. The study was approved by the ethics committee of Hospital Universitari Vall d'Hebron and written informed consent was obtained from all cases and controls.

### *DNA isolation and quantification*

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by the salting-out procedure (Miller *et al.*, 1988) or from saliva using the Oragene DNA Self-Collection Kit (DNA Genotek, Kanata, Ontario, Canada). The double-stranded concentrations of all samples were determined on a Gemini XPS fluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using the PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), following the manufacturer's instructions. Subsequently, all samples were normalized to 75 ng / $\mu$ l

### *SNP selection*

We selected a total of 38 candidate genes encoding proteins related to the serotonergic and dopaminergic neurotransmission systems and neurotrophic factors and their receptors (Supplementary Tables S1-S3). We used information on the CEPH panel from the HapMap database ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org); release 20, January 2006) to select SNPs (Thorisson *et al.*, 2005). To minimize redundancy of the selected markers and ensure full genetic coverage of candidate genes, we used the LD-select software (Carlson *et al.*, 2004) to evaluate the linkage disequilibrium

(LD) pattern of the region spanning each candidate gene plus 3 to 5 kb of flanking sequences. A total of 400 SNPs were selected at an  $r^2$  threshold of .85 from all SNPs with a minor allele frequency (MAF)  $> 0.15$  for genes with fewer than 15 tagSNPs and MAF  $> 0.25$  for those genes with more than 15 tagSNPs in serotonergic and dopaminergic genes, whereas we considered a MAF  $> 0.10$  for genes encoding neurotrophic factors or their receptors. Additionally, five non-synonymous SNPs were included in our selection as potentially functional polymorphisms: rs1058576 (*5-HT2A*, exon 3), rs6318 (*5-HT2C*, exon 4), rs2228673 (*SLC6A4*, exon 5), rs6265 (*BDNF*, exon 2) and rs1007211 (*NTRK1*, exon 1).

#### *Plex Design, Genotyping, and Quality Control*

Of the initially selected 400 SNPs, 31 did not pass through the SNPlex design pipeline at [ms.appliedbiosystems.com/snplex/snplexStart.jsp](http://ms.appliedbiosystems.com/snplex/snplexStart.jsp), resulting in a design rate of 92% (Tables S1-S3). Eight SNPlex genotyping assays were designed including a total of 369 SNPs: four for the serotonergic and dopaminergic systems (48, 47, 46 and 45 SNPs) and four for the neurotrophic factors (45, 48, 46 and 44 SNPs). To discard population stratification we also performed an additional SNPlex assay of 48 unlinked genome-wide SNPs located at least 100 Kb apart from any known gene (Sanchez *et al.*, 2006). Genotyping was performed at the Barcelona node of the National Genotyping Center (CeGen, [www.cegen.org](http://www.cegen.org)) using the SNPlex technology (Tobler *et al.*, 2005). Two CEPH DNA samples (NA11992 and NA11993) were included in the different genotyping assays, and a concordance rate of 100% with HapMap data was obtained. Replicates were also included in all plates as an additional quality control, and genotype concordance was also 100%.

#### *Statistical analyses*

The minimal statistical power was calculated *post hoc* with the Genetic Power Calculator software ([pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html](http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html)) (Purcell *et al.*, 2003), under a codominant model and assuming an odds ratio (OR) of 1.5, a prevalence for cocaine dependence of 0.0062 (3.9% of consumers in Spanish general population, from which 16% develop dependence (EMCDDA 2009 Annual Report; (Wagner & Anthony, 2002))), a significance level of 0.05 and the lowest MAF value of 0.10.

Population stratification: Potential genetic stratification was tested in our sample by analyzing the 44 SNPs successfully genotyped and in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) from an initial 48 anonymous SNP set following three different approaches: 1) Structure software (version 2.3.3) (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003) under the admixture model, with a length of the burning period and a number of MCMC repeats of 100,000 and performing five independent runs at each K value (from 1 to 5), in which K refers to the number of groups to be inferred; 2) the  $F_{st}$  coefficient calculated with the Weir and Cockerham approach using the FSTAT software and a 95% confidence interval (CI) determined by bootstrapping (Weir & Cockerham, 1984; Goudet, 1995); and 3) the Pritchard and Rosenberg method (Pritchard & Rosenberg, 1999) considering codominant, dominant, and recessive models.

**Single-Marker Analysis:** The analysis of HWE (threshold set at  $P < 0.01$ ) and the comparison of genotype frequencies between cases and controls were performed using the SNPAssoc R library (Gonzalez *et al.*, 2007). Dominant (11 vs. 12 + 22) and recessive (11 + 12 vs. 22) models were only considered for those SNPs in which nominal association was detected under a codominant model. For the multiple comparison correction, we considered all tests performed and assumed a false discovery rate (FDR) of 20% using the Q-value R library (Storey, 2002), which corresponds to a significance threshold of  $P < 0.00053$ . Additionally, we also corrected significant p-values overcoming the 20% FDR threshold by performing a permutation test using 10,000 permutations with the PLINK software (Purcell *et al.*, 2007) and, subsequently, significant P-values after multiple comparison corrections were adjusted by age.

**Multiple-Marker Analysis:** To minimize multiple testing and type I errors, we decided a priori to restrict the haplotype-based association study to those genes associated with cocaine dependence in the single-marker analysis after correction for multiple testing. Rather than simplifying the study to physically contiguous SNPs in the gene, the best two-marker haplotype from all possible combinations was identified, and afterwards additional markers (up to four) were added in a stepwise manner to the initial two-SNP haplotype. Significance was estimated by a permutation procedure with 10,000 permutations using the UNPHASED software

**Table 1.** Single-marker analysis: Nominal associations identified in 432 cocaine dependent patients and 482 controls.

Gene	SNP	Genotypes								P
		Cases N (%)				Controls N (%)				
					Sum				Sum	
Serotonergic system										
<b>5-HT1E</b>	rs1408449	172 (42.0)	202 (49.3)	38 (8.8)	412	187 (39.6)	207 (43.9)	78 (16.5)	472	2.3e-03
<b>5-HT2A</b>	rs6561332	125 (29.6)	231 (54.6)	67 (15.8)	423	148 (30.8)	222 (46.2)	111 (23.1)	481	9.2e-03
	rs6561333	119 (29.4)	221 (54.6)	65 (16.0)	405	179 (38.0)	205 (43.5)	87 (18.5)	471	4.1e-03
Dopaminergic system										
<b>DBH</b>	rs6479643	163 (38.3)	215 (50.5)	48 (11.3)	426	173 (36.0)	222 (46.2)	85 (17.7)	480	0.022
<b>TH</b>	rs2070762	92 (21.7)	236 (55.8)	95 (22.5)	423	130 (28.1)	215 (46.4)	118 (25.5)	463	0.017
Neurotrophic factors and receptors										
<b>NTF3</b>	rs4073543	138 (33.3)	181 (43.7)	95 (22.9)	414	159 (33.1)	242 (50.3)	80 (16.6)	481	0.037
<b>NTRK2</b>	rs1147193	244 (57.7)	160 (37.8)	19 (4.5)	423	273 (57.7)	159 (33.6)	41 (8.7)	473	0.029
<b>NTRK3</b>	rs12595249	183 (43.5)	182 (43.2)	56 (13.3)	431	205 (43.6)	227 (48.3)	38 (8.1)	470	0.030
	rs744994	147 (39.3)	179 (47.9)	48 (12.8)	374	231 (48.0)	205 (42.6)	45 (9.4)	481	0.027
	rs998636	238 (56.5)	144 (34.2)	39 (9.3)	421	268 (55.8)	187 (39.0)	25 (5.2)	480	0.037
<b>NGFR</b>	rs534561	187 (44.4)	165 (39.2)	69 (16.4)	421	208 (43.3)	219 (45.6)	53 (11.0)	480	0.031
<b>CNTFR</b>	rs7036351	311 (74.2)	97 (23.2)	11 (2.6)	419	321 (67.0)	148 (30.9)	10 (2.1)	479	0.032

NS: Not significant; \* When odds ratio < 1, the inverted score is shown; \* Statistically significant P-values after applying a False Discovery Rate of 20% ( $P < 0.00053$ ), P-value adjusted for age =  $3.7e-03$ , P-value corrected by a permutation test = 0.0016)

(Dudbridge, 2003). Because the expectation-maximization (EM) algorithm implemented in the UNPHASED software does not accurately estimate low haplotype frequencies (Fallin & Schork, 2000), haplotypes with frequencies  $< 0.05$  were excluded. Specific estimated haplotypes were assigned to individuals using the PHASE 2.0 software (Stephens *et al.*, 2001). We compared the frequency of risk haplotype carriers in cocaine-dependent patients versus controls and in cocaine-dependent patients with or without cocaine-induced psychotic symptoms by using the statistical package SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). We also evaluated the possible effect of the risk haplotype on the time between initial and regular consumption.. The significance threshold was set at  $2P < 0.017$  after the multiple testing correction of Bonferroni considering the three comparisons. The distribution in of the lapse between initial consumption and the onset of cocaine dependence rejected normality using a Kolmogorov-Smirnov test and comparison of medians was performed using the non-parametric Mann-Whitney U test. Significant P-values were also adjusted by age.

## RESULTS

We studied tagSNPs in 38 candidate genes related to dopaminergic and serotonergic neurotransmission and neurotrophic factors and their receptors in 432 cocaine dependent patients and 482 controls. Of the 369 SNPs included in the assays, 50 were excluded for

**Table 1.** (Continued)

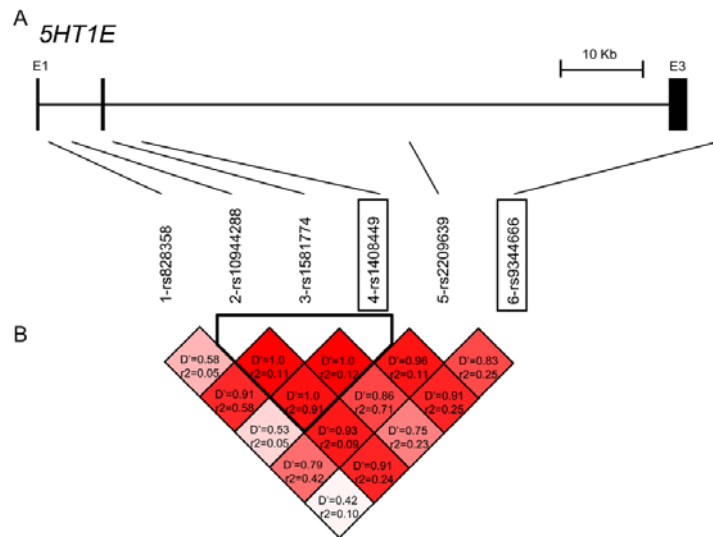
Genotype		Genotype	
( % )	P	( % )	P
–	NS	2.04 (1.35-3.12)	5.3e-04 <sup>§</sup>
–	NS	1.59 (1.14-2.22)	6.0e-03
1.47 (1.11-1.96)	7.1e-03	–	NS
–	NS	1.69 (1.16-2.5)	5.9e-03
1.4 (1.03-1.91)	0.029	–	NS
–	NS	1.49 (1.07-2.08) *	0.018
–	NS	2.00 (1.15-3.57)	0.011
–	NS	1.74 (1.13-2.69)	0.011
1.43 (1.08-1.88)	0.011	–	NS
–	NS	1.86 (1.10-3.13)*	0.018
–	NS	1.58 (1.07-2.32)*	0.019
1.41 (1.06-1.89)	0.018	–	NS

several reasons (35 showed  $>80\%$  missing genotypes, three were monomorphic, 11 had a MAF  $< 0.01$ , one showed Hardy-Weinberg equilibrium departure in the control sample) (Supplementary Table 1). Finally, a total of 319 SNPs within 37 genes (the two SNPs in the *DRD4* gene failed) with an average call rate of 97% (SD = 1.94) were assessed in the case-control association study. The minimal statistical power for the  $\chi^2$  test, considering the SNP with the lowest MAF (0.10), was 62.7%.

Population admixture was excluded in our sample with the STRUCTURE software (Supplementary Table 2), the  $F_{st}$  coefficient ( $\Theta = 0$  with a 95% CI of -0.001-0.000) and the Pritchard and Rosenberg method ( $P = 0.568$ ).

The comparison of genotype frequencies between cocaine dependent patients

**Figure 1.** A. Diagram of the 5-HT<sub>1E</sub> gene (NM\_000865.2). Black boxes indicate exons. The six tagSNPs included in this study are shown on top, with the two SNPs that conform the risk haplotype associated with cocaine dependence boxed. B. Linkage disequilibrium plot of the six SNPs analyzed in the 5-HT<sub>1E</sub> gene, according to Haploview. Considering the Confidence Interval algorithm (Gabriel *et al.*, 2002), the three marked SNPs (2, 3 and 4) are located in the same LD block (7 kb) in our control sample.



and controls under a codominant model showed nominal significant differences for 12 SNPs located in 9 genes: 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, DBH, TH, NTF3, NTRK2, NTRK3, NGFR and CNTFR (Table 1 and Supplementary Table 3). However, only rs1408449 in the 5-HT<sub>1E</sub> gene remained associated with cocaine dependence ( $P = 5.3e-04$ , OR = 2.04 (1.35-3.12)) after correcting for multiple comparisons using a permutation test ( $P$ -adjusted = 0.0016) and 20% FDR. This sequence variant remained significantly associated with cocaine dependence once adjusted by age ( $P$ -adjusted =  $3.7e-03$ ) (Table 1).

**Table 2.** (a) Haplotype analysis of six 5-HT<sub>1E</sub> SNPs in a clinical sample of 432 cocaine dependent patients and 482 controls using the UNPHASED software; (b) Haplotype distributions of the rs1408449/rs9344666 5-HT<sub>1E</sub> SNPs.

(a)

5-HT <sub>1E</sub>			
Marker * haplotype	Global P-value	Best haplotype-specific P-value (Adjusted P-value)	Haplotype-specific OR
	0.014	0.0054 (0.015)	1.39 (1.11-1.75)
	0.0092	0.011 (NS)	2.26 (1.26-4.05)

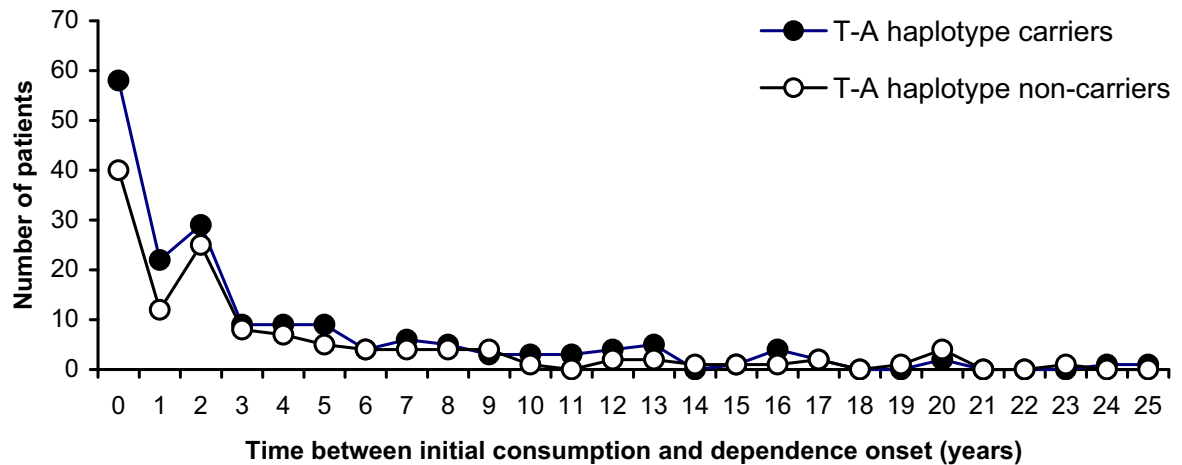
(b)

Marker * haplotype	Cases	Controls	Haplotype specific P-value; OR (CI)
AA	265 (32.8)	352 (37.9)	0.028; 1 (1-1)**
TA	295 (36.5)	281 (30.2)	( )
TG	248 (30.7)	297 (31.9)	NS

\* 3- rs1581774 ; 4-rs1408449; 6-rs9344666

Multiple-marker analysis considering the six genotyped SNPs within 5-HT<sub>1E</sub> showed evidence of association between cocaine dependence and a two-marker haplotype (rs1408449/rs9344666; global  $P = 0.014$ ; Fig. 1), which remained significant after correcting by permutation ( $P$ -adjusted = 0.015; Table 2a). The evaluation of the contribution of individual haplotypes to cocaine dependence showed an over-representation of the T-A allelic combination ( $P = 0.0054$ ; OR = 1.39 (1.11-1.75); Table 2b) and an increased frequency of individuals carrying this specific haplotype in the clinical sample ( $P$ -adjusted by age =  $7.2e-03$ ; OR = 1.22 (1.05-1.40); Table 3).

When we subdivided patients according to the presence or absence of cocaine-induced psychotic symptoms, significant differences were only detected in the group of patients



**Figure 2.** Time between initial consumption and cocaine dependence onset (years) in carriers and non-carriers of the 5-HT1E T-A (rs1408449/rs9344666) risk haplotype in cocaine-dependent patients.

without psychotic symptoms, that showed over-representation the T-A haplotype carriers compared to controls (P-adjusted = 0.020; OR = 1.27 (1.04-1.55); Table 3). No differences in the distribution of the risk haplotype carriers, however, were identified between the two clinical subgroups (presence/absence; P = 0.36) or when the time between the first consumption and the onset of cocaine dependence were considered (Z = -0.30; P = 0.77; Fig. 2).

## DISCUSSION

Several lines of evidence indicate that genes of the serotonergic and dopaminergic neurotransmission systems as well as neurotrophic factors represent strong candidates to be involved in the susceptibility to cocaine dependence. To our knowledge, this is the first comprehensive study that investigates exhaustively SNPs across genes related to these pathways. Our data provide preliminary evidence of association between 5-HT1E and cocaine dependence. Several strengths of our study reinforce the validity of the obtained results: 1)

**Table 3.** Distribution of carriers of the T-A (rs1408449/rs9344666) allelic combination within the 5-HT1E gene

	Haplotypes, n (%)		Adjusted for age			
	T-A carriers	Other haplotypes	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P
Cocaine dependence	243 (59.4)	166 (40.6)	1.51 (1.16-1.98)		1.22 (1.05-1.40)	
Cocaine dependence with Psychotic Symptoms	104 (55.9)	82 (44.1)	-	NS	-	NS
Cocaine dependence without Psychotic Symptoms	83 (61.5)	52 (38.5)	1.65 (1.12-2.44)		1.27 (1.04-1.55)	0.020
Controls	232 (49.2)	240 (50.8)				

In bold, significant P-values after Bonferroni correction (P < 0.017)  
NS: Not significant

cases and gender-matched control subjects were carefully selected from the same geographical area around Barcelona, Spain; 2) age effect was considered as a covariate; 3) genetic stratification was discarded using a specific set of markers and three statistical methods; 5) different methodologies for multiple testing correction were applied and 6) stringent laboratory quality control procedures were applied. However, a replicate study is warranted to test the association finding in an independent population.

The two *5-HT1E* SNPs that we found associated with cocaine dependence are located within introns and, although it is possible that they do not have functional consequences, they may be in LD with other unknown susceptibility variants directly involved in the genetic predisposition to cocaine dependence.

The postsynaptic *5-HT1E* receptor has not been studied with regard to cocaine dependence, and little is known about its particular functions. Nevertheless, several positive association results have been reported with this gene in other neuropsychiatric disorders such as ADHD (Lasky-Su *et al.*, 2008) and suicide attempt (Baca-Garcia *et al.*, 2010). Two nominal associations were also identified in our study in the *5-HT2A* gene, encoding another serotonin receptor. Previous studies focused on other serotonergic receptors found no association between them and cocaine dependence (*5-HT1B*, *5-HT3A* and *5-HT3B*) (Cigler *et al.*, 2001; Enoch *et al.*, 2010), consistently with our results.

The 5-HT system regulates processes related to reward and reinforcement and is also important for maintaining plasticity at the cellular level, which is the basis for behavioural adaptation. Clinical and pre-clinical studies have provided evidences that 5-HT and 5-HT receptors modulate the mechanism of action of cocaine, and the different subtypes of 5-HT receptors contribute to cocaine sensitization, self-administration, conditioned place preference, reinstatement of seeking behaviour and withdrawal symptoms in animal models (Filip, 2005; Muller & Huston, 2006; Filip *et al.*, 2010). Interestingly, studies performed with antagonists and agonists of *5-HT2A* receptors evidenced its important role on sensitization and cocaine stimulant effects, as well as cue-induced and reinstatement of cocaine seeking behaviour in animal models (Davidson *et al.*, 2002; Fantegrossi *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 2002; Filip *et al.*, 2004; Filip *et al.*, 2006a; Nic Dhonnchadha *et al.*, 2009).

Our study also identified nominal associations between genes related to the dopaminergic system (*DBH* and *TH*) and neurotrophic factors (*NTF3*) and receptors (*NTRK2*, *NTRK3*, *NGFR* and *CNTFR*). Although SNPs were selected under genetic coverage criteria and we achieved adequate coverage for most of them, gaps still exist in 17 genes because of genotyping failure of 35 SNPs, and their contribution to cocaine dependence can not be discarded.

Other association studies have also focused on dopaminergic genes obtaining controversial results. Positive associations have been described between cocaine dependence and the genes *DRD2* (Noble *et al.*, 1993), *DRD3* (Comings *et al.*, 1999), *DAT1* (Guindalini *et al.*, 2006; Fernandez-Castillo *et al.*, 2010) and *DBH* (Cubells *et al.*, 2000), but others failed to detect association with *DRD2* (Gelernter *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Fernandez-Castillo *et al.*, 2010; Lohoff *et al.*, 2010), *DRD3* (Freimer *et al.*, 1996; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007), *DRD4* (Ballon *et al.*, 2007; Bloch *et al.*, 2009), *DBH* (Guindalini *et al.*, 2008), *TPH2* (Dahl *et al.*,



2006) and *COMT* (Lohoff *et al.*, 2008). In our study the *DRD4* gene could not be tested because the two SNPs that covered the gene could not be genotyped for technical reasons. The lack of association in our study between cocaine dependence and those genes studied previously, and the conflicting results underscore the need for more extensive association studies in larger cohorts and with adequate genetic coverage. A recent study focused on the neurotrophic factor *CDNF*, not studied in our work, but did not report statistically significant differences (Lohoff *et al.*, 2009).

In conclusion, we identified association between *5-HT1E* and cocaine dependence. This result suggests the involvement of serotonergic receptors and neurotransmission in the genetic component that underlies the predisposition to cocaine dependence, although further association studies in independent cohorts are required to confirm our finding.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to patients and controls for their participation in the study, and to M. Dolors Castellar and others from the “Banc de Sang i Teixits” (Hospital Vall d’Hebron, Barcelona) and to Rebeca Ortega, Nuria Voltés, Carolina López, Oriol Esteve, Begonia Gonzalvo, Laia Miquel and Esther García, for their collaboration in the recruitment of samples. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III-FIS (PI051982), the “Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR” (2009GR00971) and the Department of Health of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya). MR and NF-C are recipients of a “Miguel de Servet contract” from the Instituto de Salud Carlos III and a grant from “Fundació La Marató de TV3” (092010), respectively. SNP genotyping services were provided by the Barcelona node of the Spanish National Genotyping Center (CeGen; www.cegen.org).

### REFERENCES

- Altar, C.A., Boylan, C.B., Jackson, C., Hershenson, S., Miller, J., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M. & Hyman, C. (1992) Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11347-11351.
- Angelucci, F., Ricci, V., Pomponi, M., Conte, G., Mathe, A.A., Attilio Tonali, P. & Bria, P. (2007) Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Psychopharmacol* 21, 820-825.
- Angelucci, F., Ricci, V., Spalletta, G., Caltagirone, C., Mathe, A.A. & Bria, P. (2009) Effects of psychostimulants on neurotrophins implications for psychostimulant-induced neurotoxicity. *Int Rev Neurobiol* 88, 1-24.
- Baca-Garcia, E., Vaquero-Lorenzo, C., Perez-Rodriguez, M.M., Gratacos, M., Bayes, M., Santiago-Mozos, R., Leiva-Murillo, J.M., de Prado-Cumplido, M., Artes-Rodriguez, A., Ceverino, A., Diaz-Sastre, C., Fernandez-Navarro, P., Costas, J., Fernandez-Piqueras, J., Diaz-Hernandez, M., de Leon, J., Baca-Baldomero, E., Saiz-Ruiz, J., Mann, J.J., Parsey, R.V., Carracedo, A., Estivill, X. & Oquendo, M.A. (2010) Nucleotide variation in central nervous system genes among male suicide attempters. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B, 208-213.
- Bahi, A., Boyer, F., Chandrasekar, V. & Dreyer, J.L. (2008) Role of accumbens BDNF and TrkB in cocaine-induced psychomotor sensitization, conditioned-place preference, and reinstatement in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 199, 169-182.
- Ballon, N., Leroy, S., Roy, C., Bourdel, M.C., Olie, J.P., Charles-Nicolas, A., Krebs, M.O. & Poirier, M.F. (2007) 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* 144B, 1034-1041.

- Beitner-Johnson, D. & Nestler, E.J. (1991) Morphine and cocaine exert common chronic actions on tyrosine hydroxylase in dopaminergic brain reward regions. *J Neurochem* 57, 344-347.
- Berglind, W.J., See, R.E., Fuchs, R.A., Ghee, S.M., Whitfield, T.W., Jr., Miller, S.W. & McGinty, J.F. (2007) A BDNF infusion into the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking in rats. *Eur J Neurosci* 26, 757-766.
- Berhow, M.T., Hiroi, N., Kobierski, L.A., Hyman, S.E. & Nestler, E.J. (1996) Influence of cocaine on the JAK-STAT pathway in the mesolimbic dopamine system. *J Neurosci* 16, 8019-8026.
- Berhow, M.T., Russell, D.S., Terwilliger, R.Z., Beitner-Johnson, D., Self, D.W., Lindsay, R.M. & Nestler, E.J. (1995) Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neuroscience* 68, 969-979.
- Bloch, P.J., Nall, A.H., Weller, A.E., Ferraro, T.N., Berrettini, W.H., Kampman, K.M., Pettinati, H.M., Dackis, C.A., O'Brien, C.P., Oslin, D.W. & Lohoff, F.W. (2009) Association analysis between polymorphisms in the dopamine D3 receptor (DRD3) gene and cocaine dependence. *Psychiatr Genet* 19, 275-276.
- Carlson, C.S., Eberle, M.A., Rieder, M.J., Yi, Q., Kruglyak, L. & Nickerson, D.A. (2004) Selecting a maximally informative set of single-nucleotide polymorphisms for association analyses using linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 74, 106-120.
- Cigler, T., LaForge, K.S., McHugh, P.F., Kapadia, S.U., Leal, S.M. & Kreek, M.J. (2001) Novel and previously reported single-nucleotide polymorphisms in the human 5-HT(1B) receptor gene: no association with cocaine or alcohol abuse or dependence. *Am J Med Genet* 105, 489-497.
- Comings, D.E., Gonzalez, N., Wu, S., Saucier, G., Johnson, P., Verde, R. & MacMurray, J.P. (1999) Homozygosity at the dopamine DRD3 receptor gene in cocaine dependence. *Mol Psychiatry* 4, 484-487.
- Cubells, J.F., Kranzler, H.R., McCance-Katz, E., Anderson, G.M., Malison, R.T., Price, L.H. & Gelernter, J. (2000) A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol Psychiatry* 5, 56-63.
- Dahl, J.P., Cubells, J.F., Ray, R., Weller, A.E., Lohoff, F.W., Ferraro, T.N., Oslin, D.W., Kampman, K.M., Dackis, C., Tang, Y., Gelernter, J., Kranzler, H.R., O'Brien, C.P. & Berrettini, W.H. (2006) Analysis of variations in the tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) gene in cocaine dependence. *Addict Biol* 11, 76-83.
- Davidson, C., Lazarus, C., Xiong, X., Lee, T.H. & Ellinwood, E.H. (2002) 5-HT2 receptor antagonists given in the acute withdrawal from daily cocaine injections can reverse established sensitization. *Eur J Pharmacol* 453, 255-263.
- Dudbridge, F. (2003) Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25, 115-121.
- Enoch, M.A., Gorodetsky, E., Hodgkinson, C., Roy, A. & Goldman, D. (2010) Functional genetic variants that increase synaptic serotonin and 5-HT3 receptor sensitivity predict alcohol and drug dependence. *Mol Psychiatry*.
- Everitt, B.J. & Robbins, T.W. (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* 8, 1481-1489.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
- Fallin, D. & Schork, N.J. (2000) Accuracy of haplotype frequency estimation for biallelic loci, via the expectation-maximization algorithm for unphased diploid genotype data. *Am J Hum Genet* 67, 947-959.
- Fantegrossi, W.E., Ullrich, T., Rice, K.C., Woods, J.H. & Winger, G. (2002) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. *Psychopharmacology (Berl)* 161, 356-364.
- Fernandez-Castillo, N., Ribases, M., Roncero, C., Casas, M., Gonzalvo, B. & Cormand, B. (2010) Association

- study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet* 20, 317-320.
- Filip, M. (2005) Role of serotonin (5-HT)<sub>2</sub> receptors in cocaine self-administration and seeking behavior in rats. *Pharmacol Rep* 57, 35-46.
- Filip, M., Alenina, N., Bader, M. & Przegalinski, E. (2010) Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5-HT) receptors in cocaine addiction. *Addict Biol* 15, 227-249.
- Filip, M., Bubar, M.J. & Cunningham, K.A. (2004) Contribution of serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes to the hyperlocomotor effects of cocaine: acute and chronic pharmacological analyses. *J Pharmacol Exp Ther* 310, 1246-1254.
- Filip, M., Bubar, M.J. & Cunningham, K.A. (2006a) Contribution of serotonin (5-HT) 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes to the discriminative stimulus effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 183, 482-489.
- Filip, M., Faron-Gorecka, A., Kusmider, M., Golda, A., Frankowska, M. & Dziejzicka-Wasylewska, M. (2006b) Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Res* 1071, 218-225.
- Filip, M., Nowak, E. & Papla, I. (2001) On the role of serotonin<sub>2A/2C</sub> receptors in the sensitization to cocaine. *J Physiol Pharmacol* 52, 471-481.
- First, M., Spitzer, R., Gibbon, M. & JBW, W. (1997) *Structured Clinical Interview for DSM-IV disorders (SCID-IV)*, Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Fletcher, P.J., Grottick, A.J. & Higgins, G.A. (2002) Differential effects of the 5-HT(2A) receptor antagonist M100907 and the 5-HT(2C) receptor antagonist SB242084 on cocaine-induced locomotor activity, cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of responding. *Neuropsychopharmacology* 27, 576-586.
- Freeman, A.Y. & Pierce, R.C. (2002) Neutralization of neurotrophin-3 in the ventral tegmental area or nucleus accumbens differentially modulates cocaine-induced behavioral plasticity in rats. *Synapse* 46, 57-65.
- Freimer, M., Kranzler, H., Satel, S., Lacobelle, J., Skipsey, K., Charney, D. & Gelernter, J. (1996) No association between D<sub>3</sub> dopamine receptor (DRD<sub>3</sub>) alleles and cocaine dependence. *Addict Biol* 1, 281-287.
- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S.N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J. & Altshuler, D. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296, 2225-2229.
- Gelernter, J., Kranzler, H. & Satel, S.L. (1999) No association between D<sub>2</sub> dopamine receptor (DRD<sub>2</sub>) alleles or haplotypes and cocaine dependence or severity of cocaine dependence in European- and African-Americans. *Biol Psychiatry* 45, 340-345.
- Gonzalez, J.R., Armengol, L., Sole, X., Guino, E., Mercader, J.M., Estivill, X. & Moreno, V. (2007) SNPAssoc: 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.
- Graham, D.L., Edwards, S., Bachtell, R.K., DiLeone, R.J., Rios, M. & Self, D.W. (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* 10, 1029-1037.
- Grimm, J.W., Lu, L., Hayashi, T., Hope, B.T., Su, T.P. & Shaham, Y. (2003) Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci* 23, 742-747.
- Guillin, O., Diaz, J., Carroll, P., Griffon, N., Schwartz, J.C. & Sokoloff, P. (2001) BDNF controls dopamine D<sub>3</sub>

receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 411, 86-89.

- Guindalini, C., Howard, M., Haddley, K., Laranjeira, R., Collier, D., Ammar, N., Craig, I., O'Gara, C., Bubb, V.J., Greenwood, T., Kelsoe, J., Asherson, P., Murray, R.M., Castelo, A., Quinn, J.P., Vallada, H. & Breen, G. (2006) A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4552-4557.
- Guindalini, C., Laranjeira, R., Collier, D., Messas, G., Vallada, H. & Breen, G. (2008) Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct* 4, 1.
- Hall, F.S., Li, X.F., Sora, I., Xu, F., Caron, M., Lesch, K.P., Murphy, D.L. & Uhl, G.R. (2002) Cocaine mechanisms: enhanced cocaine, fluoxetine and nisoxetine place preferences following monoamine transporter deletions. *Neuroscience* 115, 153-161.
- Hall, F.S., Sora, I., Drgonova, J., Li, X.F., Goeb, M. & Uhl, G.R. (2004) Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 1025, 47-56.
- Horger, B.A., Iyasere, C.A., Berhow, M.T., Messer, C.J., Nestler, E.J. & Taylor, J.R. (1999) Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19, 4110-4122.
- Kalivas, P.W. (2007) Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *Am J Addict* 16, 71-78.
- Kalivas, P.W. & O'Brien, C. (2008) Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33, 166-180.
- Kendler, K.S., Karkowski, L.M., Neale, M.C. & Prescott, C.A. (2000) Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry* 57, 261-269.
- Kendler, K.S. & Prescott, C.A. (1998) Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 173, 345-350.
- Kuhar, M.J., Ritz, M.C. & Boja, J.W. (1991) The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14, 299-302.
- Lasky-Su, J., Anney, R.J., Neale, B.M., Franke, B., Zhou, K., Maller, J.B., Vasquez, A.A., Chen, W., Asherson, P., Buitelaar, J., Banaschewski, T., Ebstein, R., Gill, M., Miranda, A., Mulas, F., Oades, R.D., Roeyers, H., Rothenberger, A., Sergeant, J., Sonuga-Barke, E., Steinhausen, H.C., Taylor, E., Daly, M., Laird, N., Lange, C. & Faraone, S.V. (2008) Genome-wide association scan of the time to onset of attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 147B, 1355-1358.
- Lohoff, F.W., Bloch, P.J., Ferraro, T.N., Berrettini, W.H., Pettinati, H.M., Dackis, C.A., O'Brien, C.P., Kampman, K.M. & Oslin, D.W. (2009) Association analysis between polymorphisms in the conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and cocaine dependence. *Neurosci Lett* 453, 199-203.
- Lohoff, F.W., Bloch, P.J., Hodge, R., Nall, A.H., Ferraro, T.N., Kampman, K.M., Dackis, C.A., O'Brien, C.P., Pettinati, H.M. & Oslin, D.W. (2010) Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1) genes with cocaine dependence. *Neurosci Lett* 473, 87-91.
- Lohoff, F.W., Weller, A.E., Bloch, P.J., Nall, A.H., Ferraro, T.N., Kampman, K.M., Pettinati, H.M., Oslin, D.W., Dackis, C.A., O'Brien, C.P. & Berrettini, W.H. (2008) Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology* 33, 3078-3084.
- Lu, L., Dempsey, J., Liu, S.Y., Bossert, J.M. & Shaham, Y. (2004) A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J Neurosci* 24, 1604-1611.
- Mannelli, P., Patkar, A.A., Murray, H.W., Certa, K., Peindl, K., Mattila-Evenden, M. & Berrettini, W.H. (2005)

- Polymorphism in the serotonin transporter gene and response to treatment in African American cocaine and alcohol-abusing individuals. *Addict Biol* 10, 261-268.
- Martin-Iverson, M.T. & Altar, C.A. (1996) Spontaneous behaviours of rats are differentially affected by substantia nigra infusions of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Eur J Neurosci* 8, 1696-1706.
- Martin-Iverson, M.T., Todd, K.G. & Altar, C.A. (1994) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 activate striatal dopamine and serotonin metabolism and related behaviors: interactions with amphetamine. *J Neurosci* 14, 1262-1270.
- Messas, G., Meira-Lima, I., Turchi, M., Franco, O., Guindalini, C., Castelo, A., Laranjeira, R. & Vallada, H. (2005) Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr Genet* 15, 171-174.
- 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.
- Muller, C.P. & Huston, J.P. (2006) Determining the region-specific contributions of 5-HT receptors to the psychostimulant effects of cocaine. *Trends Pharmacol Sci* 27, 105-112.
- Nestler, E.J. (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 78, 637-647.
- Nic Dhonnchadha, B.A., Fox, R.G., Stutz, S.J., Rice, K.C. & Cunningham, K.A. (2009) Blockade of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor suppresses cue-evoked reinstatement of cocaine-seeking behavior in a rat self-administration model. *Behav Neurosci* 123, 382-396.
- Noble, E.P., Blum, K., Khalsa, M.E., Ritchie, T., Montgomery, A., Wood, R.C., Fitch, R.J., Ozkaragoz, T., Sheridan, P.J., Anglin, M.D. & et al. (1993) Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 33, 271-285.
- Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Hoehe, M., Hill, K.P., Gottheil, E., Thornton, C.C. & Weinstein, S.P. (2002) No association between polymorphisms in the serotonin transporter gene and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Psychiatr Genet* 12, 161-164.
- Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Hoehe, M., Hill, K.P., Sterling, R.C., Gottheil, E. & Weinstein, S.P. (2001) Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Addict Biol* 6, 337-345.
- Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Mannelli, P., Gopalakrishnan, R., Hoehe, M.R., Bilal, L., Weinstein, S. & Vergare, M.J. (2004) Relationship between serotonin transporter gene polymorphisms and platelet serotonin transporter sites among African-American cocaine-dependent individuals and healthy volunteers. *Psychiatr Genet* 14, 25-32.
- Pierce, R.C., Pierce-Bancroft, A.F. & Prasad, B.M. (1999) Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J Neurosci* 19, 8685-8695.
- 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.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J. & Sham, P.C. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81, 559-575.

- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R. & Kuhar, M.J. (1988) Cocaine self-administration appears to be mediated by dopamine uptake inhibition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 12, 233-239.
- Sanchez, J.J., Phillips, C., Borsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila, M., Harrison, C.D., Musgrave-Brown, E., Salas, A., Syndercombe-Court, D., Schneider, P.M., Carracedo, A. & Morling, N. (2006) A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* 27, 1713-1724.
- Schoenbaum, G., Stalnaker, T.A. & Shaham, Y. (2007) A role for BDNF in cocaine reward and relapse. *Nat Neurosci* 10, 935-936.
- Sora, I., Hall, F.S., Andrews, A.M., Itokawa, M., Li, X.F., Wei, H.B., Wichems, C., Lesch, K.P., Murphy, D.L. & Uhl, G.R. (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5300-5305.
- Sorg, B.A., Chen, S.Y. & Kalivas, P.W. (1993) Time course of tyrosine hydroxylase expression after behavioral sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 424-430.
- Spealman, R.D. (1993) Modification of behavioral effects of cocaine by selective serotonin and dopamine uptake inhibitors in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 112, 93-99.
- Stephens, M., Smith, N.J. & Donnelly, P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68, 978-989.
- Storey, J. (2002) A direct approach to false discovery Rates. *J R Stat Soc Ser B* 64, 479-498.
- Thomas, M.J., Kalivas, P.W. & Shaham, Y. (2008) Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 154, 327-342.
- Thorisson, G.A., Smith, A.V., Krishnan, L. & Stein, L.D. (2005) The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15, 1592-1593.
- Tobler, A.R., Short, S., Andersen, M.R., Paner, T.M., Briggs, J.C., Lambert, S.M., Wu, P.P., Wang, Y., Spoonde, A.Y., Koehler, R.T., Peyret, N., Chen, C., Broomer, A.J., Ridzon, D.A., Zhou, H., Hoo, B.S., Hayashibara, K.C., Leong, L.N., Ma, C.N., Rosenblum, B.B., Day, J.P., Ziegler, J.S., De La Vega, F.M., Rhodes, M.D., Hennessy, K.M. & Wenz, H.M. (2005) The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. *J Biomol Tech* 16, 398-406.
- Tsuang, M.T., Lyons, M.J., Meyer, J.M., Doyle, T., Eisen, S.A., Goldberg, J., True, W., Lin, N., Toomey, R. & Eaves, L. (1998) Co-occurrence of abuse of different drugs in men: the role of drug-specific and shared vulnerabilities. *Arch Gen Psychiatry* 55, 967-972.
- Uhl, G.R., Hall, F.S. & Sora, I. (2002) Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry* 7, 21-26.
- Uhl, G.R., Liu, Q.R., Walther, D., Hess, J. & Naiman, D. (2001) Polysubstance abuse-vulnerability genes: genome scans for association, using 1,004 subjects and 1,494 single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 69, 1290-1300.
- Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J.C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., Greengard, P., Herve, D. & Girault, J.A. (2005) Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 491-496.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fischman, M.W., Foltin, R.W., Fowler, J.S., Abumrad, N.N., Vitkun, S., Logan, J., Gatley, S.J., Pappas, N., Hitzemann, R. & Shea, C.E. (1997a) Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386, 827-830.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Gatley, S.J., Hitzemann, R., Chen, A.D., Dewey, S.L. & Pappas, N. (1997b) Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature* 386, 830-833.

- Vrana, S.L., Vrana, K.E., Koves, T.R., Smith, J.E. & Dworkin, S.I. (1993) Chronic cocaine administration increases CNS tyrosine hydroxylase enzyme activity and mRNA levels and tryptophan hydroxylase enzyme activity levels. *J Neurochem* 61, 2262-2268.
- Wagner, F.A. & Anthony, J.C. (2002) From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology* 26, 479-488.
- Walsh, S.L. & Cunningham, K.A. (1997) Serotonergic mechanisms involved in the discriminative stimulus, reinforcing and subjective effects of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 130, 41-58.
- Weir, B. & Cockerham, C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.
- Wolf, M.E., Sun, X., Mangiavacchi, S. & Chao, S.Z. (2004) Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1, 61-79.
- Wu, J.C., Bell, K., Najafi, A., Widmark, C., Keator, D., Tang, C., Klein, E., Bunney, B.G., Fallon, J. & Bunney, W.E. (1997) Decreasing striatal 6-FDOPA uptake with increasing duration of cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* 17, 402-409.

**Table S1.** Description of the 132 SNPs initially selected for the SNPlex analysis within 19 serotonergic candidate genes for cocaine dependence.

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN	
<b>5-HT1A</b>	NM_000524	5q11.2-q13	1.268	1	2	1	rs878567	3'		1	rs10042486	
	NM_000863	6q13	1.172	1	3	2	rs130058 rs6296	5' Exon 1		1	rs6298	
<b>5-HT1D</b>	NM_000864	1p36.3-p34.3	2.833	1	3	2	rs676643 rs604030	5' 3'		1	rs674386	
<b>5-HT1E</b>	NM_000865	6q14-q15	78.986	3	13	8	rs828358	Intron 1		0.75	-	
							rs10944288	Intron 1		-	-	
							rs2325017	Intron 1	No SNPlex design		-	-
							rs1581774	Intron 2		-	-	
							rs1408449	Intron 2		-	-	
							rs942472	Intron 2	Genotyping Failure		-	-
							rs2209639	Intron 2		rs6935195, rs13340450, rs1886333, rs16878041, rs11964445	-	-
							rs9344666	3'		-	-	-
							rs1503433	5'		1	1	rs2016224
							rs17289394	5'		0.91	-	-
<b>5-HT2A</b>	NM_000621	13q14-q21	62.662	3	51+1	23	rs2070040	Intron 1			-	
							rs9534511	Intron 1		-	-	
							rs2296973	Intron 1		-	-	
							rs1328684	Intron 2		-	-	
							rs2770304	Intron 2		-	-	
							rs9526246	Intron 2		rs732821, rs731245, rs6311, rs6313, rs4941573, rs6561336, rs1928040	-	-
							rs1410657	Intron 2		rs985933, rs985934, rs972979	-	-
							rs2770296	Intron 2		rs2770298	-	-
							rs4941570	Intron 2		-	-	-
							rs2770293	Intron 2		-	-	-
							rs6561335	Intron 2		-	-	-
							rs2224721	Intron 2		-	-	-
							rs2760351	Intron 2	Genotyping Failure		-	-
							rs1885884	Intron 2	Genotyping Failure		-	-



Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN	
<b>5-HT2B</b>	NM_000867	2q37.1	16.869	4	5	4	rs7984966	Intron 2	Genotyping Failure	0.75	rs1549339	
							rs9534495	Intron 2				
							rs2770300	Intron 2				
							rs1923887	Intron 2				
							rs6561333	Intron 2				
							rs6561332	Intron 2				
							rs7997012	Intron 2				
							rs7322347	Intron 2				
							rs1058576 <sup>&amp;</sup>	Exon 3				Monomorphic
							rs6437000	Intron 3				
<b>5-HT2C</b>	NM_000868	Xq24	326.073	6	68+1	9	rs475717	5'	0.89	rs543229, rs539748, rs556677, rs12558624, rs6579490, rs17326436, rs2041675, rs7881868, rs5987797, rs7890593, rs2069237, rs5987801, rs7877304, rs5987802, rs5988087, rs11167435, rs11167436, rs6643889, rs5987810, rs5988105, rs2497551, rs2248440, rs2497548, rs2497542, rs2497540, rs2497538, rs2497537, rs2428722, rs2497535, rs2428716		
							rs3813928	5'				
							rs518147	Exó 1				
							rs6579495	Intron 2				
							rs6318 <sup>&amp;</sup>	Exon 4				
							rs2428721	Intron 4				
							rs4911871	Intron 4				
							rs2497503	Intron 4				
							rs4537474	Intron 4			No SNPlex design	
							rs12688871, rs3795182, rs17260565, rs17326429, rs11798460, rs12846241, rs12837651, rs11797955, rs12860460, rs12690355					
rs478209, rs547536, rs539023, rs498207, rs569959, rs498177, rs12838742, rs9698290, rs7055144, rs7887868, rs2192371, rs5988072, rs11798698, rs12847225, rs7890739, rs12688102												
rs12855702	rs2428720	rs6643897, rs12381959										

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
<b>5-HT<sub>3A</sub></b>	NM_000869	11q23.1	15.122	9	12	4	rs1150222	Intron 1		1	rs1176722, rs1176720, rs10891611, rs948983, rs1182457
							rs1985242	Intron 1			rs2276302
							rs1176717	Intron 5			rs11214796, rs1176713
							rs10160548	Intron 5			-
<b>5-HT<sub>3B</sub></b>	NM_006028	11q23.1	41.693	9	17	9	rs11214763	5'		0.67	rs7943062, rs7945926
							rs12270070	Intron 2	Genotyping Failure		rs2276307, rs4938059
							rs1176746	Intron 4	No SNPlex design		
							rs1176744	Exon 5			rs3758987, rs11214769
							rs1176743	Intron 6			rs7103572
							rs11214775	Intron 6			-
							rs3782025	Intron 6	Genotyping Failure		-
							rs1672717	Intron 6			rs1185027
							rs7129190	3'			-
							<b>5-HT<sub>4</sub></b>	NM_199453	5q31-q33		185.850
rs9686886	Intron 1		-								
rs7721747	Intron 1		rs6580561, rs11956922, rs2068190								
rs10223307	Intron 1		rs5028114, rs7701432								
rs7711800	Intron 1		-								
rs2910098	Intron 1	Genotyping Failure	rs10078551, rs13166230, rs13165109, rs13182913, rs6580558, rs1816067, rs11955434, rs13159629, rs2964276, rs9800062								
rs888957	Intron 1	No SNPlex design									
rs1820071	Intron 1	No SNPlex design									
rs6873382	Intron 1		rs4343830, rs1833708, rs1345697, rs7718022, rs1363545								
rs13166761	Intron 1		rs4336354, rs1777511, rs7715569, rs7726693, rs1708421, rs13173317, rs1820075, rs17720660, rs2895768, rs1368391, rs13159589, rs1777298, rs12152801, rs13173328, rs13179862, rs1973878								
rs10515616	Intron 1		rs17720691								
rs1368384	Intron 4		rs1422636								

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN	
<b>5-HT5A</b>	NM_024012	7q36.1	13.587	2	14	7	rs2005953	Intron 5			rs9325104, rs891962, rs6580555, rs1432913, rs1368388, rs1368386, rs13154725, rs7723153, rs1883074	
							rs4597955	Intron 5	Genotyping Failure		-	
							rs3995090	Intron 5			rs7733088, rs11166049, rs6887366, rs3995091, rs1985524, rs6889822, rs7735184, rs11168048, rs10463406	
							rs13156542	Intron 6			rs10037493, rs12717975, rs12374521	
							rs4274967	3'			rs2037997, rs7733401, rs7727320, rs7727161, rs1971431, rs1984789, rs9325098, rs6884076, rs4274968, rs4574533	
<b>5-HT6</b>	NM_000871	1p35-p36	14.275	3	2	2	rs1800883	5'	No SNPlex design	0.71		
							rs6320	Exon 1			-	
							rs2241859	Intron 1			-	
							rs2581841	Intron 1			rs1079515, rs2581838, rs731107, rs732050, rs1657269, rs1730208, rs1631327	
							rs6597455	Intron 1			-	
<b>5-HT7</b>	NM_019859	10q21-q24	117.093	4	53	11	rs1440449	Intron 1	No SNPlex design			
							rs4912138	Intron 1			1	rs11596518, rs1159921, rs11592512, rs3740046
<b>5-HT7</b>	NM_019859	10q21-q24	117.093	4	53	11	rs9659997	Intron 1				
							rs1298056	3'			1	rs4933195, rs1935351, rs11594548, rs12766851, rs11186309, rs4272713, rs12412496, rs4933607, rs7091039, rs7086484, rs7072526, rs7912164, rs11812708
							rs11817364	3'				rs7919103, rs6683736, rs7082558, rs10881832, rs7476323, rs2420367, rs11186300, rs7916848, rs4933194, rs1935347, rs11186297
							rs1274446	3'				-
							rs7904560	Intron 1			rs1573935	
<b>5-HT7</b>	NM_019859	10q21-q24	117.093	4	53	11	rs7916403	Intron 1			rs4520504, rs11599902, rs11597471, rs12259401, rs10785972, rs10881838, rs7087400	
							rs11186320	Intron 1				

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
<b>SLC6A4</b>	NM_001045	17q11.1-q12	377.99	15	16+1	4	rs12261011	Intron 1			rs11186341, rs11186338, rs12264160, rs12249377, rs12246118
							rs10785973	Intron 1			-
							rs2226116	Intron 1			-
							rs7084468	Intron 1			-
							rs12259062	Intron 1			rs12254390
							rs12150214	Intron 1	No SNPlex design	0.25	rs8071667, rs2020936, rs25528, rs6354;
rs2020942	Intron 3			rs2066713							
<b>DDC</b>	NM_000790	7p11	102.615	15	74	15	rs7803788	Intron 1			rs7807335, rs10265930, rs10249420
							rs2329340	Intron 1			rs1966839, rs921451, rs921450, rs1451374, rs1451373, rs6962356, rs6949897, rs10250513, rs2329341
							rs10499695	Intron 1			-
							rs11974297	Intron 1			rs10278338, rs6593010, rs3829897, rs6969081
							rs10499694	Intron 1			rs4947644, rs11765748, rs7786398, rs998850, rs11575334
rs2044859	Intron 1			-							
rs1982406	Intron 4			rs10244632							
rs7809758	Intron 6	No SNPlex design		rs2198144, rs1817074, rs4947584, rs2167364, rs1037351							
rs6944090	Intron 6			rs3735274, rs12690481, rs11238178, rs2100280							
rs6592961	Intron 6			-							
rs3823674	Intron 6			-							
rs2876827	Intron 10	No SNPlex design		rs6592952, rs1451372, rs2122822, rs12718541, rs11980368, rs1331361, rs4947577, rs11575457, rs10899734, rs1349492, rs4579483, rs4579483, rs4433100, rs4329234, rs11238138, rs12718529, rs12718528, rs4992502, rs2329365, rs7803247, rs730092							

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
							rs732215	Intron 11			rs1470750, rs12718574, rs12718572, rs1451371, rs10899736
							rs11761683	Intron 11			rs11238133
							rs11238131	Intron 11			rs7785224, rs4947535
<b>MAOA</b>	NM_000240	Xp11.3	90.658	15	14	2	rs3027400	Intron 9	Genotyping Failure	1	rs3027401, rs2235186, rs2235185, rs2205718, rs979606, rs979605, rs2239448, rs1801291, rs3027407, rs3027410, rs2064070
							rs2072743	Intron 10			rs2072744
<b>MAOB</b>	NM_000898	Xp11.23	115.823	15	10	5	rs5906213	5'		1	-
							rs5905512	Intron 1			-
							rs10521432	Intron 12			rs6651806, rs2283729, rs3027456
							rs1799836	Intron 13			-
							rs3027415	3'			rs5905449, rs3027450
<b>TPH1</b>	NM_004179	11p15.3-p14	19.771	10	15	4	rs10488683	Intron 3	Genotyping Failure	0.75	-
							rs172423	Intron 2			rs10488682, rs10832876, rs11024449
							rs1800532	Intron 6			rs508924, rs685657, rs684302, rs169806, rs211107, rs2056246, rs1607395, rs10741734
							rs211102	Intron 7			rs591556

\*Analyzed tagSNPs/total tagSNPs within the gene. <sup>§</sup>Non-synonymous SNP added in the study.

MAF: Minor allele frequency in the control sample

**Table S2.** Description of the 198 SNPs initially selected for the SNPlex analysis within 10 candidate genes for encoding neurotrophic factors and their receptors.

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	MAF	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
NGF	NM_002506	1p13.1	52.32	66	26		rs3811014	0.17	No SNPlex design	0.73	-
							rs17540656	0.36	-	-	-
							rs6673867	0.38	-	-	rs10776800, rs4634908
							rs17033706	0.12	Genotyping Failure	-	-
							rs10858075	0.36	No SNPlex design	-	-
							rs11102929	0.20	-	-	-
							rs4332358	0.19	-	-	rs11102925
							rs4320778	0.15	-	-	-
							rs10776799	0.14	-	-	-
							rs4839436	0.17	Genotyping Failure	-	-
							rs7530686	0.22	-	-	rs7523654, rs7535026, rs7516191, rs10442682, rs4565713
							rs7513144	0.12	-	-	rs10776798, rs4348722, rs11102924
							rs6537860	0.25	-	-	rs7544068
							rs11102922	0.37	-	-	rs4454548, rs4644491, rs12145726
							rs4240542	0.17	Genotyping Failure	-	rs4573519, rs4839434, rs10776797, rs4146585, rs4382725, rs7555016, rs4567277, rs4406631
							rs7520839	0.11	-	-	rs4076018, rs4076194, rs12058927
							rs6686615	0.49	No SNPlex design	-	-
							rs11102920	0.10	-	-	-
							rs2856811	0.33	-	-	-
							rs2856813	0.44	-	-	-
rs719452	0.18	-	-	rs2254527, rs2747058, rs6678898							
rs910330	0.24	-	-	rs6678788							
rs2254404	0.24	-	-	rs1318345, rs2239622							
rs6327	0.48	-	-	rs6330, rs2747063							
rs6328	0.30	-	-	-							
rs6329	0.10	Genotyping Failure	-	-	rs1555207, rs2179926, rs11466102, rs4623700, rs4626883, rs10858073						

Table S2. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	MAF	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
<b>BDNF</b>	NM_170731	11p13	66.85	21	8		rs1491851	0.49		1	-
							rs1491850	0.44		-	-
							rs908867	0.12	MAF < 0.10	-	-
							rs12273363	0.19		-	-
							rs6265 <sup>*</sup>	0.18		rs2049045	-
							rs10501087	0.20		rs11030104, rs7103411	-
rs925946	0.36		rs1519480, rs7124442, rs1401635, rs7127507, rs11030121	-							
rs11030096	0.41		rs1519479, rs2203877, rs2049046, rs2030324, rs7934165	-							
<b>NTF3</b>	NM_002527	12p13	1.198	6	6		rs7484401	0.53		1	-
							rs4074967	0.23		-	-
							rs6332	0.53		-	-
							rs6489630	0.23		-	-
							rs7956189	0.10		-	-
							rs4073543	0.42		-	-
<b>NTF4/5</b>	NM_006179	19q13.3	2.72	3	3		rs17206784	0.48		1	-
							rs4802546	0.12	MAF < 0.10	-	-
							rs11669977	0.20		-	-
							rs17489568	0.16		rs663721, rs10896796	-
<b>CNTF</b>	NM_000614	11q12.2	3.06	8	3		rs550942	0.17		1	-
							rs11229549	0.19		rs7111377, rs12360860, rs11229550	-
							rs926103	0.26	Genotyping Failure	0.57	-
<b>NTRK1</b>	NM_001007792	1q21-q22	66.100	30	14		rs1800601	0.24		0.57	rs1800600, rs7517728
							rs7522395	0.15		rs2768764, rs6427332, rs1888862, rs1888861, rs7516856, rs6689750	-
							rs1998977	0.29		rs7531222, rs7516736, rs12756019, rs11264570	-
							rs6674412	0.18		rs4661061, rs6427333, rs725424	-

Table S2. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	MAF	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
<b>NTRK2</b>	NM_006180	9q22.1	355.039		170	50	rs4661229	0.25		-	
							rs10908521	0.22		-	
							rs11590051	0.24		-	
							rs11264578	0.20	No SNPlex design	-	
							rs1007211 &	0.08	Genotyping Failure	-	
							rs1800879	0.43	Genotyping Failure	-	
							rs12132885	0.49	No SNPlex design	-	
							rs6334	0.21		-	
							rs2768755	0.25	No SNPlex design	-	
							rs2644596	0.22		-	
							rs1201364	0.11		0.86	rs1001904, rs1001905, rs1147195, rs1659412
							rs1201363	0.41			rs1659414, rs1212171, rs993315, rs1187327, rs1187329
							rs1187332	0.13			-
							rs999244	0.16			rs3758317
							rs1147193	0.22			rs1147194, rs1147198, rs1147199, rs1307279, rs1187321, rs1187323, rs1211166, rs1187328, rs1187329
							rs1439050	0.30			-
							rs893584	0.41	No SNPlex design		rs1187353, rs1187349
rs1187352	0.34			rs1187343, rs1187336							
rs1187356	0.43			rs1187351, rs1187350, rs1619120, rs1778912, rs893582, rs1187341, rs1025743, rs1187337, rs1659409, rs1778929, rs1778931, rs1778932, rs1778934, rs1659401, rs1659400, rs1439048, rs2579369, rs2265, rs2489162, rs2579371							
rs1187362	0.27			-							
rs1209068	0.15			-							
rs3780632	0.30			rs10746747, rs7048278, rs4877877, rs7023589, rs2378671, rs10746750, rs1573219, rs7038866, rs1778971, rs1778970, rs1662697, rs1187272, rs1838159, rs1899640, rs1443444							
rs4877880	0.20			rs1662696, rs1443441, rs1443440, rs1899641							



Table S2. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	MAF	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
							rs1662695	0.11			rs4144550
							rs716893	0.36	Genotyping Failure		rs720141, rs1627784, rs1036915, rs1036914
							rs1187274	0.42			-
							rs7816	0.24			rs1662699, rs1187287, rs1187280, rs1047896, rs1624327, rs1662701, rs1778913, rs729705, rs10512154, rs9314735
							rs2083828	0.47	No SNPlex design		rs2083827
							rs1867283	0.47			-
							rs7855888	0.28			-
							rs11140783	0.11	MAF < 0.10		-
							rs2120266	0.19			rs4366158, rs3780634, rs1221
							rs10735569	0.17	No SNPlex design		rs1822420
							rs10868232	0.20			rs1838158, rs9314736
							rs4877289	0.41			rs10868229, rs10868235
							rs1443445	0.27			-
							rs920776	0.20			rs2253891, rs1006446
							rs995861	0.34			rs6559838, rs2586566
							rs1545285	0.48			rs2808707
							rs7045900	0.13	MAF < 0.10		rs1002261, rs3824519
							rs2289656	0.17	Genotyping Failure		-
							rs2277192	0.16			-
							rs2277193	0.29			-
							rs4412435	0.47			rs4877894, rs4075561, rs4075562, rs4075274
							rs10868241	0.39			-
							rs4361832	0.24			-
							rs11795386	0.13			rs3860945
							rs12000011	0.36			rs4242630, rs4305979, rs4631550, rs1565446, rs4242632, rs1490405, rs1490404, rs4142910, rs7853433, rs729560

Table S2. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	MAF	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
<b>NTRK3</b>	NM_001012338	15q25	379.64	109	63		rs10512159	0.11	Genotyping Failure	-	-
							rs1948308	0.43		rs2378676, rs4877900, rs2291506, rs1387923	
							rs2378672	0.12	MAF < 0.10	-	-
							rs1387926	0.16		-	-
							rs1387924	0.21		-	-
							rs3739570	0.11	MAF < 0.10	-	-
							rs1490403	0.33		-	-
							rs10780695	0.33	Genotyping Failure	rs1565448, rs2200968, rs10780697	-
							rs1073049	0.20		-	-
							rs1586681	0.13		rs1565451, rs995671	-
							rs1187286	0.29		rs1187283	-
							rs10116287	0.15		rs10119181, rs7875184, rs12353238	-
							rs7164531	0.19		-	0.86
							rs998636	0.26		rs1365288	-
							rs744993	0.15		-	-
							rs744994	0.27		rs878646	-
							rs4887400	0.27		rs1105693	-
							rs7176520	0.47		-	-
							rs4887210	0.12		rs2349054, rs2081556, rs1863482, rs12591252, rs1559824, rs11073768, rs1863484, rs4887391, rs7172664, rs1863487, rs1863488, rs4887394, rs4887395, rs1863489, rs2076864, rs1075891, rs12899792, rs4887399	-
							rs1105962	0.40	No SNPlex design	-	-
rs6496469	0.33		-	-							
rs1863494	0.33		-	-							
rs1346164	0.29		rs8042990	-							
rs2162266	0.23		-	-							
rs4887376	0.38	Genotyping Failure	-	-							
rs8025158	0.30		-	-							

Table S2. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	MAF	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
							rs10520676	0.29			-
							rs12594095	0.29			-
							rs12148845	0.34	No SNPlex design		-
							rs3784406	0.36			rs1991287, rs11073767, rs1529323
							rs7180942	0.42			rs2059588, rs1110306
							rs1834573	0.41			-
							rs991729	0.34			-
							rs4887364	0.20	No SNPlex design		rs3784412, rs994068
							rs3784416	0.43			-
							rs1461210	0.44			rs3784429, rs8036369, rs4887205, rs2279409, rs3784413,
							rs10520673	0.34			rs1870736
							rs3825884	0.33			-
							rs3825885	0.23			-
							rs12595249	0.29			-
							rs4887351	0.18			-
							rs1948066	0.26			-
							rs12594283	0.24			-
							rs12440144	0.23			rs4887204, rs7167737
							rs4887348	0.23			-
							rs1381112	0.16			-
							rs999905	0.32			rs1841551, rs10520672
							rs2009966	0.34			-
							rs4887346	0.42	No SNPlex design		rs6030107, rs898707
							rs2009853	0.11			rs4989257
							rs4887342	0.48			-
							rs922231	0.39			-
							rs922232	0.39			-

Table S2. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	MAF	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
							rs1461214	0.18			-
							rs4887339	0.26	No SNPlex design		-
							rs8038245	0.43	Genotyping Failure		-
							rs7170215	0.39			-
							rs4887337	0.13			-
							rs1369426	0.48			-
							rs7164421	0.35			rs1007533
							rs1435399	0.15			-
							rs3784434	0.10			-
							rs1836592	0.15			rs879131
							rs1347424	0.43			-
							rs1369423	0.48	Genotyping Failure		-
							rs3903308	0.43			-
							rs1435402	0.34			-
							rs1435403	0.20			rs3784441
							rs11638486	0.23			-
							rs1369430	0.33			-
							rs2117655	0.29			-
							rs1560975	0.35	Genotyping Failure		-
							rs7176429	0.34			-
							rs1017412	0.28			rs6496451
							rs3743165	0.37			rs3743164
<b>NGFR</b>	NM_002507	17q21-q22	19.694	12	9		rs2537710	0.44	Genotyping Failure	0.67	-
							rs603769	0.45			rs575791
							rs565042	0.34	No SNPlex design		-
							rs3785931	0.31			-
							rs657770	0.38			-
							rs534561	0.36			-

Table S2. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	MAF	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
							rs2072445	0.11	MAF < 0.10		rs3785930
							rs741071	0.43	No SNPlex design		rs741072
							rs741073	0.23			-
<b>CNTFR</b>	NM_147164	9p13	38.27	23	16		rs7036351	0.10		0.94	-
							rs3763613	0.14			-
							rs3763614	0.11	MAF < 0.10		rs12001648, rs7037232
							rs3763615	0.27			-
							rs1080750	0.38			-
							rs6476454	0.17	Genotyping Failure		rs3808873, rs3808871
							rs12551429	0.41			-
							rs10758268	0.38			-
							rs10814123	0.12	MAF < 0.10		rs4472605
							rs1124882	0.11	MAF < 0.10		rs2070802
							rs2381164	0.34			-
							rs2381165	0.16			rs2183013
							rs4363285	0.16			-
							rs2274592	0.27			-
							rs4395980	0.28			-
							rs10972144	0.23			-

\*Analyzed tagSNPs/total tagSNPs within the gene. <sup>§</sup>Non-synonymous SNP added in the study.  
MAF: Minor allele frequency in the control sample

**Table S3** Description of the 69 SNPs initially selected for the SNPlex analysis within 9 dopaminergic candidate genes for cocaine dependence

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
<b>DRD1</b>	NM_00794	5q35.1	3.127	2	11	8	rs4867798	3'UTR	Genotyping Failure	0.87	-
							rs251937	3'	-		rs703748
							rs11749676	3'	-		rs686, rs265978
							rs835540	3'	-		-
							rs835616	3'	-		-
							rs835541	3'	-		-
							rs863126	3'	-		-
							rs265977	3'	-		-
<b>DRD2</b>	NM_000795	11q23	65.56	8	35	10	rs4630328	Intron 1	-	1	rs17601612
							rs7131056	Intron 1	-		-
							rs4245146	Intron 1	-		rs4245147, rs4274224
							rs17529477	Intron 1	-		-
							rs2002453	Intron 1	-		rs1076562, rs2005313, rs2245805, rs4586205, rs4648318
							rs12363125	Intron 2	-		rs1076563, rs12364051, rs12800853, rs2587548, rs2734833, rs2734837, rs2734838, rs2734839, rs4587762, rs4938017, rs7122246, rs7131440
							rs2283265	Intron 5	-		-
							rs2242592	3'	-		rs2734841, rs2734842, rs6275, rs6279
							rs1554929	3'	-		rs10891549
							rs2234689	3'	-		-
							rs9825563	5'	-		0.82
							rs1800828	Intron 1	-		-
							rs6280	Exon 2	-		rs324026, rs7638876
rs10934256	Intron 2	-	rs7633291								
rs167770	Intron 2	-	rs226082, rs324030, rs7625282, rs324029, rs324022, rs11721264								
rs167771	Intron 3	-	-								
rs324035	Intron 3	-	-								
rs9880168	Intron 3	MAF < 0.10	-								
rs2134655	Intron 5	-	-								
rs3732790	3'	No HWI	-								
rs2399496	3'	Genotyping Failure	rs963468, rs3773679, rs9817063								
<b>DRD3</b>	NM_000796	3q13.3	50.34	7	23	11	rs9825563	5'	-	0.82	-
							rs1800828	Intron 1	-		-
							rs6280	Exon 2	-		rs324026, rs7638876
							rs10934256	Intron 2	-		rs7633291
							rs167770	Intron 2	-		rs226082, rs324030, rs7625282, rs324029, rs324022, rs11721264
							rs167771	Intron 3	-		-
							rs324035	Intron 3	-		-
							rs9880168	Intron 3	MAF < 0.10		-
							rs2134655	Intron 5	-		-
							rs3732790	3'	No HWI		-
							rs2399496	3'	Genotyping Failure		rs963468, rs3773679, rs9817063

Table S3. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN
<b>DRD4</b>	NM_000797	11p15.5	3.399	4	4	2	rs3758653	5'	No SNPlex design	0	-
							rs936465	3'	Genotyping Failure		rs4331145, rs11246226
<b>DRD5</b>	NM_000798	4p16.1	2.03	1	3	2	rs2227850	Exon 1	Monomorphic	0.5	
							rs10033951	3'			rs2867383
<b>COMT</b>	NM_000754	22q11.21	27.22	6	14	10	rs2020917	5'		0.8	rs737866
							rs933271	Intron 1			rs174675
							rs1544325	Intron 1			rs5993883
							rs740603	Intron 1			-
							rs740601	Intron 3			rs2239393
							rs4680	Exon 4	Genotyping Failure		-
							rs4646316	Intron 5			-
							rs174696	Intron 5	No SNPlex design		-
							rs165774	Intron 5			-
							rs9332377	Intron 5			-
							<b>DBH</b>	NM_000787	9q34	22.98	12
rs2797851	Intron 1			rs2519155, rs279785, rs2797849							
rs1548364	Intron 3			rs161122, rs161125, rs2873804							
rs2797855	Intron 5			rs161123							
rs1541332	Intron 5			-							
rs2519154	Intron 5			-							
rs2797853	Intron 5			-							
rs6479643	Intron 6			-							
rs77905	Exon 9			-							
rs2097628	Intron 9	No SNPlex design		rs2097629							
rs2073833	Intron 9			-							
rs1611131	Intron 10			-							
rs129883	3'			-							
rs129915	3'	No SNPlex design		-							
<b>SLC6A3</b>	NM_001044	5p15.3	52.63	15	19	9	rs2617605	Intron 2	Genotyping Failure	0.78	-
							rs460700	Intron 4			rs464061, rs456082, rs409588, rs458860, rs464528, rs463379, rs456774, rs460000
							rs37020	Intron 6			rs464049, rs458334

Table S2. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage*	Other SNPs within the BIN	
TH	NM_199292	11p15.5	7.876	14	4	3	rs13161905	Intron 6			-	
							rs27048	Intron 8			-	
							rs6347	Exon 9			-	
							rs11133767	Intron 13			-	
							rs40184	Intron 14			-	
							rs2975292	3'	No SNPlex design			-
							rs10770140	5'	Genotyping Failure	0.67		rs10770141
rs6356	Exon 2				-							
						rs2070762	Intron 13				-	

\* Analyzed tagSNPs/total tagSNPs within the gene. MAF: Minor allele frequency in the control sample

Table S4. Assessment of population stratification using 44 unlinked SNPs .

Number of subpopulations (K)	LnP(D)*	Var[Ln(P)]**	Posterior probability of K**
1	-48188.8	0.49	0.9999
2	-48301.6	94.70	9.87e-50
3	-48340.5	119.88	1.31e-66
4	-48493.0	212.45	7.88e-133
5	-48520.0	124.63	1.39e-144

\* Ln of the probability of the data, calculated as an average of five independent iterations, with burning period and number of MCMC repeats after burning set to 100,000. An admixture ancestry model with correlated allele frequencies ( $\lambda=1$ ) was assumed; \*\* Variance of the four LnP(D) iterations;\*\*\* Calculated using Bayes' rule.



**Table S5.** Nominal P-values observed when genotype frequencies of 319 SNPs within 37 candidate genes were considered under the codominant model in 432 cocaine dependent patients and 482 controls.

GENE	SNP	P-value
<b>Serotonergic system</b>		
5-HT1A	rs878567	0.6843
5-HT1B	rs130058	0.5617
	rs6296	0.3443
5-HT1D	rs676643	0.9258
	rs604030	0.4748
5-HT1E	rs828358	0.6459
	rs10944288	0.2074
	rs1581774	0.8966
	rs1408449	
	rs2209639	0.9089
	rs9344666	0.6126
5-HT1F	rs1503433	0.2682
5-HT2A	rs17289394	0.9618
	rs2070040	0.8561
	rs9534511	0.3865
	rs2296973	0.5064
	rs1328684	0.6289
	rs2770304	0.6583
	rs9526246	0.4017
	rs1410657	0.4351
	rs2770296	0.7542
	rs4941570	0.2591
	rs2770293	0.1933
	rs6561335	0.9169
	rs2224721	0.5838
	rs7984966	0.1736
	rs9534495	0.1686
	rs2770300	0.0705
	rs1923887	0.1925
	rs6561333	
	rs6561332	
		rs7997012
	rs7322347	0.5455
5-HT2B	rs10194776	0.9227
	rs16827801	0.8527
	rs4973377	0.2828
5-HT2C	rs475717	0.9195
	rs3813928	0.1920
	rs518147	0.2104
	rs6579495	0.2808
	rs6318	0.5793
	rs2428721	0.4274
	rs4911871	0.4289
	rs2497503	0.3956
5-HT3A	rs1150222	0.8751
	rs1985242	0.0700
	rs1176717	0.8300
	rs10160548	0.8696
5-HT3B	rs11214763	0.1533
	rs1176744	0.9177
	rs1176743	0.4844
	rs11214775	0.2790
	rs1672717	0.2067
	rs7129190	0.7052
5-HT4	rs6865654	0.8488

GENE	SNP	P-value
	rs9686886	0.6576
	rs7721747	0.5798
	rs10223307	0.6306
	rs7711800	0.3870
	rs6873382	0.2845
	rs13166761	0.0918
	rs10515616	0.3749
	rs1368384	0.3859
	rs2005953	0.6922
	rs3995090	0.5653
	rs13156542	0.8049
	rs4274967	0.9562
5-HT5A	rs6320	0.6524
	rs2241859	0.4465
	rs2581841	0.7332
	rs6597455	0.6333
	rs1657268	0.3299
5-HT6	rs4912138	0.1119
	rs9659997	0.1340
5-HT7	rs1298056	0.0514
	rs11817364	0.4926
	rs1274446	0.1380
	rs7904560	0.2872
	rs7916403	0.2004
	rs11186320	0.4416
	rs12261011	0.5802
	rs10785973	0.9843
	rs2226116	0.7256
	rs7084468	0.6757
	rs12259062	0.6562
SLC6A4	rs2020942	0.9967
DDC	rs7803788	0.6113
	rs2329340	0.5438
	rs10499695	0.3011
	rs11974297	0.8477
	rs10499694	0.5025
	rs2044859	0.9922
	rs1982406	0.1449
	rs6944090	0.0629
	rs6592961	0.1992
	rs3823674	0.7916
	rs732215	0.8490
rs11761683	0.6538	
rs11238131	0.8024	
MAOA	rs2072743	0.9572
MAOB	rs5906213	0.7935
	rs5905512	0.7574
	rs10521432	0.1097
	rs1799836	0.7195
	rs3027415	0.3705
TPH1	rs172423	0.9469
	rs1800532	0.6151
	rs211102	0.0501
<b>Dopaminergic system</b>		
DRD1	rs251937	0.2847
	rs11749676	0.8421
	rs835540	0.8838

Table S5. (Continued)

GENE	SNP	P-value
	rs835616	0.9578
	rs835541	0.5915
	rs863126	0.1064
	rs265977	0.8815
<i>DRD2</i>	rs4630328	0.2045
	rs7131056	0.9464
	rs4245146	0.0932
	rs17529477	0.9849
	rs2002453	0.5558
	rs12363125	0.1876
	rs2283265	0.1991
	rs2242592	0.5202
	rs1554929	0.1391
	rs2234689	0.1503
<i>DRD3</i>	rs9825563	0.4878
	rs1800828	0.5681
	rs6280	0.8536
	rs10934256	0.6029
	rs167770	0.8111
	rs167771	0.4350
	rs324035	0.4016
	rs2134655	0.8438
<i>DRD5</i>	rs10033951	0.6352
<i>COMT</i>	rs2020917	0.6896
	rs933271	0.5699
	rs1544325	0.4239
	rs740603	0.5116
	rs740601	0.2062
	rs4646316	0.7938
	rs165774	0.2126
	rs9332377	0.9947
<i>DBH</i>	rs2007153	0.5108
	rs2797851	0.7909
	rs1548364	0.7308
	rs2797855	0.8191
	rs1541332	0.7352
	rs2519154	0.6961
	rs2797853	0.2385
	rs6479643	
	rs77905	0.4266
	rs2073833	0.3329
	rs1611131	0.8675
	rs129883	0.7352
<i>SLC6A3</i>	rs460700	0.4265
	rs37020	0.6058
	rs13161905	0.2209
	rs27048	0.0623
	rs6347	0.8747
	rs11133767	0.3768
	rs40184	0.3944
<i>TH</i>	rs6356	0.4874
	rs2070762	
<b>Neurotrophic factors and receptors</b>		
<i>NGF</i>	rs17540656	0.6277
	rs6673867	0.6803
	rs11102929	0.1546
	rs4332358	0.4382

Table S5. (Continued)

GENE	SNP	P-value
	rs4320778	0.0516
	rs10776799	0.2623
	rs7530686	0.4535
	rs7513144	0.7076
	rs6537860	0.4175
	rs11102922	0.8210
	rs7520839	0.6543
	rs11102920	0.4000
	rs2856811	0.6560
	rs2856813	0.8287
	rs719452	0.8149
	rs910330	0.8031
	rs2254404	0.3129
	rs6327	0.0592
	rs6328	0.4124
<i>BDNF</i>	rs1491851	0.8876
	rs1491850	0.5037
	rs12273363	0.4867
	rs6265	0.5114
	rs10501087	0.6054
	rs925946	0.7471
	rs11030096	0.4964
<i>NTF3</i>	rs7484401	0.5537
	rs4074967	0.4929
	rs6332	0.5255
	rs6489630	0.4039
	rs7956189	0.1611
	rs4073543	
<i>NTF4/5</i>	rs17206784	0.1163
	rs11669977	0.5338
<i>CNTF</i>	rs17489568	0.8882
	rs550942	0.1142
	rs11229549	0.6983
<i>NTRK1</i>	rs1800601	0.0787
	rs7522395	0.3028
	rs1998977	0.0721
	rs6674412	0.1276
	rs4661229	0.4891
	rs10908521	0.5411
	rs11590051	0.7408
	rs6334	0.6419
	rs2644596	0.7921
<i>NTRK2</i>	rs1201364	0.2725
	rs1201363	0.1990
	rs1187332	0.0705
	rs999244	0.4148
	rs1147193	
	rs1439050	0.1308
	rs1187352	0.1719
	rs1187356	0.2941
	rs1187362	0.8467
	rs1209068	0.9470
	rs3780632	0.7996
	rs4877880	0.5131
	rs1662695	0.8689
	rs1187274	0.7833
	rs7816	0.0995

Table S5. (Continued)

GENE	SNP	P-value
	rs1867283	0.9417
	rs7855888	0.8085
	rs2120266	0.9042
	rs10868232	0.1313
	rs4877289	0.1293
	rs1443445	0.2498
	rs920776	0.5772
	rs995861	0.3919
	rs1545285	0.2619
	rs2277192	0.8968
	rs2277193	0.7957
	rs4412435	0.7361
	rs10868241	0.5171
	rs4361832	0.1843
	rs11795386	0.8911
	rs1200011	0.2255
	rs1948308	0.1893
	rs1387926	0.5323
	rs1387924	0.4564
	rs1490403	0.0700
	rs1073049	0.5498
	rs1586681	0.8590
	rs1187286	0.5176
	rs10116287	0.0540
<i>NTRK3</i>	rs7164531	0.2713
	rs998636	
	rs744993	0.2732
	rs744994	
	rs4887400	0.1186
	rs7176520	0.2637
	rs4887210	0.2304
	rs6496469	0.3802
	rs1863494	0.8741
	rs1346164	0.1099
	rs2162266	0.6203
	rs8025158	0.0895
	rs10520676	0.3882
	rs12594095	0.0611
	rs3784406	0.2423
	rs7180942	0.3276
	rs1834573	0.0732
	rs991729	0.4711
	rs3784416	0.2356
	rs1461210	0.6930
	rs10520673	0.2882
	rs3825884	0.4560
	rs3825885	0.5622
	rs12595249	
	rs4887351	0.5754
	rs1948066	0.6727
	rs12594283	0.4569
	rs12440144	0.9982
	rs4887348	0.4063
	rs1381112	0.6517
	rs999905	0.6146
	rs2009966	0.4417
	rs2009853	0.3746

Table S5. (Continued)

GENE	SNP	P-value
	rs4887342	0.7402
	rs922231	0.9658
	rs922232	0.6775
	rs1461214	0.9696
	rs7170215	0.2246
	rs4887337	0.9962
	rs1369426	0.9741
	rs7164421	0.5891
	rs1435399	0.9464
	rs3784434	0.6665
	rs1836592	0.7328
	rs1347424	0.4112
	rs3903308	0.8347
	rs1435402	0.9340
	rs1435403	0.1995
	rs11638486	0.4557
	rs1369430	0.8387
	rs2117655	0.7831
	rs7176429	0.8166
	rs1017412	0.6053
	rs3743165	0.7863
<i>NGFR</i>	rs603769	0.8480
	rs3785931	0.1914
	rs657770	0.6869
	rs534561	
	rs741073	0.5711
<i>CNTFR</i>	rs7036351	
	rs3763613	0.1471
	rs3763615	0.3406
	rs1080750	0.7012
	rs12551429	0.3824
	rs10758268	0.6301
	rs2381164	0.1073
	rs2381165	0.0811
	rs4363285	
	rs2274592	0.3974
	rs4395980	0.6185
	rs10972144	0.0783

In bold, nominally significant P-values



## CAPÍTOL 2. COCAÏNA I NEUROSECRECIÓ SINÀPTICA: ESTUDI D'ASSOCIACIÓ

### Article 3

#### Estudi d'associació d'una via candidata en la dependència de cocaïna: el control de l'alliberament de neurotransmissors

##### RESUM

La cocaïna és la segona droga il·legal més consumida a Europa. La transició de l'ús a la dependència implica factors tant genètics com ambientals. La variació genètica en els sistemes de neurotransmissió està implicada en la susceptibilitat a la dependència de cocaïna. En el present treball, s'ha avaluat la possible contribució a la dependència de cocaïna de 15 gens implicats en la maquinària cel·lular que controla l'alliberament de neurotransmissors: gens que codifiquen proteïnes del complex SNARE (*STX1A*, *SNAP25*, *VAMP1* i *VAMP2*), elements del control de la fusió de vesícules a la membrana presinàptica (*SYT*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2*, *CPLX3* i *CPLX4*) i elements reguladors (*STXBP1*, *SYP*, *SNPH*, *NSF*, i *RAB3A*). Es van genotipar 121 SNPs seleccionats segons criteris de cobertura genètica en 360 pacients dependents de cocaïna i 360 controls espanyols. Les anàlisis de marcadors individuals i haplotips van mostrar associació entre la dependència de cocaïna i el gen *NSF*, que codifica el Factor Sensible a N-etilmaleimida ( $P = 5,1 \times 10^{-4}$ , OR = 2,44 (1,45-4,00) i  $P = 0,001$ , OR = 1,82 (1,28-2,59), respectivament). Quan es va considerar el temps transcorregut entre el consum inicial i l'aparició de la dependència a cocaïna, es va observar que l'associació estava principalment restringida al grup de pacients que van desenvolupar ràpidament dependència a la droga ( $\leq 2$  anys;  $P = 2,98 \times 10^{-6}$ , OR = 1,33 (1,20-1,47)). Les nostres dades mostren evidències preliminars que *NSF* podria predisposar no només a la dependència de cocaïna, sinó també a una ràpida aparició de la dependència.

##### REFERÈNCIA

N. Fernández-Castillo, B. Cormand, C. Roncero, C. Sánchez-Mora, L. Grau-López, B. Gonzalvo, L. Miquel, R. Corominas, J.A. Ramos-Quiroga, M. Casas, M. Ribasés. Candidate pathway association study in cocaine dependence: the control of neurotransmitter release. *The World Journal of Biological Psychiatry* [en premsa].



## CANDIDATE PATHWAY ASSOCIATION STUDY IN COCAINE DEPENDENCE: THE CONTROL OF NEUROTRANSMITTER RELEASE

Noèlia Fernández-Castillo<sup>1,2,3</sup>, Bru Cormand<sup>1,2,3</sup>, Carlos Roncero<sup>4,5,6</sup>, Cristina Sánchez-Mora<sup>4,7</sup>, Lara Grau-Lopez<sup>6</sup>, Begoña Gonzalvo<sup>6</sup>, Laia Miquel<sup>6</sup>, Roser Corominas<sup>1,2</sup>, Josep Antoni Ramos-Quiroga<sup>4,5</sup>, Miquel Casas<sup>4,5</sup>, Marta Ribasés<sup>4,7</sup>

<sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>2</sup>CIBER Enfermedades Raras, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>3</sup>Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Catalonia, Spain

<sup>4</sup>Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>5</sup>Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>6</sup>Outpatient Drug Clinic Vall Hebron. Psychiatry Services. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

<sup>7</sup>Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

### Corresponding author:

Marta Ribasés. Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08003, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: (+34) 93 2746734. Fax: (+34) 93 4894587; Email: [mrribases@ir.vhebron.net](mailto:mrribases@ir.vhebron.net)

Received 29 July 2010

Accepted 16 December 2010

**The World Journal of Biological Psychiatry** (*in press*)

**Keywords:** cocaine dependence, NSF, SNARE complex, case-control association study, synaptic exocytosis.

### ABSTRACT

**Objectives.** Cocaine is the second most used illegal drug in Europe. The transition from use to dependence involves both genetic and environmental factors. Genetic variation in neurotransmitter systems is involved in the susceptibility to cocaine dependence. We examined the possible contribution to cocaine dependence of 15 genes involved in the cellular machinery that controls neurotransmitter release: genes encoding proteins of the SNARE complex (*STX1A*, *SNAP25*, *VAMP1* and *VAMP2*), fusion control elements (*SYT*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2*, *CPLX3* and *CPLX4*) and regulatory elements (*STXBP1*, *SYP*, *SNPH*, *NSF*, and *RAB3A*). **Methods.** We genotyped 121 SNPs, selected according to genetic coverage criteria, in 360 cocaine dependent patients and 360 controls from Spain. **Results.** Single and multiple-marker analyses revealed a strong association between cocaine dependence and the *NSF* gene, encoding the N-ethylmaleimide-Sensitive Factor ( $P=5.1e-04$ ,  $OR=2.44$  (1.45-4.00) and  $P=0.001$ ,  $OR=1.82$  (1.28-2.59), respectively). The presence and absence of psychotic symptoms were also studied. Interestingly, when we considered the time between initial consumption and the onset of cocaine dependence,

we observed that the association was mainly restricted to the group of patients that rapidly developed drug dependence ( $\leq 2$  years;  $P = 2.98e-06$ ,  $OR = 1.33$  (1.20-1.47)). *Conclusions.* Our data show preliminary evidence that NSF may predispose not only to cocaine dependence, but also to an early onset of the dependence.

## INTRODUCTION

Cocaine is the second most used illegal drug in Europe, with around 13 million consumers (3.9% of adult Europeans) (EMCDDA Annual Report 2009; European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction). Cocaine is a powerful addictive drug with almost 16% of cocaine users developing cocaine dependence within 10 years after the first cocaine use (Wagner and Anthony 2002), and 5-6% within the first two years (O'Brien and Anthony 2005). The transition from use to dependence is not a fixed pharmacological property of cocaine, since both environmental and genetic factors influence cocaine dependence. Heritability studies have estimated that 60-70% of an individual's risk for developing cocaine dependence is due to genetic factors (Kendler et al. 2000; Kendler and Prescott 1998; Tsuang et al. 1998), although the underlying genetic susceptibility factors are poorly understood.

Cocaine binds to the dopamine, serotonin and norepinephrine transporters (DAT1, SERT and NET, respectively), inhibiting the reuptake of these neurotransmitters and increasing their levels at the neuronal synapses (Kalivas 2007; Kuhar et al. 1991). Interestingly, the dopamine (DA) neurotransmission and the indirect activation of DA receptors have been established as central mediators of cocaine response (Woolverton and Johnson 1992; Volkow et al. 1999; Volkow et al. 2002; Volkow et al. 1996). Other neurotransmitters such as serotonin or glutamate also play an important role in cocaine effects (Filip 2005; Filip et al. 2004; Filip et al. 2001; Spealman 1993; Walsh and Cunningham 1997). Thus, cocaine indirectly influences glutamate transmission in the limbic system producing persistent changes in neuronal function that alter the behavioral effects of cocaine (Gass and Olive 2008; Kalivas and O'Brien 2008; Thomas et al. 2008; Uys and LaLumiere 2008).

In addition, animal models and also pharmacological and association studies support an essential role of these neurotransmitter systems in cocaine dependence. The rewarding effects of cocaine were abolished in homozygous *DAT1(-/-)SERT(-/-)* and heterozygous *DAT1(-/-)SERT(+/-)* double knock-out mice (Hall et al. 2002; Hall et al. 2004; Sora et al. 2001; Uhl et al. 2002). Interestingly, *NET(-/-)*, *SERT(-/-)* and *NET(-/-)/SERT(-/-)* knock-outs showed an even increased rewarding cocaine effect (Hall et al. 2002; Sora et al. 1998; Xu et al. 2000). Other knock-out studies also revealed an important role of the endocannabinoid system in cocaine self-administration and in the consolidation of the psychostimulant addictive process (Soria et al. 2005).

Pharmacological studies also provide insights into the role of neurotransmitter systems in



cocaine dependence. Dopamine receptor D<sub>3</sub> antagonists block cocaine acquisition and place preference and reduce cocaine induced reinstatement of self-administration (Di Ciano et al. 2003; Vorel et al. 2002). Glutamate agonists reduce the euphoric effects of cocaine and withdrawal symptoms (Dackis and O'Brien 2003; Dackis et al. 2003; Hart et al. 2008; Malcolm et al. 2006). Cannabinoid receptor agonists attenuate relapse induced by environmental cocaine-associated cues or cocaine re-exposure and antagonists induce relapse to cocaine seeking after a prolonged withdrawal period (De Vries and Schoffelmeer 2005; De Vries et al. 2001). In addition some promising medications that may prevent cocaine relapse (such as gamma-vinyl GABA "GVG", tiagabine and topiramate) are related to GABA neurotransmission (Cornish and Kalivas 2000; Dewey et al. 1997; Gonzalez et al. 2003; Morgan and Dewey 1998).

Finally, positive associations have been described between cocaine dependence and polymorphisms in genes of the dopaminergic, (Ballon et al. 2007; Comings et al. 1999; Fernández-Castillo et al. 2010; Guindalini et al. 2006; Noble et al. 1993), serotonergic (Mannelli et al. 2005; Patkar et al. 2001), noradrenergic (Cubells et al. 2000; Guindalini et al. 2008), endocannabinoid (Ballon et al. 2006; Zuo et al. 2009) and cholinergic neurotransmitter systems (Grucza et al. 2008).

All these neurotransmitter systems are candidates for being involved in cocaine dependence and depend on mechanisms that control neurotransmitter release at the synapse, including synaptic vesicle docking, fusion and recycling. The process is complex and involves different proteins such as the N-ethylmaleimide Sensitive Factor (NSF), the soluble NSF attachment proteins (SNAPs), the SNAP receptors (SNAREs), synaptobrevins (VAMP1, VAMP2), syntaxin-1 and SNAP-25, the SM protein Munc18-1 (STXBP) and small GTPases from the RAB3 family (Rizo and Rosenmund 2008). Interestingly, cocaine induces expression changes of some genes encoding proteins involved in this neurotransmitter release machinery, such as synaptotagmin, synaptobrevin (VAMP1), syntaxin-1, synaptophysin and RAB3A (Ahmed et al. 2005; Freeman et al. 2002; Yuferov et al. 2003).

Based on previous data that link different neurotransmission systems with cocaine dependence, we hypothesized that alterations in the neurotransmitter release machinery may be involved in the genetic susceptibility to this disorder, as well as cocaine induced psychotic symptoms and time between initial consumption and the onset of cocaine dependence. We performed a case-control association study in 360 cocaine dependent patients and 360 sex-matched controls, with SNPs covering 16 candidate genes that encode proteins of the neurotransmitter release machinery: SNARE complex formed by syntaxin 1A, SNAP-25 and synaptobrevins (*STX1A*, *SNAP25*, *VAMP1* and *VAMP2*), the fusion control elements synaptotagmins and complexins (*SYT*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2*, *CPLX3* and *CPLX4*) and the regulatory elements Munc18.1 (*STXBP1*), synaptophysin (*SYP*), syntaphilin (*SNPH*), NSF,  $\alpha$ SNARE (*NAPA*) and *RAB3A*.

## METHODS AND MATERIALS

### *Subjects*

The patient sample consisted of 360 cocaine dependent patients (mean age  $34.6 \pm 7.6$  years and 83 % males ( $n = 299$ )) 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, Fourth Edition Text Revision). The Structured Clinical Interview (SCID) (First et al., 1997) was administered and volunteers with current DSM-IV diagnosis of cocaine dependence were included in the study. Other drug dependences were assessed in 334 patients (92.8%): alcohol dependence was present in 22.7% of the patients ( $n = 76$ ), cannabis dependence in 26% ( $n = 87$ ), opiate dependence in 13.8% ( $n = 46$ ), benzodiazepine dependence in 5.1% ( $n = 17$ ), and amphetamine or mentamphetamine dependence in 2.1% ( $n = 7$ ). Seventy-six per cent of the patients were evaluated for the presence ( $n = 149$ ) or absence ( $n = 124$ ) of psychotic symptoms, and 71.4% ( $n = 257$ ) reported age at the initial consumption as well as age at dependence onset. Three hundred and sixty sex-matched unrelated controls (mean age  $54.9 \pm 16.6$  years) were recruited at the Blood and Tissues Bank of the Hospital Universitari Vall d'Hebron. None of them had injected drugs intravenously. Both patients and controls were Spanish and Caucasian. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitari Vall d'Hebron, and written informed consent was obtained from all the participating individuals.

### *DNA isolation and quantification*

Genomic DNA samples were obtained either from peripheral blood lymphocytes by the salting-out procedure (Miller et al. 1988) or from saliva using the Oragene DNA Self-Collection Kit (DNA Genotek, Kanata, Ontario, Canada). The double-stranded concentrations of all samples were determined on a Gemini XPS fluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using the PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), following the manufacturer's instructions.

### *Gene and SNP selection*

Sixteen candidate genes involved in the synaptic vesicle fusion and neurotransmitter release at the synapse were selected for this study: *STX1A*, *SNAP25*, *VAMP1*, *VAMP2* (SNARE complex), *SYT1*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2*, *CPLX3* and *CPLX4* (synaptotagmins and complexins) and *STXB1*, *SYP*, *SNPH*, *NSF*, *NAPA* and *RAB3A* (regulatory elements). SNP selection was based on genetic coverage parameters in terms of linkage disequilibrium (LD). Genotyping data of CEU population for each candidate gene plus 5-kb flanking sequences upstream and downstream were downloaded from the HapMap database (HapMap data release 22/phase II Apr07, dbSNPb126) (Thorisson et al. 2005). To minimize redundancy, LD was evaluated using the Haploview software (Barrett et al., 2005) setting a maximum  $r^2$  threshold at 0.85 for all SNPs with minor allele frequency (MAF) of 0.15 or 0.25 for those genes with more than 20 tagSNPs (*SNAP25*, *SYT2*, *CPLX2*, *SNPH*). A total of 141 tagSNP (72 in multi-loci bins and 69 singletons) were selected with these criteria.

Three additional SNPs were included: rs2293485 in exon 3 of *STX1A*, rs1968583 in exon 2 of *SYT2* (both exonic and synonymous) and rs2293945 in intron 6 of *SYP* (previously studied in ADHD (Brookes et al. 2005)).

#### *Plex design, genotyping and quality control*

From the initial selection of 145 SNPs, a VeraCode assay of 141 SNPs was designed (four SNPs did not pass the pipeline). SNPs were genotyped using the Illumina BeadXpress platform and the GoldenGate Genotyping Assay (Illumina, San Diego, CA, USA). This technology is based on allele-specific primer extension and highly multiplexed PCR with universal primers. Raw hybridization intensity data processing, clustering and genotype calling were performed using the genotyping module in the Illumina GenomeStudio package. The genotype cluster plots generated by GenomeStudio were visually inspected for quality of calls and edited when necessary. A total of 21 HapMap individuals including 7 trios were genotyped and used to help in the clustering and as a control of the genotyping process.

#### *Statistical analysis*

The minimal statistical power was estimated *post hoc* using the Genetic Power Calculator software (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html>), assuming an odds ratio (OR) of 1.5, prevalence of 0.0062 (16% developing dependence of 3.9% consumers), significance level of 0.05 and the lowest MAF value of 0.126. The analysis of Hardy-Weinberg equilibrium (threshold set at  $P < 0.01$ ) and the comparison of genotype frequencies between cases and controls was performed using the SNPAssoc R package (Gonzalez et al. 2007). Only when a SNP displayed nominal association under a codominant model, the dominant (11 vs 12+22) and recessive (11+12 vs 22) were considered. Genotype frequencies of SNPs within the genes located on chromosome X (*SYP*) were only considered in the female sample. For the multiple testing correction we used the Q-value R package (Storey 2002), considering all the tests performed and assuming a false discovery rate (FDR) of 10%, which corresponded to a significance threshold of  $P \leq 0.00051$ . Additionally, we also corrected the significant P-values that overcame the 10% FDR threshold by performing a permutation test using 10,000 permutations with the PLINK software (Purcell 2007). Significant P-values after multiple testing corrections were adjusted for age. The haplotype-based association study was restricted to the single gene that was found associated with cocaine dependence in the single-marker analysis after correction for multiple comparisons. The best two-marker haplotype from all possible combinations was identified in the whole sample and additional markers (up to four) were added to the initial two-SNP haplotype in a stepwise manner. Significance was estimated by a permutation procedure using 10,000 permutations with the UNPHASED software (Dudbridge 2003). Haplotypes with frequencies  $< 0.05$  were excluded. Specific estimated haplotypes were assigned to individuals with the PHASE 2.0 software (Stephens et al. 2001). The comparison of the risk haplotype carriers in cases and controls as well as the effect of this risk haplotype in the presence of cocaine-induced psychotic symptoms, age at initial consumption and the time between initial and regular consumption were evaluated using the statistical package SPSS 15.0 (SPSS Inc.,

**Table 1.** Single-marker analysis: nominal associations identified in 360 cocaine dependent patients and 360 controls.

Gene	SNP	Genotypes								P
		Cases N (%)				Controls N (%)				
		11	12	22	Sum	11	12	22	Sum	
<i>NSF</i>	rs183211 <sup>*</sup>	178 (49.4)	159 (44.2)	23 (6.4)	360	164 (45.6)	145 (40.3)	51 (14.2)	360	2.4e-03
<i>SYT1</i>	rs10861941	145 (42.9)	160 (47.3)	33 (9.8)	338	105 (32.9)	171 (53.6)	43 (13.5)	319	0.023
<i>SYT2</i>	rs10800855	162 (45.0)	141 (39.2)	57 (15.8)	360	124 (34.6)	175 (48.9)	59 (16.5)	358	0.012
	rs4400672	167 (46.4)	147 (40.8)	46 (12.8)	360	161 (45.0)	169 (47.2)	28 (7.8)	358	0.048
<i>CPLX1</i>	rs11722977	133 (38.0)	181 (51.7)	36 (10.3)	350	163 (48.8)	133 (39.8)	38 (11.4)	334	6.4e-03
<i>CPLX2</i>	rs4868539	133 (36.9)	182 (50.6)	45 (12.5)	360	140 (38.9)	153 (42.5)	67 (18.6)	360	0.029
<i>CPLX4</i>	rs1914321	279 (77.9)	78 (21.8)	1 (0.3)	358	271 (77.0)	72 (20.5)	9 (2.6)	352	0.022
	rs640401	245 (68.1)	107 (29.7)	8 (2.2)	360	233 (64.7)	106 (29.4)	21 (5.8)	360	0.042

NS, not significant.

\* When odds ratio < 1, the inverted score is shown

<sup>\*</sup> Statistically significant P-value after applying a False Discovery Rate of 10% (P<0.00051), P-value adjusted for age = 7 e-04, P-value corrected by a permutation test= 0.00224)

Chicago, USA). For the age at the first consumption and the lapse between initial consumption and the onset of cocaine dependence, normality was rejected using a Kolmogorov-Smirnov test and the comparison of medians was performed using the non-parametric Mann-Whitney U test. Additionally, time between initial consumption and onset of cocaine dependence was dichotomized into early ( $\leq 2$  years) or late ( $> 2$  years) dependence onset and the comparison of the risk haplotype carriers between the two groups was performed with two-tailed Fisher's exact test. In the multiple-marker analysis P-values were also adjusted for age and, considering cocaine dependence as well as related phenotypes, the significance threshold was set at  $2P < 0.01$  after the multiple testing correction of Bonferroni considering five comparisons (cocaine dependence, presence or absence of psychotic symptoms, and early or late dependence versus controls).

## RESULTS

We examined tagSNPs in 16 candidate genes encoding proteins of the neurotransmitter release machinery

**Table 2.** (a) Haplotype analysis of four *NSF* SNPs in a clinical sample of 360 cocaine dependent patients and 360 controls using the UNPHASED software; (b) Haplotype distributions of the rsrs183211 and rs17698176 *NSF* SNPs.

(a)

<i>NSF</i>			
Marker * haplotype	Global P-value	Best haplotype- specific P-value (Adjusted P-value)	Haplotype- specific OR
	0.031	0.013 (0.039)	1.3 (1.06-1.60)

(b)

Marker * haplotype	Cases	Controls	Haplotype specific P-value; OR (CI)
A T	205 (28.5)	247 (34.3)	0.017; 1.3 (1.05-1.64)**
G G	111 (15.4)	116 (16.1)	NS
G T	404 (56.1)	357 (49.6)	( )

NS, not significant. \* 1-rs183211; 4-rs17698176 \*\*inverted Odds Ratio score is shown.

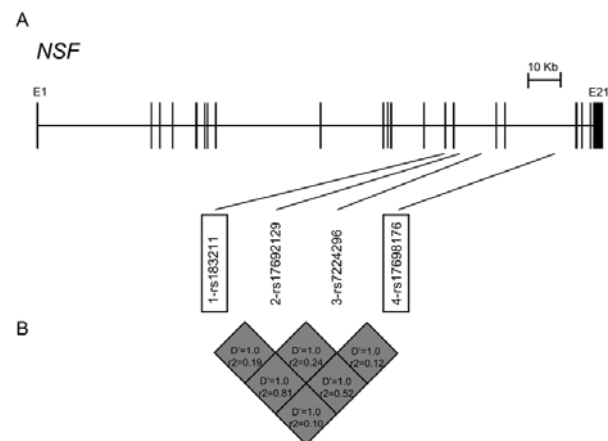
**Table 1.** (Continuac)

Genotype 11 vs 12+22		Genotype 22 vs 11+12	
OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P
-	NS	2.44 (1.45-4)	5.1 e-04 <sup>§</sup>
1.54 (1.11-2.08)	8.3e-03	-	NS
1.54 (1.14-2.08)	4.5e-03	-	NS
-	NS	1.73 (1.05-2.83)*	0.028
1.56 (1.15-2.11)*	4.3e-03	-	NS
-	NS	1.61 (1.06-2.44)	0.023
-	NS	9.09 (1.17-100)*	5.9e-03
-	NS	2.7 (1.19-6.25)	0.012

in 360 cocaine dependent patients and 360 controls. Of the 145 SNPs initially selected, 23 were discarded (four did not pass the Veracode pipeline design, 19 had genotype calls <90% and one had a significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium in the control group). A total of 121 SNPs within 15 genes (the two SNPs of the *NAPA* gene failed) with an average call rate of 99.2% (SD=1.8) were considered for the analysis (Table S1). The minimal statistical power, considering the SNP with the lowest MAF (0.126), was 57.9% assuming a codominant model, 68.3% considering a dominant model and 8.4% under a recessive model of inheritance.

The comparison of genotype frequencies between cocaine dependent patients and controls allowed identification of nominal differences for eight SNPs located in six genes: *NSF*, *SYT1*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2* and *CPLX4* (Table 1, Table S2). However, after correcting for multiple comparisons applying a FDR of 10% ( $P \leq 0.00051$ ), only rs183211 in the *NSF* gene ( $P = 5.1e-04$ , OR = 2.44 (1.45-4.00)) remained associated with cocaine dependence, with a higher frequency of carriers of the common G allele in cases (93.6%) than in the control group (85.9%). Consistently, the G allele is present in 71.5% of cases and in 65.7% of controls. The rs183211 SNP in *NSF* remained significantly associated with cocaine dependence after adjusting for age and correcting by permutation (Table 1).

The analysis of all the possible SNP combinations within *NSF* revealed a two-marker haplotype (rs183211- rs1769817), that includes the SNP identified in the single-marker analysis, associated with cocaine dependence (global  $P = 0.031$ ; Fig. 1), which remained significant after correcting by permutation ( $P$ -adjusted = 0.039). The evaluation of the contribution of individual haplotypes to the phenotype showed an over-representation of the G-T allelic combination ( $P = 0.013$ ,



**Figure 1.** A. Diagram of the *NSF* gene (NM\_006178). Black boxes indicate exons. The four tagSNPs included in the study are shown on top, with the two SNPs that conform the risk haplotype associated with cocaine dependence boxed. B. Linkage disequilibrium plot of the 4 SNPs analyzed in the *NSF* gene, according to Haploview. Considering the Confidence Interval algorithm (Gabriel et al. 2002), the four SNPs are located in the same LD block in our control sample.

**Table 3.** Distribution of carriers of the G-T (rs183211- rs1769817) allelic combination within the NSF gene.

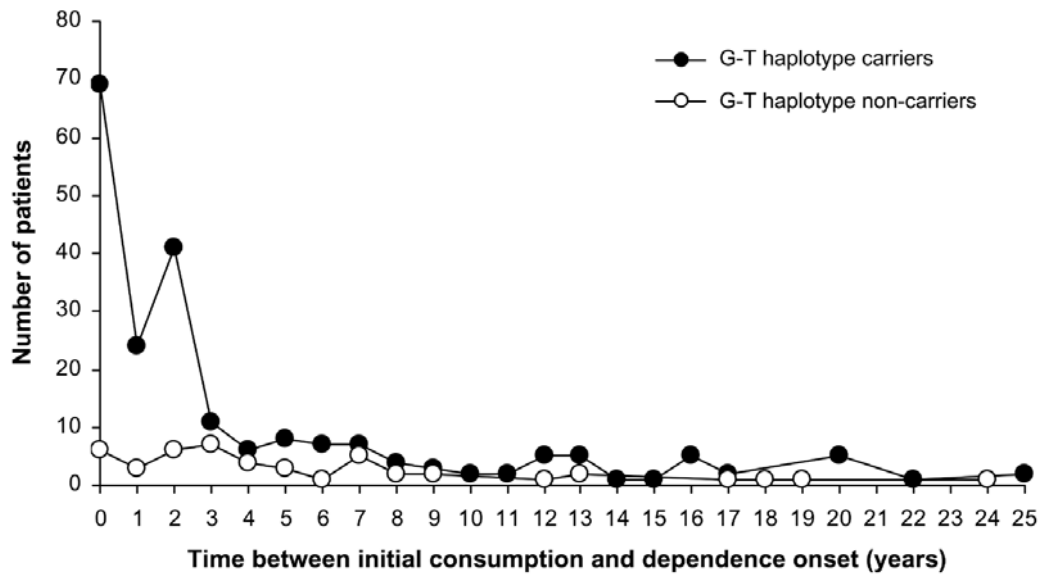
	Haplotypes, N (%)		Adjusted for age			
	G-T carriers	Other haplotypes	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P
Cocaine dependence	295 (81.9)	65 (18.1)	1.82 (1.28-2.59)		2.16 (1.38-3.83)	
Cocaine dependence with Psychotic Symptoms	126 (84.6)	23 (15.4)	2.20 (1.33-3.62)		2.51 (1.40-4.50)	
Cocaine dependence without Psychotic Symptoms	102 (82.3)	22 (17.7)	1.86 (1.11-3.11)	0.017	2.30 (1.28-4.14)	
Early cocaine dependence ( $\leq 2$ years*)	134 (89.9)	15 (10.1)	3.58 (2.00-6.41)		3.90 (2.01-7.57)	
Late cocaine dependence ( $> 2$ years*)	77 (71.3)	31 (28.7)	-	NS	-	NS
Controls	257 (71.4)	103 (28.6)				

NS, not significant. \* Time between initial consumption and dependence onset.  
In bold, significant P-values after Bonferroni correction ( $P < 0.01$ ).

OR = 1.3 (1.06-1.60)) and an under-representation of the A-T haplotype ( $P = 0.017$ , OR = 1.3 (1.05-1.64)) in the cocaine dependence sample (Table 2b). Consistently, we also identified an increased frequency of individuals carrying the G-T risk haplotype in this clinical sample, result that remained significant after adjusting by age ( $P$ -adjusted = 0.001, OR = 2.16 (1.38-3.83; Table 3).

When patients were subdivided based on the presence/absence of psychotic symptoms, we did not identify differences between these two subgroups ( $P = 0.627$ ) and observed an over-representation of G-T carriers in the two clinical samples when they were compared to the control sample (patients with psychotic symptoms:  $P$ -adjusted = 0.002, OR = 2.51 (1.4-4.5); patients without psychotic symptoms:  $P$ -adjusted = 0.0055, OR = 2.3 (1.28-4.14); Table 3), and remained significant after the Bonferroni correction (Table 3).

We then focused on the time between first consumption and onset of cocaine dependence and observed an earlier dependence onset among carriers of the G-T NSF risk haplotype than in non-carriers ( $Z = -3.15$ ,  $P = 0.0015$ ). Interestingly, the main differences were clearly observed in the group of patients whose dependence onset started within two years after the initial drug use (Fig. 2). When patients were subdivided in two subgroups, early ( $\leq 2$  years) and late ( $> 2$  years) dependence onset, we identified a higher frequency of carriers of the G-T haplotype in the group of patients showing an early regular cocaine consumption ( $P = 2.2 \times 10^{-4}$ , OR = 1.85 (1.4-2.4)). These differences were also observed when this group of patients, but not those showing late regular drug consumption, was compared with controls ( $P$ -adjusted =  $5.77 \times 10^{-5}$ , OR = 3.90 (2.01-7.57); Table 3), and was still significant after the Bonferroni correction. No significant differences were observed when we compared the average age at the first cocaine consumption between carriers and non-carriers of the G-T haplotype ( $P$ -adjusted = 0.372).



**Figure 2.** Time between initial consumption and cocaine dependence onset (years) in carriers and non-carriers of the *NSF* G-T (rs183211-rs1769817) risk haplotype in cocaine dependent patients.

Interestingly, the individual analysis of rs183221, the only SNP displaying positive signals in the single-marker analysis, also showed association with cocaine dependence when those cases with early dependence were considered ( $P$ -adjusted =  $6.9 \times 10^{-4}$ , OR= 2.42 (1.45 – 4.04)).

## DISCUSSION

The present case-control association study aims at covering an entire candidate pathway or functional network rather than focusing on single candidate genes. To our knowledge, this is the first association study in cocaine dependence focused on genes coding for the main components of the neurotransmitter release machinery and have found a significant association with *NSF*, mainly in the group of patients that rapidly develop drug dependence ( $\leq 2$  years from the initial cocaine consumption). These results suggest that genetic factors may contribute to the neurobiological mechanisms underlying not only cocaine dependence but also an early development of this dependence. No relationship was observed between *NSF* and age at the first cocaine use or the presence of cocaine-induced psychotic symptoms.

The *NSF* gene encodes the N-ethylmaleimide sensitive factor, which participates in the SNARE complex recycling, ensuring that sufficient amounts of free SNAREs are available for the maintenance of intracellular membrane trafficking (Barszczewski et al. 2008). *NSF* is essential for the synaptic vesicle turnover as it modulates the kinetics of neurotransmitters release and the integrative properties of synapses (Littleton et al. 2001; Malsam et al. 2008; Schweizer et al. 1998). It also has an essential role in the modulation of the trafficking between the plasma membrane and endosomes and in the binding of several cell-surface signalling receptors, such as the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor (AMPA), the beta-2 adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR), the DA receptors (more strongly D1 and D5), the adrenomedulin

(AM) receptor and the  $\gamma$ -amino-butyric acid (GABA) receptor (Bomberger et al. 2005; Cong et al. 2001; Heydorn et al. 2004; Nishimune et al. 1998; Osten et al. 1998; Pontier et al. 2006; Song et al. 1998).

Altered NSF function may modulate the activity of the neurotransmitter systems involved in cocaine's effect and dependence. Thus, in agreement with the "reward deficiency syndrome", hypothesis that postulates that hypodopaminergic activity predisposes to cocaine addiction (Comings and Blum 2000), malfunction of NSF could have an effect on the turnover and availability of DA vesicles, altering the DA release to the synaptic cleft.

Some methodological considerations, however, should be taken into account in the present case-control association study: (i) In order to avoid sample heterogeneity that may bias the results in association studies, our sample consisted of patients and controls recruited in the same geographical area around Barcelona (Spain), all of them were Spanish, Caucasian and sex-matched; (ii) Although significant after 10% FDR corrections for multiple testing, NSF did not remain associated with cocaine addiction under the most restrictive Bonferroni correction, considering 121 SNPs; (iii) The NSF risk haplotype associated with cocaine dependence consists of two SNPs located within introns, so it is possible that they don't cause functional effects by themselves, but rather are in LD with other sequence variants directly involved in the genetic susceptibility to cocaine dependence; (iv) The modest sample size (360 patients versus 360 controls) may have prevented from detecting subtle phenotypic effects; (v) cocaine dependence could not be discarded in the control sample, which may potentially dilute positive findings in the association study and (vi), although the SNP selection was designed to cover 16 genes, gaps still exist in eight genes due to experimental constraints. Specifically, NAPA could not be tested for association as the two tagSNPs covering this gene failed in the genotyping assay.

To sum up, our study suggests that NSF contributes to the genetic susceptibility to cocaine dependence and, more specifically, to an early development of dependence. These results, however, need to be replicated in other samples. Also, further genetic and functional studies of the NSF gene are necessary to identify those functional variants directly involved in this psychiatric disorder.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to patients and controls for their participation in the study, and to M. Dolors Castellar and others from the "Banc de Sang i Teixits" (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona) and to Rebeca Ortega, Nuria Voltes, Carolina López, Oriol Esteve and Esther García, for their collaboration in the recruitment of samples. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III-FIS (PI051982), the "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR" (2009GR00971) and the Department of Health of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya). MR and NF-C are recipients of a "Miguel de Servet contract" from the Instituto de Salud Carlos III and a "Ajut Personal Investigador en Formació" from the Universitat de Barcelona, respectively. RC was supported by a fellowship of the Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER). SNP genotyping services were provided by the Barcelona node of the Spanish National Genotyping Center (CEGEN; [www.cegen.org](http://www.cegen.org)).



## REFERENCES

- Ahmed SH, Lutjens R, van der Stap LD, Lekic D, Romano-Spica V, Morales M et al. 2005. Gene expression evidence for remodeling of lateral hypothalamic circuitry in cocaine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32):11533-8.
- Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Charles-Nicolas A, Krebs MO et al. 2006. (AAT)<sub>n</sub> repeat in the cannabinoid receptor gene (CNR1): association with cocaine addiction in an African-Caribbean population. *Pharmacogenomics J* 6(2):126-30.
- Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Olie JP, Charles-Nicolas A et al. 2007. 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* 144B(8):1034-41.
- Barszczewski M, Chua JJ, Stein A, Winter U, Heintzmann R, Zilly FE et al. 2008. A novel site of action for alpha-SNAP in the SNARE conformational cycle controlling membrane fusion. *Mol Biol Cell* 19(3):776-84.
- Bomberger JM, Parameswaran N, Hall CS, Aiyar N, Spielman WS. 2005. Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J Biol Chem* 280(10):9297-307.
- Brookes KJ, Knight J, Xu X, Asherson P. 2005. DNA pooling analysis of ADHD and genes regulating vesicle release of neurotransmitters. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139B(1):33-7.
- Comings DE, Blum K. 2000. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res* 126:325-41.
- Comings DE, Gonzalez N, Wu S, Saucier G, Johnson P, Verde R et al. 1999. Homozygosity at the dopamine DRD3 receptor gene in cocaine dependence. *Mol Psychiatry* 4(5):484-7.
- Cong M, Perry SJ, Hu LA, Hanson PI, Claing A, Lefkowitz RJ. 2001. Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J Biol Chem* 276(48):45145-52.
- Cornish JL, Kalivas PW. 2000. Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci* 20(15):RC89.
- Cubells JF, Kranzler HR, McCance-Katz E, Anderson GM, Malison RT, Price LH et al. 2000. A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol Psychiatry* 5(1):56-63.
- Dackis C, O'Brien C. 2003. Glutamatergic agents for cocaine dependence. *Ann N Y Acad Sci* 1003:328-45.
- Dackis CA, Lynch KG, Yu E, Samaha FF, Kampman KM, Cornish JW et al. 2003. Modafinil and cocaine: a double-blind, placebo-controlled drug interaction study. *Drug Alcohol Depend* 70(1):29-37.
- De Vries TJ, Schoffelmeer AN. 2005. Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *Trends Pharmacol Sci* 26(8):420-6.
- De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J et al. 2001. A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med* 7(10):1151-4.
- Dewey SL, Chaurasia CS, Chen CE, Volkow ND, Clarkson FA, Porter SP et al. 1997. GABAergic attenuation of cocaine-induced dopamine release and locomotor activity. *Synapse* 25(4):393-8.
- Di Ciano P, Underwood RJ, Hagan JJ, Everitt BJ. 2003. Attenuation of cue-controlled cocaine-seeking by a selective D3 dopamine receptor antagonist SB-277011-A. *Neuropsychopharmacology* 28(2):329-38.
- Dudbridge F. 2003. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25(2):115-21.

- Fernández-Castillo N, Ribasés M, Roncero C, Casas M, Gonzalvo B, Cormand B. 2010. Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet* 20:317-320.
- Filip M. 2005. Role of serotonin (5-HT)<sub>2</sub> receptors in cocaine self-administration and seeking behavior in rats. *Pharmacol Rep* 57(1):35-46.
- Filip M, Bubar MJ, Cunningham KA. 2004. Contribution of serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes to the hyperlocomotor effects of cocaine: acute and chronic pharmacological analyses. *J Pharmacol Exp Ther* 310(3):1246-54.
- Filip M, Nowak E, Papla I. 2001. On the role of serotonin<sub>2A/2C</sub> receptors in the sensitization to cocaine. *J Physiol Pharmacol* 52(3):471-81.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (1997). *Structured Clinical Interview for DSM-IV disorders (SCID-IV)*. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Freeman WM, Brebner K, Patel KM, Lynch WJ, Roberts DC, Vrana KE. 2002. Repeated cocaine self-administration causes multiple changes in rat frontal cortex gene expression. *Neurochem Res* 27(10):1181-92.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B et al. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296(5576):2225-9.
- Gass JT, Olive MF. 2008. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75(1):218-65.
- Gonzalez G, Sevarino K, Sofuoglu M, Poling J, Oliveto A, Gonsai K et al. 2003. Tiagabine increases cocaine-free urines in cocaine-dependent methadone-treated patients: results of a randomized pilot study. *Addiction* 98(11):1625-32.
- Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X et al. 2007. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23(5):644-5.
- Grucza RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL et al. 2008. A risk allele for nicotine dependence in CHRNA5 is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 64(11):922-9.
- Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N et al. 2006. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12):4552-7.
- Guindalini C, Laranjeira R, Collier D, Messas G, Vallada H, Breen G. 2008. Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct* 4:1.
- Hall FS, Li XF, Sora I, Xu F, Caron M, Lesch KP et al. 2002. Cocaine mechanisms: enhanced cocaine, fluoxetine and nisoxetine place preferences following monoamine transporter deletions. *Neuroscience* 115(1):153-61.
- Hall FS, Sora I, Drgonova J, Li XF, Goeb M, Uhl GR. 2004. Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 1025:47-56.
- Hart CL, Haney M, Vosburg SK, Rubin E, Foltin RW. 2008. Smoked cocaine self-administration is decreased by modafinil. *Neuropsychopharmacology* 33(4):761-8.
- Heydorn A, Sondergaard BP, Hadrup N, Holst B, Haft CR, Schwartz TW. 2004. Distinct in vitro interaction pattern of dopamine receptor subtypes with adaptor proteins involved in post-endocytotic receptor targeting. *FEBS Lett* 556(1-3):276-80.
- Kalivas PW. 2007. Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *Am J Addict* 16(2):71-8.

- Kalivas PW, O'Brien C. 2008. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33(1):166-80.
- Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC, Prescott CA. 2000. Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry* 57(3):261-9.
- Kendler KS, Prescott CA. 1998. Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 173:345-50.
- Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW. 1991. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14(7):299-302.
- Littleton JT, Barnard RJ, Titus SA, Slind J, Chapman ER, Ganetzky B. 2001. SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(21):12233-8.
- Malcolm R, Swayngim K, Donovan JL, DeVane CL, Elkashef A, Chiang N et al. 2006. Modafinil and cocaine interactions. *Am J Drug Alcohol Abuse* 32(4):577-87.
- Malsam J, Kreye S, Sollner TH. 2008. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65(18):2814-32.
- Mannelli P, Patkar AA, Murray HW, Certa K, Peindl K, Mattila-Evenden M et al. 2005. Polymorphism in the serotonin transporter gene and response to treatment in African American cocaine and alcohol-abusing individuals. *Addict Biol* 10(3):261-8.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):1215.
- Morgan AE, Dewey SL. 1998. Effects of pharmacologic increases in brain GABA levels on cocaine-induced changes in extracellular dopamine. *Synapse* 28(1):60-5.
- Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M et al. 1998. NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21(1):87-97.
- Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, Wood RC et al. 1993. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 33(3):271-85.
- O'Brien MS, Anthony JC. 2005. Risk of becoming cocaine dependent: epidemiological estimates for the United States, 2000-2001. *Neuropsychopharmacology* 30(5):1006-18.
- Osten P, Srivastava S, Inman GJ, Vilim FS, Khatri L, Lee LM et al. 1998. The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron* 21(1):99-110.
- Patkar AA, Berrettini WH, Hoehe M, Hill KP, Sterling RC, Gottheil E et al. 2001. Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Addict Biol* 6(4):337-345.
- Pontier SM, Lahaie N, Gingham R, St-Gelais F, Bonin H, Bell DJ et al. 2006. Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *Embo J* 25(12):2698-709.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M, Bender D et al. 2007. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet* 81(3): 559-75.
- Rizo J, Rosenmund C. 2008. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15(7):665-74.
- Schweizer FE, Dresbach T, DeBello WM, O'Connor V, Augustine GJ, Betz H. 1998. Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science* 279(5354):1203-6.
- Song I, Kamboj S, Xia J, Dong H, Liao D, Haganir RL. 1998. Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* 21(2):393-400.

- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB et al. 2001. Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9):5300-5.
- Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R 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):7699-704.
- Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M et al. 2005. Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30(9):1670-80.
- Spealman RD. 1993. Modification of behavioral effects of cocaine by selective serotonin and dopamine uptake inhibitors in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 112(1):93-9.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68(4):978-89.
- Storey J. 2002. A direct approach to false discovery Rates. *J R Stat Soc Ser B* 64:479-498.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. 2008. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 154(2):327-42.
- Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. 2005. The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15(11):1592-3.
- Tsuang MT, Lyons MJ, Meyer JM, Doyle T, Eisen SA, Goldberg J et al. 1998. Co-occurrence of abuse of different drugs in men: the role of drug-specific and shared vulnerabilities. *Arch Gen Psychiatry* 55(11):967-72.
- Uhl GR, Hall FS, Sora I. 2002. Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry* 7(1):21-6.
- Uys JD, LaLumiere RT. 2008. Glutamate: the new frontier in pharmacotherapy for cocaine addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7(5):482-91.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. 1999. Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J Psychopharmacol* 13(4):337-45.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Goldstein RZ. 2002. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem* 78(3):610-24.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Ding YS, Logan J et al. 1996. Relationship between psychostimulant-induced "high" and dopamine transporter occupancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(19):10388-92.
- Vorel SR, Ashby CR, Jr., Paul M, Liu X, Hayes R, Hagan JJ et al. 2002. Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. *J Neurosci* 22(21):9595-603.
- 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(4):479-88.
- Walsh SL, Cunningham KA. 1997. Serotonergic mechanisms involved in the discriminative stimulus, reinforcing and subjective effects of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 130(1):41-58.
- Woolverton WL, Johnson KM. 1992. Neurobiology of cocaine abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):193-200.
- Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW et al. 2000. Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* 3(5):465-71.
- Yuferov V, Krosiak T, Laforge KS, Zhou Y, Ho A, Kreek MJ. 2003. Differential gene expression in the rat caudate putamen after "binge" cocaine administration: advantage of triplicate microarray analysis. *Synapse* 48(4):157-69.

Zuo L, Kranzler HR, Luo X, Yang BZ, Weiss R, Brady K 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):1504-13.

**Table S1.** Description of the VeraCode genotyping assay within 16 candidate genes encoding proteins involved in vesicle fusion for neurotransmitters release (data from HapMap Phase II\_April07\_dbSNP126\_NCBIB36).

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	MAF	Gene Cover age #	Other SNPs within the bin
<b>SNAP25</b>	NM_003081	20p12.2	88.59	8	40	19	rs1889189	5'	-	0.318	1	-
							rs6039769	5'	-	0.318	-	-
							rs363039	Intron 1	-	0.337	-	-
							rs363043	Intron 1	-	0.327	rs6077699, rs6514092	-
							rs12626080	Intron 1	-	0.391	rs363016, rs6039792, rs6104571	-
							rs6074113	Intron 1	-	0.426	rs363021	-
							rs362547	Intron 1	-	0.464	rs362569, rs362548, rs363018, rs362562, rs6039795, rs362569, rs362564, rs363022	-
							rs362570	Intron 1	-	0.129	-	-
							rs6039806	Intron 3	-	0.482	rs6039807, rs6108461, rs362549, rs362987	-
							rs3025873	Intron 4	-	0.203	-	-
							rs362988	Intron 7	-	0.432	rs6039820	-
							rs6108464	Intron 7	-	0.371	-	-
							rs3787283	Intron 7	-	0.365	-	-
							rs4813925	Intron 7	-	0.366	rs8636	-
							rs6074121	3'	-	0.329	-	-
							rs6032845	3'	-	0.307	rs4813927	-
rs3025879	3'	-	0.339	rs362599, rs362600	-							
rs6032846	3'	-	0.390	-	-							
<b>STX1A</b>	NM_004603	7q11.23	20.45	10	8	4	rs6951030	Intron 1	Failed	-	0.75	-
							rs941298	Intron 1	-	0.294	rs4717806, rs867500, rs941299	-
							rs2293485*	Exon 3	-	0.443	-	-
							rs3793243	Intron 3	-	0.410	-	-
rs4363087	Intron 6	-	0.331	rs1001220	-							
<b>VAMP2</b>	NM_014232	17p13.1	3.83	5	4	1	rs8067606	5'	-	0.364	1	rs2278637, rs1150, rs9899533
							rs2534724	5'	Failed	0.71	rs2534722, rs10849466, rs2532485, rs7390, rs1045452, rs2534712, rs1045548	
<b>VAMP1</b>	NM_014231	12q13.31	8.4	5	33	8	rs10492096	5'	-	0.148	-	rs10849462, rs12422771, rs11064210, rs1045546, rs12426815
							rs11064213	5'	Failed	-	rs2072377, rs7298570	

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	MAF	Gene Coverage #	Other SNPs within the bin
							rs2072376	Exon 5'UTR		0.370		
							rs2240867	Intron 1		0.209		
							rs2534717	Intron 4		0.346		rs2534715, rs1034969, rs1017101, rs2240866, rs2058288, rs2072375, rs2534713, rs2243750, rs2243977, rs2244083, rs2534721, rs2534711
							rs12964	Exon 5		0.448		
<b>SYT1</b>	NM_005639	12q21.2	233.6	8	132	14	rs2177963	Intron 1		0.317	0.85	rs2177963, rs10861698, rs1918193, rs2037743, rs1918195, rs7968716, rs1918188, rs1918190, rs7311549, rs8181776, rs7967265, rs1918191, rs4842447, rs10861717, rs1405498, rs1465054, rs1356248, rs6539317, rs1245803, rs1245804, rs1245806, rs1245810, rs1245814, rs1245819, rs1245820, rs1268463, rs1245824, rs1312846, rs1245825, rs1245828, rs1245835, rs1245837, rs1245840, rs1245841, rs1245842, rs10778564, rs10778565, rs10861753, rs10861755, rs10861757, rs2141701, rs1921026, rs10861758, rs10861799, rs6539315, rs1245807, rs1245831, rs1245832, rs10861769, rs2293650, rs1113673, rs1465053, rs1245805, rs12578286, rs7296233, rs10746105, rs11609774, rs10746106, rs10746114, rs7967411
							rs6539344	Intron 1	No Veracode			rs1245829, rs7963801
							rs11113425	Intron 1		0.242		
							rs2400393	Intron 1		0.353		rs11113410, rs10861762, rs11113435, rs10778573, rs10778575, rs7300645, rs2272500, rs10861795, rs10861796, rs10861797, rs6539373, rs4612885, rs1526952, rs10746103
							rs1732664	Intron 6		0.288		
							rs10861941	Intron 6		0.403		
							rs1245775	Intron 6	Failed			
							rs6539445	Intron 6		0.126		rs11113980
							rs11114027	Intron 6		0.194		
							rs7308297	Intron 6		0.406		rs1245765, rs1245778, rs1465051, rs2400395, rs9788036, rs7966962, rs1245769, rs1245766, rs10861976, rs10778657, rs10861975, rs1465044, rs1245767
							rs1465046	Intron 6		0.172		rs17005544, rs12581451, rs10506815, rs1405493, rs11608808, rs7303658, rs1465048, rs1465049, rs1405495, rs1526955, rs17005561, rs1358243, rs1405497, rs7315638, rs7295888, rs17005588, rs11612225, rs2701566, rs1465046
							rs17294719	Intron 6		0.182		rs7954927, rs1526963, rs17005594, rs11833031, rs11114107, rs7135647, rs11114122, rs7315113, rs11114116
							rs2251214	Intron 6		0.256		

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	MAF	Gene Cover age #	Other SNPs within the bin
SYT2	NM_177402	1q32.1	114.7	9	85	23	rs10800856	5'	Failed	0.77	-	-
							rs12564274	5'	Failed	0.404	-	-
							rs12409197	Intron 1	Failed	0.340	rs3923371, rs4325195	rs4364933
							rs12141884	Intron 1	Failed	0.314	rs4072140, rs10920457, rs11588808, rs4950738, rs4950788, rs4362037, rs11578029, rs12040487, rs12046408	rs4418670, rs4572021
							rs10920459	Intron 1	Failed	0.299	rs6698441, rs11585345, rs6693751, rs4453099	rs4950786, rs4950865, rs4113203, rs6661284, rs6662116, rs10920451, rs10920452, rs4950866, rs4950867, rs2095981, rs12038816, rs6696612, rs4372314, rs16850204
							rs6673562	Intron 1	Failed	0.461	rs867316, rs12047572, rs10920440, rs10920445, rs6669326, rs1417160, rs7517181, rs4950785, rs12728991, rs10800847	rs867313, rs867314, rs867315, rs946857, rs12404969, rs10920442, rs4950863, rs4537626, rs10737582
							rs7550433	Intron 1	Failed	0.421	-	-
							rs12121078	Intron 1	Failed	0.444	-	-
							rs11585565	Intron 1	Failed	0.415	-	-
							rs7534078	Intron 1	Failed	0.276	-	-
							rs1934663	Intron 1	Failed	0.257	rs11585137, rs12739678, rs12354333	-
							rs12739678	Intron 1	Failed	0.400	-	-
							rs10920427	Intron 1	Failed	0.412	-	-
							rs7552201	Intron 1	Failed	-	-	-
rs578816	Intron 1	Failed	-	-	-							
rs12566757	Intron 1	No Veracode	-	-	-							
rs1968583*	Exon 2	Failed	-	-	-							
rs907697	Intron 7	Failed	0.426	rs4520471	-							
rs9633344	Intron 8	Failed	0.365	rs6427958, rs504261, rs10494834, rs6666325, rs907698, rs1467120, rs1040010	-							
rs6427957	3'	Failed	0.455	-	-							
CPLX1	NM_006651	4p16.3	41.2	4	27	16	rs11248047	5'	Failed	0.484	0.81	rs936551
							rs7375209	Intron 2	Failed	0.405	rs9328757, rs6842106, rs2276906	-



Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	MAF	Gene Coverage #	Other SNPs within the bin
							rs6832751	Intron 2		0.257		rs737207
							rs7376690	Intron 2	Failed			-
							rs11248043	Intron 2		0.186		-
							rs11248042	Intron 2		0.354		-
							rs9328758	Intron 2		0.394		-
							rs7677766	Intron 2		0.346		rs10004482
							rs10004297	Intron 2	Failed			-
							rs11722977	Intron 2		0.313		-
							rs2306251	Intron 2		0.387		rs1052595
							rs3816676	Intron 3		0.274		rs3775140, rs6840352
							rs4690313	Intron 3		0.199		-
							rs2242237	Exon 4 3'UTR		0.339		-
							rs3733358	3'		0.324		rs17165034
							rs6811804	3'	Failed			rs6816868
<b>CPLX2</b>	NM_006650	5q35.2	87.41	5	62	27	rs2243404	Exon 1 5'UTR		0.220	0.85	rs2443541, rs2434237, rs890736, rs2382120, rs7727183
							rs10866688	Intron 2	Failed			-
							rs7718856	Intron 2		0.438		-
							rs6874025	Intron 2		0.239		rs17065511, rs883188
							rs12520557	Intron 2		0.342		rs2382123, rs688724, rs10475623
							rs11134932	Intron 2		0.251		rs2382121
							rs4242187	Intron 2	Failed			-
							rs10476170	Intron 2		0.362		-
							rs17065535	Intron 2		0.285		-
							rs6556225	Intron 2		0.378		-
							rs1560035	Intron 2		0.332		rs6887620
							rs10072860	Intron 2	No Veracode			-

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	MAF	Gene Cover age #	Other SNPs within the bin
							rs12188152	Intron 2	Failed		-	-
							rs4867806	Intron 2		0.394		rs4868537, rs1560036
							rs11134935	Intron 2		0.478		-
							rs4868538	Intron 2		0.260		rs10866690, rs4867807
							rs10866691	Intron 2		0.357		rs10076867, rs999065
							rs4868539	Intron 2		0.399		-
							rs890737	Intron 2		0.476		rs7705543, rs1820646, rs1366116, rs12522368
							rs11134938	Intron 2		0.421		rs6860661, rs871853, rs1560033, rs4867808, rs3892909, rs4077871, rs3180249, rs12656972
							rs1006101	Exon 5 3'UTR		0.467		rs4867809, rs9313730, rs3822674
							rs10866692	Exon 5 3'UTR		0.433		rs1560034
							rs930047	Exon 5 3'UTR		0.499		-
							rs13166213	3'		0.492		-
							rs11134942	3'		0.354		-
							rs2114968	3'		0.465		rs2382114, rs7718100
<b>CPLX3</b>	NM_001030005	15q24.1	5.19	3	4	2	rs7162232	5'		0.332	1	rs11634474, rs9210
							rs6495122	3'		0.493		-
<b>CPLX4</b>	NM_181654	18q21.32	23.23	3	27	9	rs609209 <sup>s</sup>	Intron 1	No HWE		0.89	-
							rs10503024	Intron 2		0.338		-
							rs509886	Intron 2		0.473		rs561894, rs688992, rs654802
							rs640401	Intron 2		0.206		rs537048, rs536113, rs508858
							rs12232757	Intron 2		0.384		rs4940456
							rs12456930	Intron 2		0.387		-
							rs7228681	Intron 2		0.257		rs4940455, rs10871768, rs7243416, rs12232751, rs599535, rs583241, rs11662475, rs1980176, rs4108696
							rs499824	Exo 3 3'UTR		0.190		rs606952
							rs1914321	Exo 3		0.128		rs17696543

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	MAF	Gene Cover age #	Other SNPs within the bin
<b>NSF</b>	NM_006178	17q21.32	166.6	21	4	4	rs183211	Intron 13		0.343	1	rs199438, rs199536, rs199438, rs142167, rs199455, rs199454, rs199452, rs199449, rs199442, rs199536, rs199530, rs199529, rs199439, rs199456, rs199448, rs199445, rs199535, rs199534, rs199533, rs538628, rs199443
							rs17692129	Intron 15		0.269	-	-
							rs7224296	Intron 15		0.391	-	-
							rs17698176	Intron 17		0.161	-	-
<b>NAPA</b>	NM_003827	19q13.32	27.61	11	2	2	rs3786521	Intron 1	Failed		0	-
							rs830146	Intron 1	Failed		-	-
<b>STXBP1</b>	NM_003165	9q34.11	80.43	19	8	3	rs2039204	5'		0.435	1	rs1573178
							rs7852204	5'		0.414		rs4837172, rs10819303, rs3824523, rs4836575
							rs2241167	Intron 9		0.497	-	-
<b>SNPH</b>	NM_014723	20p13	43.01	6	22	12	rs11905792	Intron 2	No Veracode		0.64	-
							rs6109320	Intron 3		0.346	-	-
							rs2317645	Intron 4	Failed		rs3795141 rs3818331	
							rs912105	Intron 4	No HWE	0.322	-	-
							rs7354385	Intron 5		0.358		rs6033370, rs6078505, rs7466
							rs3764715	Exon 6 3'UTR		0.316		rs966846, rs912108
							rs6134520	Exon 6 3'UTR		0.318		rs11449
							rs3803947	Exon 6 3'UTR	Failed		-	-
							rs4814106	3'		0.405	-	-
							rs1048621 <sup>\$\$</sup>	3'			Monomorphic	
							rs2281711	3'		0.497		rs2273959, rs2273958, rs3795137

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	MAF	Gene coverage #	Other SNPs within the bin
<b>RAB3A</b>	NM_002866	19p13.2	7.2	5	10	5	rs874628	-		0.296	1	rs1044821
							rs2271881			0.371		-
							rs17683539			0.350		rs17683509, rs2049050
							rs2049051			0.267		-
							rs2271882			0.262		rs1667476, rs16982263
<b>SYP</b>	NM_003179	Xp11.23	12.4	7	1	1	rs5906754	5'		0.219	1	-
							rs2293945*	Intron 6		0.203		-

HWE, Hardy-Weinberg equilibrium; MAF, minimum allele frequency (in the control sample).

‡The SNP rs609209 of the CPLX4 gene was not included in the assay because was not in HWE as described by Corominas et al. (in preparation)

§§ The SNP rs1048621 of the SNPH gene was not included in the assay because was monomorphic as described by Corominas et al. (in preparation)

\* SNPs included in the assay not according to genetic coverage parameters.

\*\* MAF: Minor allele frequency in the control sample.

**Table S2.** Nominal P-values observed when genotype frequencies of 121 SNPs within 15 candidate genes were considered in 360 cocaine dependent patients and 360 controls.

GENE	SNP	P-value	GENE	SNP	P-value
SYT2	rs6427957	0.15212	SNAP25	rs1889189	0.15589
	rs9633344	0.46772		rs6039769	0.15654
	rs907697	0.90325		rs363039	0.38271
	rs7552201	0.86890		rs363043	0.87723
	rs10920427	0.75248		rs12626080	0.54758
	rs12739678	0.06504		rs6074113	0.32190
	rs1934663	0.57648		rs362547	0.16478
	rs7534078	0.96311		rs362570	0.28418
	rs11585565	0.75220		rs6039806	0.05962
	rs12121078	0.08003		rs3025873	0.75712
	rs10733069	0.16372		rs362988	0.78774
	rs7550433	0.34683		rs6108464	0.35760
	rs10800855			rs3787283	0.33002
	rs6673562	0.15972		rs4813925	0.57665
	rs4400672			rs6074121	0.45345
rs12141884	0.32292	rs6032845	0.67322		
rs12564274	0.20735	rs3025879	0.24403		
VAMP1	rs12964	0.15651	rs6032846	0.14444	
	rs2534717	0.34739	CPLX1	rs3733358	0.30114
	rs2240867	0.22587	rs2242237	0.46714	
	rs2072376	0.75251	rs4690313	0.11870	
	rs10492096	0.39987	rs3816676	0.50524	
SYT1	rs2177963	0.62265	rs2306251	0.69868	
	rs11113425	0.64354	rs11722977	0.00644	
	rs2400393	0.39748	rs7677766	0.75547	
	rs1732664	0.35062	rs9328758	0.97542	
	rs10861941		rs11248042	0.17946	
	rs6539445	0.83461	rs11248043	0.16668	
	rs11114027	0.37482	rs6832751	0.65893	
	rs7308297	0.18092	rs7375209	0.33853	
	rs1465046	0.57448	rs11248047	0.93505	
	rs17294719	0.36636	CPLX2	rs2243404	0.76688
rs2251214	0.32359	rs7718856		0.07444	
CPLX3	rs7162232	0.67135		rs6874025	0.72218
	rs6495122	0.60608		rs12520557	0.76957
VAMP2	rs8067606	0.80588		rs11134932	0.92888
NSF	rs183211			rs10476170	0.53281
	rs17692129	0.83791		rs17065535	0.11211
	rs7224296	0.05305		rs6556225	0.36353
	rs17698176	0.38155		rs1560035	0.47697
CPLX4	rs1914321	0.02163		rs4867806	0.65625
	rs499824	0.81498	rs11134935	0.49431	
	rs7228681	0.13420	rs4868538	0.16514	
	rs12456930	0.08485	rs10866691	0.94357	
	rs12232757	0.42805	rs4868539		
	rs640401		rs890737	0.90204	
RAB3A	rs509886	0.20299	rs11134938	0.57680	
	rs10503024	0.13737	rs1006101	0.88312	
	rs874628	0.73628	rs10866692	0.99481	
	rs2271881	0.77492	rs930047	0.51534	
SNPH	rs2271882	0.25798	rs13166213	0.58418	
	rs17683539	0.70461	rs11134942	0.27905	
	rs2049051	0.05203	rs2114968	0.45165	
	rs6109320	0.98512	STX1A	rs4363087	0.90163
rs7354385	0.58227	rs3793243	0.86838		
rs3764715	0.23104	rs2293485	0.66049		
rs6134520	0.32681	rs941298	0.76395		
rs4814106	0.25008	STXBP1	rs2039204	0.71640	
rs2281711	0.97015	rs7852204	0.84553		
		rs2241167	0.62985		
		SYP	rs2293945	0.67915	
			rs5906754	0.94017	

In bold, nominally significant p-values



## CAPÍTOL 3. EFECTES TRANSCRIPTÒMICS DE LA COCAÏNA EN UN MODEL CEL·LULAR

### Article 4

#### Efecte de l'exposició aguda a cocaïna sobre l'expressió gènica en cèl·lules SH-SY5Y diferenciades

##### RESUM

Els efectes de recompensa i reforç de la cocaïna estan mediatos principalment per la neurotransmissió dopaminèrgica. L'objectiu d'aquest estudi és avaluar els canvis d'expressió gènica induïts per una exposició aguda de 30 minuts a la cocaïna en cèl·lules SH-SY5Y diferenciades, que s'han emprat àmpliament com a model neuronal dopaminèrgic. Es van obtenir dades d'expressió gènica de *microarrays* d'Affymetrix a diferents concentracions de cocaïna (0, 1 i 5  $\mu\text{M}$ ) i dos punts de temps després de l'exposició a la droga (6 i 24 hores). No es van observar efectes citotòxics en aquestes cèl·lules, ni tampoc canvis d'expressió en gens de resposta immunitària o inflamatòria. Només es van observar canvis en l'expressió gènica 6 hores després de l'exposició a cocaïna 5  $\mu\text{M}$ , en gens implicats en la regulació de la transcripció i l'expressió gènica, moviment cel·lular i adaptacions neuronals. En canvi, no es van observar diferències un cop passades 24 hores de l'exposició a la droga.

##### REFERÈNCIA

N. Fernández-Castillo, M. Ribasés, M. Casas, B. Cormand. Effect of acute exposure to cocaine on gene expression in differentiated SH-SY5Y cells [Manuscrit en preparació].





## EFFECT OF ACUTE EXPOSURE TO COCAINE ON GENE EXPRESSION IN DIFFERENTIATED SH-SY5Y CELLS

Noelia Fernàndez-Castillo<sup>1,2,3</sup>, Marta Ribasés<sup>4,5</sup>, Miguel Casas<sup>4,6</sup>, Bru Cormand<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

<sup>2</sup>The Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain

<sup>4</sup>Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain <sup>5</sup>Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

<sup>6</sup>Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

### Corresponding author:

Bru Cormand. Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain, Avinguda Diagonal 645, edifici annex, 3<sup>a</sup> planta, 08028, Barcelona, Catalonia, Spain. Tel.: (+34) 93 4021013. Fax: (+34) 93 4034420; Email: bcormand@ub.edu

**Keywords:** cocaine, microarray, SH-SY5Y, dopaminergic model

### ABSTRACT

Cocaine reward and reinforcing effects are mediated mainly by dopaminergic neurotransmission. The aim of this study is to assess gene expression changes induced by an acute 30-minutes cocaine exposure in SH-SY5Y differentiated cells, which has been widely used as a dopaminergic neuronal model. Gene expression data from Affymetrix microarrays were obtained at different cocaine concentrations (0, 1 and 5  $\mu$ M) and two time-points after drug exposure (6 and 24 hours). No cytotoxic effects were observed in these cells, and the expression levels of inflammatory or immune response genes did not change either. Gene expression changes were only observed at 6 hours after 5  $\mu$ M cocaine exposure, involving genes related to regulation of transcription and gene expression, cellular movement and neuronal adaptations. No differences were observed after 24 hours of exposure.

### INTRODUCTION

Dopamine (DA) is a key neurotransmitter particularly involved in reward pathways, as well as in movement and behavior. Cocaine's pleasurable and addictive effects are thought to be principally mediated through DA, since cocaine binds the DA transporter (DAT) producing an increase in DA concentration at synapses and stimulating neurons in brain regions involved in reward and reinforcement behavior (Pettit *et al.*, 1984; Ritz *et al.*, 1987; Bergman *et al.*, 1989; Pettit & Justice, 1989; Ritz *et al.*, 1990).

The SH-SY5Y neuroblastoma cell line, a neuroblastic subclone of the SK-N-SH cell line, has been widely used as a human dopaminergic neuronal model for studies on neuronal differentiation

and Parkinson's disease (Beck *et al.*, 2006; Ouyang & Shen, 2006; Tang *et al.*, 2006). The SH-SY5Y cells can be induced to differentiate with retinoic acid (RA), resulting in phenotypic changes compatible with neuronal-like morphology and expressing neuronal and dopaminergic markers (Cuende *et al.*, 2008).

Cocaine's chronic and acute effects on gene expression have been studied using a broad range of animal models and experimental paradigms and procedures, and also in human post-mortem samples (Yuferov *et al.*, 2005; Lull *et al.*, 2008). In vitro studies in human cell lines have only been performed in human neuronal progenitor cells, after acute cocaine exposure (Crawford *et al.*, 2006). The aim of this study is to evaluate cocaine-induced gene expression changes in differentiated SH-SY5Y cells after an acute exposure to the drug.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture, differentiation and cocaine treatment**

SH-SY5Y cells (ATCC) were cultured in previously poly-lysinated 100mm dishes at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in 50:50 Dulbecco's modified Eagle's medium: F12 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% Penicillin/streptomycin. For differentiation to dopaminergic neuronal cells, between 4 · 10<sup>4</sup> cells/ml were harvested with RA (10µM) supplemented on the media during 7 days, replacing with fresh RA medium on the 4<sup>th</sup> 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. Western blotting of tubulin was performed as described elsewhere (Rodriguez-Pascau *et al.*, 2009), and TH was tested with the same procedure using rabbit anti-TH polyclonal (Chemicon) dilution 1:500 and overnight incubation at 4°C. Briefly, cell cycle analysis was performed by fixing cells with ethanol and incubating them with propidium iodide during 15 minutes at 37°C, and then analyzed by flow cytometry.

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 untreated medium or medium containing 1 or 5 µM of cocaine hydrochloride (Alcaliber, 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. The six treatment groups consisted of untreated (control) 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 in each condition.

### **Cytotoxicity**

For evaluating cocaine cytotoxicity, an XTT assay was performed using Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche), based on the cleavage of the yellow tetrazolium salt XTT to form an orange formazan dye by metabolic active cells. Briefly, SH-SY5Y cells were harvested in 24-well plates

and differentiated with RA as described previously. The medium was replaced by medium containing cocaine at different concentrations (0, 1, 5, 10, 15 and 20  $\mu\text{M}$ ) for an acute 30 or 60 minutes exposure, and then replaced by fresh medium. XTT assay was performed at 24 or 48 hours after cocaine exposure, changing 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 at 2 and 4h after adding the medium with XTT.

### **RNA isolation and microarray hybridization**

For each condition (cocaine concentration and time after acute exposure), nine dishes containing treated SH-SY5Y differentiated cells were trypsinized, the pellets were homogenized using Qiashredder (Qiagen) and total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's indications. RNA concentration was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) and integrity was evaluated using the Bioanalyzer 2100 platform (Agilent Technologies). RNA samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analyzed. Pools of RNA from three dishes were used for each replicate in the microarray. For the microarray experiment we used the GeneChip<sup>®</sup> Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix), which contains probes that cover over 47,000 transcripts and variants from over 38,500 well-characterized genes. A total of 18 chips were used: three pools per condition (0, 1 and 5  $\mu\text{M}$  of cocaine-HCl) and two time points, 6 and 24 hours after an acute 30-min exposure. Two  $\mu\text{g}$  of RNA from each pool was used to hybridize arrays at the Genomics Unit of Hospital Clínic-IDIBAPS. Chips were scanned using a GenePix4000B scanner and raw data was obtained using the GenePix Pro 4.0 and GCOS softwares.

### **Statistical and Bioinformatics analysis**

Statistical analysis was performed using the Bioconductor software for R environment and the *affy* library ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) (Gentleman *et al.*, 2004). Background correction, normalization and summarization were performed using the background, Robust Multichip Average (RMA) (Irizarry *et al.*, 2003) and median-polish methods respectively. Genes were filtered by signal (threshold  $\log_2(40)$ ) and variability ( $\text{IQR} > 25\%$ ), to improve statistical power (Hackstadt & Hess, 2009). The Linear Modelling for Microarray Analysis (LIMMA) package (Smyth, 2004) was used for the class comparison, in which the expression patterns for 0  $\mu\text{M}$  – 1  $\mu\text{M}$ , 0  $\mu\text{M}$  – 5  $\mu\text{M}$ , and 1  $\mu\text{M}$  – 5  $\mu\text{M}$  conditions were compared. The multiple testing error was corrected by adjusting the p-value with a False Discovery Rate (FDR) of 10%. Functional group enrichment of genes showing significant differences in expression was performed using the DAVID Annotation Tool ([david.abcc.ncifcrf.gov](http://david.abcc.ncifcrf.gov)) (Dennis *et al.*, 2003). Gene expression networks were constructed using the Ingenuity Pathway Analysis 8.8 software (Ingenuity Systems. Redwood city, CA).

### **Quantitative RT-PCR**

To confirm some of the results obtained in the microarray study, total RNA from the samples was transcribed using the High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real Time-PCR experiments were performed for 13 genes using the LightCycler 480 II system and the Universal Probe Library (Roche Applied Science). Gene assays were designed using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center software (Roche Applied Science). Sequence of the primers and probes used are available upon request. Beta-actin (*Actb*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) 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, and statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

SH-SY5Y cells were successfully differentiated with retinoic acid to dopaminergic neurons as shown by phenotypic changes compatible with neuronal-like morphology and neurite outgrowth (Fig. 1a), expression of tyrosine-hydroxylase as a dopaminergic neuronal marker (Fig. 1b) and decreased proportion of cells in S and G2/M phases, and increased G1/G0 phase proportion (Fig. 1c).

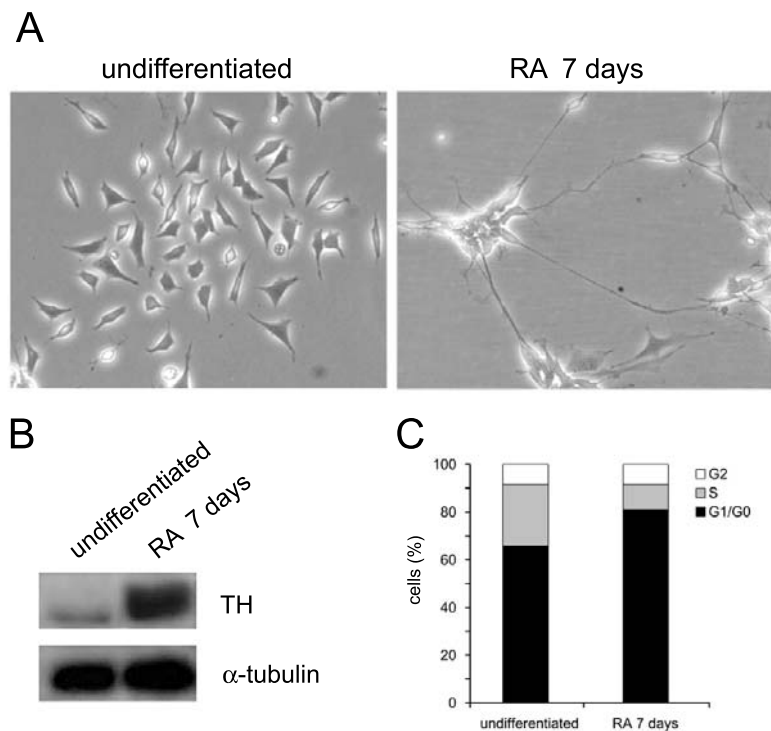
Cocaine cytotoxicity in differentiated SH-SY5Y cells was evaluated at different cocaine concentrations (0, 1, 5, 10, 15 and 20  $\mu\text{M}$ ) after 24h and 48h of an acute 30 or 60 minutes exposure, but no changes were observed at any of the assayed conditions when we compared these data with those obtained in untreated differentiated cells. Since no cytotoxic effects were detected, the range of cocaine concentration to be used in the gene expression experiments, and also the exposure and retrieval times were set according to previous studies in human neuronal progenitor cells. Thus, we considered a 30 minutes acute exposure to 1 and 5  $\mu\text{M}$  cocaine and the effect on gene expression was analyzed after 6 and 24 hours.

### *6 hours after cocaine exposure*

After 6 hours of an acute 30-minutes exposure to 5  $\mu\text{M}$  cocaine, 264 genes exhibited significantly altered expression levels as compared to untreated cells (Table S1). No statistically significant differences were observed when cells treated with 1  $\mu\text{M}$  cocaine were compared to untreated cells or to cells treated with 5  $\mu\text{M}$  cocaine.

Functional group enrichment identified several processes as being significantly activated by 5  $\mu\text{M}$  cocaine at the 6-h time point: regulation of transcription (51 genes), nitrogen compound metabolism (20), cellular biosynthesis (20), regulation of gene expression (20), cell cycle (14), vesicle mediated transport (14), cytoskeleton organization (11), cell differentiation (7), MAPK signalling pathway (7), cell division and chromosome partitioning (6), ErbB signalling pathway (5), regulation of neuron differentiation (3).

**Figure 1. SH-SY5Y differentiation with retinoic acid (RA) during 7 days.** A) neuronal-like morphological changes observed in cultured cells after differentiation, including neurite outgrowth. B) Expression of tyrosine hydroxilase (TH) as a dopamine neuronal marker by western blot. C) Cell cycle arrest in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>.

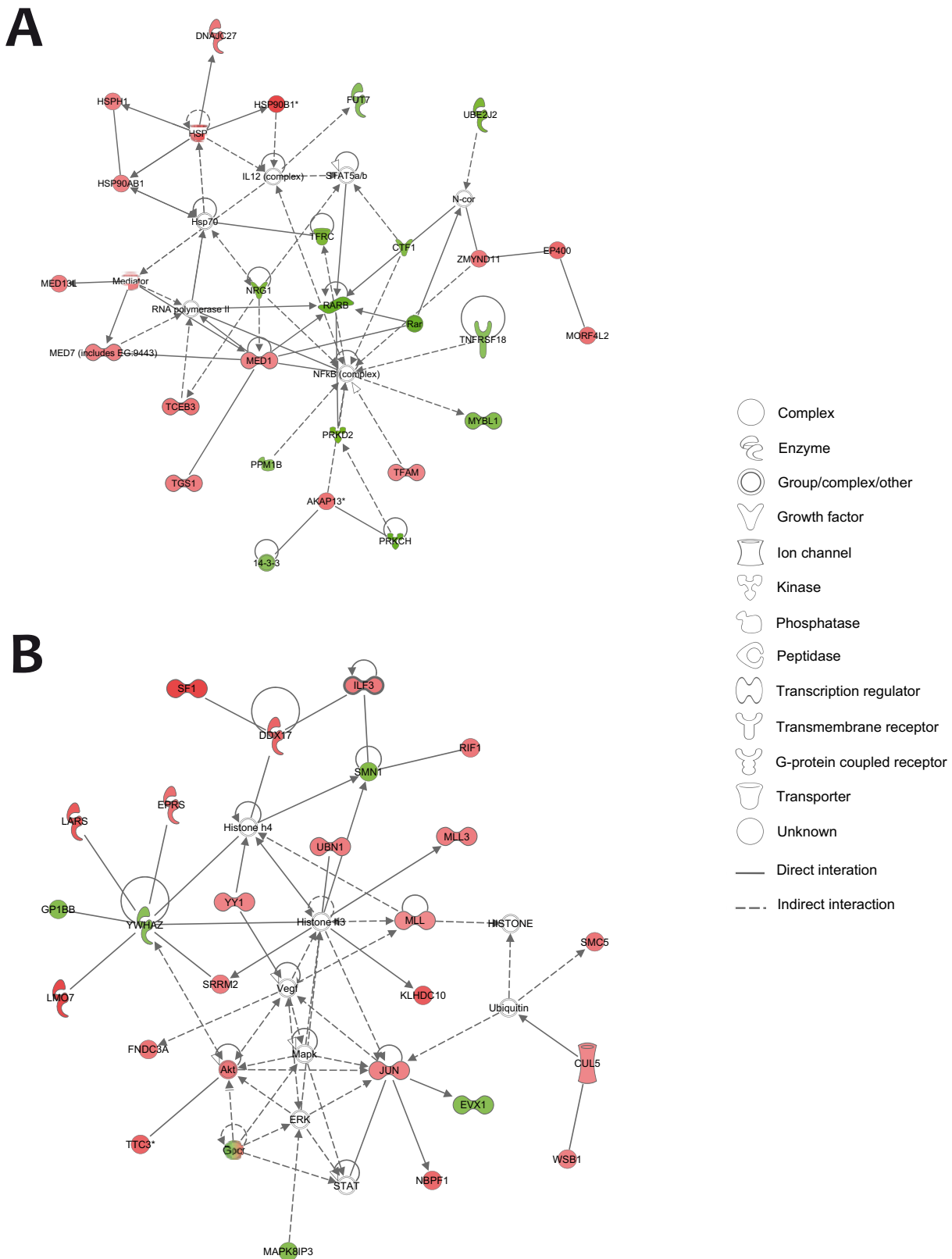


The top ranked functional networks obtained by Ingenuity Pathway Analysis included functions associated with cellular movement, compromise, function and maintenance, tissue development, cellular assembly and organization (Figs. 2 and 3). These networks contain several genes involved in functions related to neuroplasticity and neuronal adaptations.

We selected 13 genes showing expression differences  $\geq 1.5$  fold for qRT-PCR validation based on the identified networks and functions (Table 1). These genes, listed in Table 1, are involved in neurogenesis, axon guidance, neuroplasticity, neurite outgrowth, neurotrophin signalling pathway and synaptic vesicle fusion. However, the differential expression observed in the microarray analysis could not be validated by qRT-PCR (Table 1).

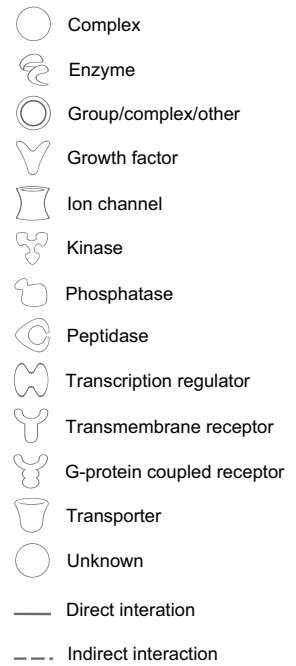
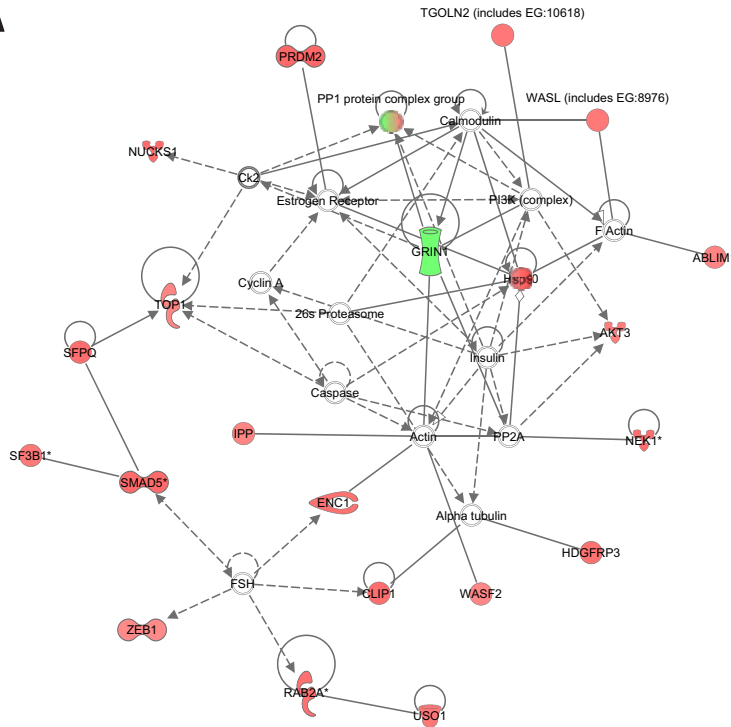
#### *24 hours after cocaine exposure*

After 24 hours of an acute 30-minutes exposure to cocaine, no significant differences in gene expression were detected at any of the assayed conditions.

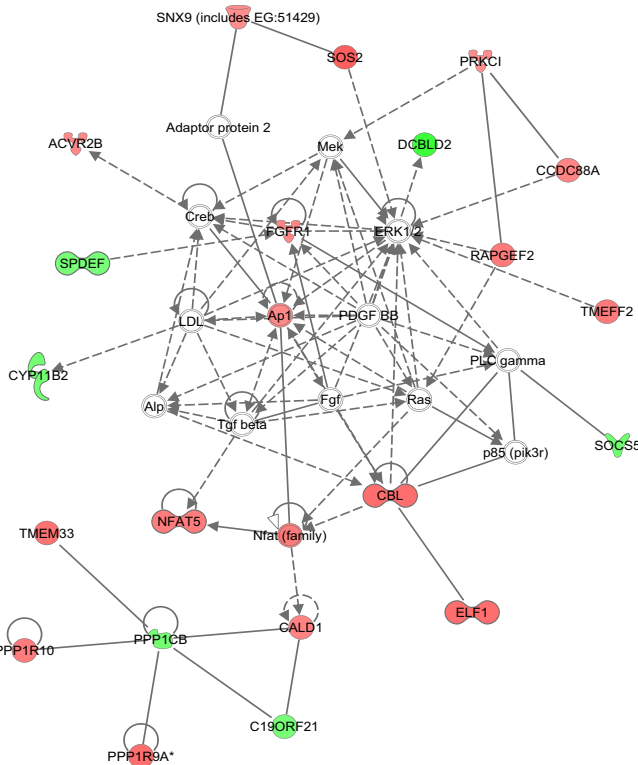


**Figure 2. Gene network graphical representation of interaction between genes that are differentially expressed after 6 hours of acute exposure to cocaine (5  $\mu$ M) (I).** A) Gene network 1 (score = 47) involving cellular movement, compromise, function and maintenance. B) Gene network 2 (score = 44) involving cellular compromise and embryonic development. Genes differentially expressed are represented as nodes depicted in red (up-regulated) or green (down-regulated) and biological relationship between two nodes is represented with a solid or dashed line (indicating direct or indirect interaction, respectively). Each node is displayed with different shapes that indicate the functional class of the gene product shown on the right. Modulatory effects on expression are indicated by arrows.

**A**



**B**



**Figure 3. Gene network graphical representation of interaction between genes that are differentially expressed after 6 hours of acute exposure to cocaine (5  $\mu$ M) (II). C) Gene network 3 (score = 34) involving cellular assembly and organization, tissue development and cellular movement. D) Gene network 4 (score = 32) involving development and function, lipid metabolism, and small molecule biochemistry. Genes differentially expressed are represented as nodes depicted in red (up-regulated) or green (down-regulated) and biological relationship between two nodes is represented with a solid or dashed line (indicating direct or indirect interaction, respectively). Each node is displayed with different shapes that indicate the functional class of the gene product shown on the right. Modulatory effects on expression are indicated by arrows.**

**Table 1:** Changes in the expression of selected genes in differentiated SH-SY5Y cells acutely exposed to cocaine (5  $\mu$ M) as determined by Affymetrix arrays versus quantitative RT-PCR.

Symbol	Gene name	Function	Microarray			qRT-PCR
			Probe	Fold Change	P-Value	
AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	Neurotrophin signalling pathway	219393_s_at	1.54	3.3 e-03	NC
ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	Neurite outgrowth, neuronal differentiation	201340_s_at	1.67	4.3 e-04	NC
SMAD5	SMAD family member 5	Neurogenesis	205187_at 205188_s_at	1.55 1.77	2.1 e-03 2.5 e-03	NC
NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	Axon guidance	208003_s_at	1.56	4.4 e-03	NC
ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	Neuronal differentiation	212420_at	1.74	6.0 e-04	NC
HRB	HIV-1 Rev binding protein	Vesicle endocytosis	213926_s_at	1.57	4.7 e-03	NC
SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	Adult neurogenesis	214305_s_at 201070_x_at	1.61 1.56	1.9 e-03 3.7 e-03	NC
IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	Neuronal differentiation	216493_s_at	1.79	2.0 e-03	NC
PPP1R9A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	Neurite formation, neuronal cytoskeleton	221088_s_at	1.74	1.3 e-04	NC
HDGFRP3	hepatoma-derived growth factor, related protein 3	Neurite outgrowth	221976_s_at	1.68	2.2 e-03	NC
SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	Synaptic vesicle	1552978_a_at	1.63	1.7 e-03	NC
NRG1	Neuregulin 1	Neuroplasticity and neurogenesis	208232_x_at	-1.59	6.3 e-04	NC
SEMA6D	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D	Axon guidance	226492_at	-1.64	3.2 e-03	NC

NC: no statistically significant changes detected.

## DISCUSSION

Since both differentiated and undifferentiated SH-SY5Y cells have been widely used in neuroscience research, implications in using this cell line for neurotoxicity and neurotoxin studies have to be considered. SH-SY5Y cells differentiated with RA seem to be less susceptible to neurotoxicity than undifferentiated cells, and RA could mediate neuroprotection resulting in higher tolerance to toxicity in this cell line (Cheung *et al.*, 2009). In order to avoid this



phenomena, once the cells were differentiated, the medium was replaced by fresh medium without RA during 24 hours before they were treated with cocaine. However, RA-induced neuroprotection may have impacted on the results obtained in our experiments, preventing the detection of neurotoxicity and of cocaine-induced expression changes.

In contrast with a previous study that assessed cocaine-induced expression changes *in vitro*, in human neuronal progenitor cells (Crawford *et al.*, 2006), our study showed no differences in gene expression at 24 hours after the cocaine treatment using the same concentrations and conditions. In this previous study, differences were even identified 48 hours after the treatment. Gene function classification also differed between our study and the mentioned above, since the main biological categories identified by the authors corresponded to immune and inflammatory response. In our study, the main categories identified involved processes such as regulation of transcription, regulation of gene expression, MAPK signalling pathway and vesicle transport, in agreement with several studies performed in human post-mortem samples and animal models (Bannon *et al.*, 2002; Lehrmann *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003; Albertson *et al.*, 2004; Bannon *et al.*, 2004; Yuferov *et al.*, 2005; Lehrmann *et al.*, 2006; Mash *et al.*, 2007; Lull *et al.*, 2008), but none of them involved immune or inflammatory response.

The top four ranked gene networks included 10 of the genes selected for validation (Figs. 2 and 3), which are involved in neuronal adaptations and synaptic plasticity. However, differences in gene expression were too subtle in the microarray experiment (around  $\pm 1.6$  fold change) and could not be validated by qRT-PCR given the number of replicas performed. Poor correlation between microarray and qRT-PCR has been previously described in genes exhibiting low fold changes in expression (Dallas *et al.*, 2005). Nevertheless, expression changes of those interesting genes should be assessed at different time-points after cocaine exposure and using more replicates, in order to corroborate or discard their cocaine-induced expression changes and their potential contribution to cocaine-induced neuroplasticity after an acute exposure.

To sum up, our data indicates that cocaine may induce changes in gene expression in SH-SH5Y differentiated cells a few hours after exposure, related to regulation of transcription and gene expression, cellular movement, neuronal adaptations, but no changes were detected 24 hours after the exposure. Further studies should be performed to validate the identified gene expression changes.

## REFERENCES

- Albertson, D.N., Pruetz, B., Schmidt, C.J., Kuhn, D.M., Kapatos, G. & Bannon, M.J. (2004) Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. *J Neurochem* **88**, 1211-1219.
- Bannon, M.J., Pruetz, B., Barfield, E. & Schmidt, C.J. (2004) Transcription factors specifying dopamine phenotype are decreased in cocaine users. *Neuroreport* **15**, 401-404.

- Bannon, M.J., Pruetz, B., Manning-Bog, A.B., Whitty, C.J., Michelhaugh, S.K., Sacchetti, P., Granneman, J.G., Mash, D.C. & Schmidt, C.J. (2002) Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine abusers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6382-6385.
- Beck, K.E., De Girolamo, L.A., Griffin, M. & Billett, E.E. (2006) The role of tissue transglutaminase in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-induced toxicity in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* **405**, 46-51.
- Bergman, J., Madras, B.K., Johnson, S.E. & Spealman, R.D. (1989) Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **251**, 150-155.
- Crawford, F.C., Wood, M.L., Wilson, S.E., Mathura, V.S., Hollen, T.R., Geall, F., Kolippakkam, D.N. & Mullan, M.J. (2006) Cocaine induced inflammatory response in human neuronal progenitor cells. *J Neurochem* **97**, 662-674.
- Cuende, J., Moreno, S., Bolanos, J.P. & Almeida, A. (2008) Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APC(Cdh1) activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene* **27**, 3339-3344.
- Cheung, Y.T., Lau, W.K., Yu, M.S., Lai, C.S., Yeung, S.C., So, K.F. & Chang, R.C. (2009) Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* **30**, 127-135.
- Dallas, P.B., Gottardo, N.G., Firth, M.J., Beesley, A.H., Hoffmann, K., Terry, P.A., Freitas, J.R., Boag, J.M., Cummings, A.J. & Kees, U.R. (2005) Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR – how well do they correlate? *BMC Genomics* **6**, 59.
- Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C. & Lempicki, R.A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* **4**, P3.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y. & Zhang, J. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80.
- Hackstadt, A.J. & Hess, A.M. (2009) Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* **10**, 11.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. & Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264.
- Lehrmann, E., Colantuoni, C., Deep-Soboslay, A., Becker, K.G., Lowe, R., Huestis, M.A., Hyde, T.M., Kleinman, J.E. & Freed, W.J. (2006) Transcriptional changes common to human cocaine, cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One* **1**, e114.
- Lehrmann, E., Oyler, J., Vawter, M.P., Hyde, T.M., Kolachana, B., Kleinman, J.E., Huestis, M.A., Becker, K.G. & Freed, W.J. (2003) Transcriptional profiling in the human prefrontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse. *Pharmacogenomics J* **3**, 27-40.
- Lull, M.E., Freeman, W.M., Vrana, K.E. & Mash, D.C. (2008) Correlating human and animal studies of cocaine abuse and gene expression. *Ann NY Acad Sci* **1141**, 58-75.
- Mash, D.C., 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.

- Ouyang, M. & Shen, X. (2006) Critical role of ASK1 in the 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Neurochem* **97**, 234-244.
- Pettit, H.O., Ettenberg, A., Bloom, F.E. & Koob, G.F. (1984) Destruction of dopamine in the nucleus accumbens selectively attenuates cocaine but not heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **84**, 167-173.
- Pettit, H.O. & Justice, J.B., Jr. (1989) Dopamine in the nucleus accumbens during cocaine self-administration as studied by in vivo microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav* **34**, 899-904.
- Ritz, M.C., Cone, E.J. & Kuhar, M.J. (1990) Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life Sci* **46**, 635-645.
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R. & Kuhar, M.J. (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* **237**, 1219-1223.
- Rodriguez-Pascau, L., Gort, L., Schuchman, E.H., Vilageliu, L., Grinberg, D. & Chabas, A. (2009) Identification and characterization of SMPD1 mutations causing Niemann-Pick types A and B in Spanish patients. *Hum Mutat* **30**, 1117-1122.
- Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3.
- Tang, B., Xiong, H., Sun, P., Zhang, Y., Wang, D., Hu, Z., Zhu, Z., Ma, H., Pan, Q., Xia, J.H., Xia, K. & Zhang, Z. (2006) Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* **15**, 1816-1825.
- Tang, W.X., Fasulo, W.H., Mash, D.C. & Hemby, S.E. (2003) Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. *J Neurochem* **85**, 911-924.
- Yuferov, V., Nielsen, D., Butelman, E. & Kreek, M.J. (2005) Microarray studies of psychostimulant-induced changes in gene expression. *Addict Biol* **10**, 101-118.

**Table S1:** Genes showing differential expression in Affymetrix microarray experiments in differentiated SH-SY5Y cells acutely exposed to cocaine (5 µM) as compared to untreated cells (10% FDR).

Probe	Gene symbol	Gene Name	Fold Change	P-value
<b>Upregulated</b>				
216450_x_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	2.17	1.69 E-05
1558747_at	SMCHD1	structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1	2.17	3.30 E-05
223578_x_at	PRO1073	PRO1073 protein	2.21	4.38 E-05
227510_x_at	PRO1073	PRO1073 protein	2.20	4.84 E-05
209254_at	KIAA0265	KIAA0265 protein	1.90	6.73 E-05
238350_at	FLJ25778	hypothetical protein FLJ25778	1.88	1.01 E-04
224568_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	2.45	1.13 E-04
232632_at	TSPAN3	tetraspanin 3	1.82	1.29 E-04
221088_s_at	PPP1R9A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	1.74	1.34 E-04
230629_s_at	EP400	E1A binding protein p400	1.70	1.71 E-04
213328_at	NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1	1.74	1.72 E-04
202773_s_at	SFRS8	splicing factor, arginine/serine-rich 8 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	1.67	2.08 E-04
215886_x_at	USP12	ubiquitin specific peptidase 12	1.70	2.10 E-04
212451_at	KIAA0256	KIAA0256 gene product	1.82	3.13 E-04
215992_s_at	RAPGEF2	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	1.57	3.20 E-04
224321_at	TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2	1.58	3.29 E-04
222027_at	NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate	1.78	3.63 E-04
210943_s_at	LYST	lysosomal trafficking regulator	1.59	3.82 E-04
210172_at	SF1	splicing factor 1	2.17	3.91 E-04
201340_s_at	ENC1	ectodermal-neural cortex (with BTB-like domain)	1.67	4.33 E-04
239022_at	SDHALP2	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein pseudogene 2	1.74	4.80 E-04
232021_at	GLT8D3	glycosyltransferase 8 domain containing 3	1.67	5.21 E-04
212420_at	ELF1	E74-like factor 1 (ets domain transcription factor)	1.74	6.00 E-04
240105_at	C21orf66	chromosome 21 open reading frame 66	1.80	6.30 E-04
223940_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	2.02	6.47 E-04
214600_at	TEAD1	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	1.66	6.63 E-04
236957_at	CDCA2	cell division cycle associated 2	1.83	7.07 E-04
215220_s_at	TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	1.70	7.28 E-04
208930_s_at	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	1.54	7.55 E-04
202818_s_at	TCEB3	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kDa, elongin A)	1.58	8.14 E-04
242722_at	LMO7	LIM domain 7	2.13	8.16 E-04
214693_x_at	NBPF1	neuroblastoma breakpoint family, member 1	1.71	8.30 E-04
229010_at	CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming	1.74	8.44 E-04
230180_at	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	2.58	8.50 E-04
222508_s_at	ARGLU1	arginine and glutamate rich 1	1.70	8.52 E-04
223888_s_at	LARS	leucyl-tRNA synthetase	1.92	8.59 E-04
209088_s_at	UBN1	ubiquitin 1	1.49	8.65 E-04
239002_at	ASPM	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	1.70	8.82 E-04
232940_s_at	MLL3	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 3	1.48	9.26 E-04
217644_s_at	SOS2	son of sevenless homolog 2 (Drosophila)	1.92	9.39 E-04
1558173_a_at	LUZP1	leucine zipper protein 1	1.58	9.68 E-04
1557227_s_at	TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	2.06	1.01 E-03
214474_at	PRKAB2	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit	1.61	1.05 E-03

Table S1. (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Fold Change	P-value
208325_s_at	AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	1.60	1.08 E-03
203056_s_at	PRDM2	PR domain containing 2, with ZNF domain	1.81	1.09 E-03
201831_s_at	USO1	USO1 homolog, vesicle docking protein (yeast)	1.61	1.10 E-03
226898_s_at	SFPQ	splicing factor proline/glutamine-rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	1.74	1.12 E-03
207937_x_at	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	1.45	1.16 E-03
203833_s_at	TGOLN2	trans-golgi network protein 2	1.63	1.17 E-03
213998_s_at	DDX17	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	1.78	1.17 E-03
231735_s_at	PRO1073	PRO1073 protein	1.47	1.19 E-03
242911_at	MED13L	mediator complex subunit 13-like	1.51	1.21 E-03
233559_s_at	WDFY1	WD repeat and FYVE domain containing 1	1.63	1.22 E-03
212649_at	DHX29	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 29	1.59	1.26 E-03
208879_x_at	PRPF6	PRP6 pre-mRNA processing factor 6 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1.65	1.30 E-03
236371_s_at	TGS1	trimethylguanosine synthase homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1.49	1.33 E-03
227039_at	AKAP13	A kinase (PRKA) anchor protein 13	1.56	1.36 E-03
1554249_a_at	ZNF638	zinc finger protein 638	1.64	1.40 E-03
233368_s_at	RBJ	rab and DnaJ domain containing	1.57	1.42 E-03
1554740_a_at	IPP	intracisternal A particle-promoted polypeptide	1.47	1.51 E-03
215434_x_at	NBPF10	neuroblastoma breakpoint family, member 10	1.70	1.52 E-03
208664_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1.52	1.53 E-03
211993_at	WNK1	WNK lysine deficient protein kinase 1	1.58	1.56 E-03
1552978_a_at	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	1.63	1.69 E-03
204180_s_at	ZBTB43	zinc finger and BTB domain containing 43	1.45	1.69 E-03
200841_s_at	EPRS	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	1.65	1.71 E-03
224030_s_at	FAM115A	family with sequence similarity 115, member A	1.45	1.72 E-03
236665_at	CCDC18	coiled-coil domain containing 18	1.65	1.73 E-03
239046_at	TAF1B	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, B, 63kDa	1.57	1.74 E-03
220342_x_at	EDEM3	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3	1.50	1.80 E-03
243295_at	RBM27	RNA binding motif protein 27	1.50	1.81 E-03
224227_s_at	BDP1	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	1.82	1.82 E-03
214305_s_at	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	1.61	1.88 E-03
214052_x_at	BAT2D1	BAT2 domain containing 1	1.54	1.90 E-03
204964_s_at	SSPN	sarcospan (Kras oncogene-associated gene)	1.47	1.93 E-03
216493_s_at	IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	1.79	1.99 E-03
213494_s_at	YY1	YY1 transcription factor	1.41	2.05 E-03
221960_s_at	RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family	1.71	2.05 E-03
227152_at	C12orf35	chromosome 12 open reading frame 35	1.52	2.07 E-03
1553106_at	C5orf24	chromosome 5 open reading frame 24	1.93	2.09 E-03
205187_at	SMAD5	SMAD family member 5	1.55	2.12 E-03
235003_at	UHMK1	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	1.83	2.12 E-03
212926_at	SMC5	structural maintenance of chromosomes 5	1.56	2.17 E-03
201702_s_at	PPP1R10	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 10	1.55	2.20 E-03
205787_x_at	RP11-74E24.2	zinc finger CCCH-type domain-containing pseudogene	1.76	2.20 E-03
221976_s_at	HDGFRP3	hepatoma-derived growth factor, related protein 3	1.68	2.21 E-03
202412_s_at	USP1	ubiquitin specific peptidase 1	1.46	2.24 E-03
1555913_at	GON4L	gon-4-like ( <i>C. elegans</i> )	1.47	2.32 E-03
224311_s_at	CAB39	calcium binding protein 39	1.59	2.37 E-03
235376_at	USP4	ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)	1.63	2.39 E-03
222387_s_at	VPS35	vacuolar protein sorting 35 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	1.47	2.39 E-03
235266_at	ATAD2	ATPase family, AAA domain containing 2	1.51	2.43 E-03
1555450_a_at	NARG1L	NMDA receptor regulated 1-like	1.39	2.46 E-03

Table S1. (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Fold Change	P-value
1569472_s_at	TTC3	tetratricopeptide repeat domain 3	1.79	2.49 E-03
220295_x_at	DEPDC1	DEP domain containing 1	1.71	2.49 E-03
212492_s_at	JMJD2B	jumonji domain containing 2B	1.49	2.49 E-03
205188_s_at	SMAD5	SMAD family member 5	1.77	2.50 E-03
201615_x_at	CALD1	caldesmon 1	1.50	2.50 E-03
227101_at	ZNF800	zinc finger protein 800	1.52	2.52 E-03
1558924_s_at	CLIP1	CAP-GLY domain containing linker protein 1	1.73	2.53 E-03
206232_s_at	B4GALT6	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6	1.58	2.57 E-03
227514_at	LOC162073	hypothetical protein LOC162073	1.43	2.74 E-03
235977_at	LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2	1.53	2.81 E-03
209678_s_at	PRKCI	protein kinase C, iota	1.37	2.88 E-03
240434_at	ABLIM2	actin binding LIM protein family, member 2	1.38	3.03 E-03
225452_at	MED1	mediator complex subunit 1	1.40	3.08 E-03
212763_at	CAMSAP1L1	calmodulin regulated spectrin-associated protein 1-like 1	1.60	3.09 E-03
206667_s_at	SCAMP1	secretory carrier membrane protein 1	1.71	3.10 E-03
203176_s_at	TFAM	transcription factor A, mitochondrial	1.39	3.10 E-03
241820_at	RIF1	RAP1 interacting factor homolog (yeast)	1.54	3.10 E-03
235476_at	TRIM59	tripartite motif-containing 59	2.62	3.12 E-03
213281_at	JUN	jun oncogene	1.42	3.15 E-03
1554633_a_at	MYT1L	myelin transcription factor 1-like	1.49	3.20 E-03
208610_s_at	SRRM2	serine/arginine repetitive matrix 2	1.51	3.25 E-03
214900_at	ZKSCAN1	zinc finger with KRAB and SCAN domains 1	1.45	3.25 E-03
237209_s_at	NFRKB	nuclear factor related to kappaB binding protein	1.39	3.27 E-03
238831_at	TMEM33	transmembrane protein 33	1.68	3.27 E-03
1557910_at	HSP90AB1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member	1.44	3.27 E-03
209136_s_at	USP10	ubiquitin specific peptidase 10	1.60	3.28 E-03
201101_s_at	BCLAF1	BCL2-associated transcription factor 1	1.46	3.28 E-03
1559548_at	ACVR2B	activin A receptor, type IIB	1.41	3.31 E-03
206500_s_at	C14orf106	chromosome 14 open reading frame 106	1.76	3.32 E-03
219393_s_at	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma)	1.54	3.32 E-03
232127_at	CLCN5	chloride channel 5 (nephrolithiasis 2, X-linked, Dent disease)	1.52	3.41 E-03
241955_at	HECTD1	HECT domain containing 1	1.62	3.50 E-03
205809_s_at	WASL	Wiskott-Aldrich syndrome-like	1.60	3.58 E-03
216449_x_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	1.43	3.66 E-03
201070_x_at	SF3B1	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa	1.56	3.68 E-03
1557128_at	FAM111B	family with sequence similarity 111, member B	1.86	3.69 E-03
221765_at	UGCG	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	1.81	3.77 E-03
1559108_at	VPS53	vacuolar protein sorting 53 homolog (S. cerevisiae)	1.50	3.89 E-03
209433_s_at	PPAT	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase	1.39	3.95 E-03
228673_s_at	EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4	1.63	3.97 E-03
1557129_a_at	FAM111B	family with sequence similarity 111, member B	1.86	3.97 E-03
222626_at	RBM26	RNA binding motif protein 26	1.43	3.99 E-03
214313_s_at	EIF5B	eukaryotic translation initiation factor 5B	1.47	3.99 E-03
221705_s_at	SIKE	suppressor of IKK epsilon	1.74	4.00 E-03
221734_at	PRRC1	proline-rich coiled-coil 1	1.42	4.03 E-03
231272_at	MED7	mediator complex subunit 7	1.45	4.05 E-03
200598_s_at	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	1.43	4.06 E-03
211086_x_at	NEK1	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1	1.46	4.06 E-03
239833_at	COMMD1	copper metabolism (Murr1) domain containing 1	1.54	4.11 E-03
216997_x_at	TLE4	transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog, Drosophila)	1.59	4.12 E-03
236408_at	KLHDC5	kelch domain containing 5	1.44	4.25 E-03

Table S1. (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Fold Change	P-value
224517_at	POLR2J4	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J, 13.3kDa	1.51	4.31 E-03
241611_s_at	FNDC3A	fibronectin type III domain containing 3A	1.58	4.37 E-03
1553252_a_at	BRWD3	bromodomain and WD repeat domain containing 3	1.73	4.37 E-03
208003_s_at	NFAT5	nuclear factor of activated T-cells 5, tonicity-responsive	1.56	4.43 E-03
1554977_at	LOC198437	bA299N6.3	1.43	4.43 E-03
210461_s_at	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	1.47	4.48 E-03
224563_at	WASF4	WAS protein family, member 4	1.44	4.66 E-03
208900_s_at	TOP1	topoisomerase (DNA) I	1.48	4.67 E-03
213926_s_at	HRB	HIV-1 Rev binding protein	1.57	4.68 E-03
201085_s_at	SON	SON DNA binding protein	1.40	4.81 E-03
201294_s_at	WSB1	WD repeat and SOCS box-containing 1	1.45	4.85 E-03
220794_at	GREM2	gremlin 2, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)	1.46	4.86 E-03
236251_at	ITGAV	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	1.66	4.91 E-03
1555765_a_at	GNG4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	1.38	4.93 E-03
243857_at	MORF4L2	mortality factor 4 like 2	1.63	4.97 E-03
227740_at	UHMK1	U2AF homology motif (UHM) kinase 1	1.72	4.99 E-03
1564002_a_at	C6orf199	chromosome 6 open reading frame 199	1.43	5.02 E-03
1554159_a_at	ZMYND11	zinc finger, MYND domain containing 11	1.53	5.07 E-03
233985_x_at	PPP1R9A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	1.35	5.09 E-03
221220_s_at	SCYL2	SCY1-like 2 (S. cerevisiae)	2.22	5.16 E-03
223818_s_at	RSF1	remodeling and spacing factor 1	1.41	5.20 E-03
232904_at	SLC7A14	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 14	1.95	5.28 E-03
241702_at	HNRPD	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1, 37kDa)	1.57	5.31 E-03
242609_x_at	ADCK4	aarF domain containing kinase 4	1.43	5.32 E-03
223984_s_at	NUPL1	nucleoporin like 1	1.41	5.32 E-03
203532_x_at	CUL5	cullin 5	1.37	5.37 E-03
212758_s_at	ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1	1.40	5.50 E-03
223577_x_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	1.40	5.56 E-03
226643_s_at	NUDCD2	NudC domain containing 2	1.41	5.61 E-03
201879_at	ARIH1	ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (Drosophila)	1.39	5.61 E-03
205315_s_at	SNTB2	syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 2)	1.35	5.64 E-03
219387_at	CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	1.48	5.65 E-03
228986_at	OSBPL8	oxysterol binding protein-like 8	1.85	5.68 E-03
213957_s_at	CEP350	centrosomal protein 350kDa	1.55	5.74 E-03
223254_s_at	KIAA1333	KIAA1333	1.49	5.76 E-03
212078_s_at	MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	1.35	5.79 E-03
205184_at	GNG4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	1.34	5.83 E-03
1554873_at	CSPP1	centrosome and spindle pole associated protein 1	1.42	5.84 E-03
239978_at	PITPNB	phosphatidylinositol transfer protein, beta	1.53	5.95 E-03
223879_s_at	OXR1	oxidation resistance 1	1.40	5.97 E-03
1560599_a_at	CCDC123	coiled-coil domain containing 123	1.41	6.00 E-03
1555945_s_at	FAM120A	family with sequence similarity 120A	1.33	6.00 E-03
37793_r_at	RAD51L3	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)	1.39	6.01 E-03
235653_s_at	THAP6	THAP domain containing 6	1.48	6.06 E-03
223028_s_at	SNX9	sorting nexin 9	1.38	6.13 E-03
208744_x_at	HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	1.47	6.16 E-03
242349_at	HECTD1	HECT domain containing 1	1.55	6.20 E-03

Table S1. (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Fold Change	P-value
221279_at	GDAP1	ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	1.44	6.23 E-03
201728_s_at	KIAA0100	KIAA0100	1.39	6.24 E-03
238536_at	LOC642236	similar to FRG1 protein (FSHD region gene 1 protein)	1.33	6.28 E-03
1557388_at	RTTN	rotatin	1.42	6.37 E-03
216554_s_at	MBNL1	muscleblind-like (Drosophila)	1.44	6.58 E-03
235009_at	FAM44A	family with sequence similarity 44, member A	1.63	6.75 E-03
225937_at	CUX1	cut-like homeobox 1	1.54	6.83 E-03
232013_at	C9orf102	chromosome 9 open reading frame 102	1.49	6.85 E-03
205542_at	STEAP1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	1.72	6.87 E-03
227402_s_at	C8orf53	chromosome 8 open reading frame 53	1.32	6.91 E-03
230000_at	RNF213	ring finger protein 213	1.39	6.92 E-03
220764_at	PPP4R2	protein phosphatase 4, regulatory subunit 2	1.36	6.95 E-03
1568877_a_at	ACBD5	acyl-Coenzyme A binding domain containing 5	1.48	6.96 E-03
<b>Downregulated</b>				
215778_x_at	HAB1	B1 for mucin	-1.88	2.06 E-05
238199_x_at	LOC440552	OK/SW-cl.16	-1.90	7.63 E-05
239446_x_at	DCBLD2	discoidin, CUB and LCCL domain containing 2	-1.95	1.22 E-04
214316_x_at	CALR	calreticulin	-1.76	1.28 E-04
244656_at	RASL10B	RAS-like, family 10, member B	-1.76	2.19 E-04
229747_x_at	MGC40489	hypothetical protein MGC40489	-1.71	3.98 E-04
230929_s_at	UBE2J2	ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	-1.63	4.84 E-04
240686_x_at	TFRC	transferrin receptor (p90, CD71)	-1.62	4.87 E-04
216289_at	GPR144	G protein-coupled receptor 144	-1.51	5.12 E-04
241669_x_at	PRKD2	protein kinase D2	-1.81	5.92 E-04
208232_x_at	NRG1	neuregulin 1	-1.59	6.30 E-04
235186_at	LOC388692	hypothetical gene supported by AK123662	-1.49	1.40 E-03
203852_s_at	SMN1	survival of motor neuron 1, telomeric	-1.51	1.67 E-03
213177_at	MAPK8IP3	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	-1.44	1.68 E-03
229561_at	LRRC16B	leucine rich repeat containing 16B	-1.43	1.73 E-03
208730_x_at	RAB2A	RAB2A, member RAS oncogene family	-1.43	2.03 E-03
231268_at	LOC645895	hypothetical LOC645895	-1.48	2.21 E-03
209648_x_at	SOCS5	suppressor of cytokine signaling 5	-1.44	2.25 E-03
220561_at	IGF2AS	insulin-like growth factor 2 antisense	-1.46	2.29 E-03
227781_x_at	FAM57B	family with sequence similarity 57, member B	-1.45	2.50 E-03
217976_s_at	DYNC1L1	dynein, cytoplasmic 1, light intermediate chain 1	-1.56	2.51 E-03
242402_x_at	CENTD1	centaurin, delta 1	-1.52	2.65 E-03
207914_x_at	EVX1	even-skipped homeobox 1	-1.41	2.75 E-03
230073_at	DR1	down-regulator of transcription 1, TBP-binding (negative cofactor 2)	-1.46	2.78 E-03
231852_at	THEX1	three prime histone mRNA exonuclease 1	-1.76	2.83 E-03
221136_at	GDF2	growth differentiation factor 2	-1.44	2.85 E-03
210782_x_at	GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	-1.40	2.91 E-03
214174_s_at	PDLIM4	PDZ and LIM domain 4	-1.39	3.06 E-03
206813_at	CTF1	cardiotrophin 1	-1.50	3.09 E-03
229727_x_at	FAM148B	family with sequence similarity 148, member B	-1.47	3.13 E-03
226492_at	SEMA6D	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D	-1.64	3.24 E-03
221869_at	ZNF512B	zinc finger protein 512B	-1.42	3.30 E-03
213754_s_at	PAIP1	poly(A) binding protein interacting protein 1	-1.37	3.33 E-03
224975_at	NFIA	nuclear factor I/A	-1.67	3.38 E-03
227738_s_at	ARMC5	armadillo repeat containing 5	-1.39	3.71 E-03
200639_s_at	YWHAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	-1.38	3.80 E-03



Table S1. (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Fold Change	P-value
228026_at	CSDE1	cold shock domain containing E1, RNA-binding	-1.43	4.00 E-03
215949_x_at	IGHM	immunoglobulin heavy constant mu	-1.42	4.19 E-03
218764_at	PRKCH	protein kinase C, eta	-2.23	4.20 E-03
225587_at	TMEM129	transmembrane protein 129	-1.36	4.23 E-03
225900_at	EXOC6B	exocyst complex component 6B	-1.56	4.56 E-03
213225_at	PPM1B	protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform	-1.37	4.76 E-03
205080_at	RARB	retinoic acid receptor, beta	-2.41	4.79 E-03
228744_at	CEP27	centrosomal protein 27kDa	-1.38	4.88 E-03
201407_s_at	PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	-1.40	4.96 E-03
214594_x_at	ATP8B1	ATPase, class I, type 8B, member 1	-1.58	4.97 E-03
233734_s_at	OSBPL5	oxysterol binding protein-like 5	-1.39	4.99 E-03
212450_at	KIAA0256	KIAA0256 gene product	-1.38	5.34 E-03
212925_at	C19orf21	chromosome 19 open reading frame 21	-1.35	5.43 E-03
209769_s_at	GP1BB	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide	-1.45	5.47 E-03
214403_x_at	SPDEF	SAM pointed domain containing ets transcription factor	-1.35	5.48 E-03
220173_at	C14orf45	chromosome 14 open reading frame 45	-1.37	5.51 E-03
1560475_at	LOC100129455	hypothetical protein LOC100129455	-1.50	5.52 E-03
223851_s_at	TNFRSF18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18	-1.35	5.78 E-03
214630_at	CYP11B2	cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2	-1.40	6.46 E-03
235610_at	ALKBH8	alkB, alkylation repair homolog 8 (E. coli)	-1.52	6.61 E-03
217696_at	FUT7	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	-1.36	6.64 E-03
231846_at	FOXRED2	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2	-1.33	6.67 E-03
212019_at	RSL1D1	ribosomal L1 domain containing 1	-1.38	6.78 E-03
235195_at	FBXW2	F-box and WD repeat domain containing 2	-1.34	6.86 E-03



## CAPÍTOL 4. EFECTES TRANSCRIPTÒMICS DE L'ADMINISTRACIÓ ACTIVA I PASSIVA D'MDMA (ÈXTASI) EN UN MODEL ANIMAL

### Article 5

#### El consum actiu i passiu d'MDMA ('èxtasi') indueix canvis transcripcionals diferencials en el cervell de ratolí

##### RESUM

El 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA, "èxtasi") és una droga recreativa àmpliament utilitzada entre adolescents i adults joves. Tot i que els seus efectes de recompensa estan ben establerts, encara hi ha controvèrsia respecte el seu potencial addictiu. Donat que els estudis previs s'han centrat en l'administració passiva d'MDMA, l'objectiu d'aquest estudi ha estat comparar les conseqüències de l'administració activa i passiva d'MDMA en l'expressió gènica del cervell de ratolí. Es va emprar un paradigma d'autoadministració intravenosa operant acoblat a control combinat amb la tecnologia de *microarrays*. Els perfils transcriptòmics del nucli estriat ventral, l'escorça frontal, el nucli dorsal del rafe i l'hipocamp es van analitzar en 27 ratolins dividits en els grups d'MDMA contingent (administració activa de la droga), MDMA acoblat (administració passiva de la droga) i salí acoblat (administració passiva d'una solució salina), i es van validar els canvis observats mitjançant PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR). La comparació dels ratolins MDMA contingents i MDMA acoblats respecte els salins acoblats van permetre la identificació d'expressió diferencial en diversos gens, la majoria amb funcions immunològiques i inflamatòries, posant de manifest els efectes directes de la droga sobre el transcriptoma. En la comparació entre l'administració d'MDMA contingent i acoblada es van identificar canvis estadísticament significatius a l'hipocamp i al nucli dorsal del rafe. L'alteració de l'expressió de diversos gens implicats en canvis neuroadaptatius, que podrien estar relacionats amb l'aprenentatge del comportament d'autoadministració, es va poder validar en el nucli dorsal de rafe. En conclusió, el nostre estudi mostra un fort efecte de l'administració d'MDMA sobre l'expressió de gens immunològics i inflamatoris a les quatre regions cerebrals estudiades. A més, els experiments d'autoadministració d'MDMA suggereixen que el nucli dorsal de rafe podria estar involucrat en el comportament de cerca activa d'MDMA i identifiquen alteracions en l'expressió gènica que recolzen el potencial addictiu d'aquesta droga.

##### REFERÈNCIA

N. Fernàndez-Castillo\*, M.J. Orejarena\*, M. Ribasés, M. Casas, P. Robledo, R. Maldonado, B. Cormand. Active and passive MDMA ('ecstasy') intake induces differential transcriptional changes in the mouse brain [manuscrit pendent de segona revisió a la revista *Genes, Brain and Behaviour*] \* Autors amb contribució equivalent a l'article



## ACTIVE AND PASSIVE MDMA (‘ECSTASY’) INTAKE INDUCES DIFFERENTIAL TRANSCRIPTIONAL CHANGES IN THE MOUSE BRAIN

Noelia Fernández-Castillo<sup>1,2,3§</sup>, María Juliana Orejarena<sup>4§</sup>, Marta Ribasés<sup>5,6</sup>, Miquel Casas<sup>5,7</sup>, Patricia Robledo<sup>4,8</sup>, Rafael Maldonado<sup>4\*</sup>, Bru Cormand<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

<sup>2</sup>The Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

<sup>3</sup>Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain

<sup>4</sup>Laboratori de Neurofarmacologia, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, PRBB, Barcelona, Spain.

<sup>5</sup>Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d’Hebron, Barcelona, Spain <sup>6</sup>Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d’Hebron, Barcelona, Spain.

<sup>7</sup>Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>8</sup>Neuropsychopharmacology Program, IMIM (Hospital del Mar Research Institute), PRBB, Barcelona, Spain.

<sup>§</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>\*</sup> These seniors authors contributed equally to this work

### Corresponding author:

Bru Cormand, PhD. Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain. Tel. (+34) 93 4021013; fax (+34) 93 4034420; email: bcormand@ub.edu

**Keywords:** Addiction, MDMA, ecstasy, transcriptomics, mouse brain, gene expression

### ABSTRACT

3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) is a recreational drug widely used by adolescents and young adults. Although its rewarding effects are well established, there is controversy on its addictive potential. We aimed to compare the consequences of active and passive MDMA administration on gene expression in the mouse brain since all previous studies were based on passive MDMA administration. We used a yoked-control operant intravenous self-administration paradigm combined with microarray technology. Transcriptomic profiles of ventral striatum, frontal cortex, dorsal raphe nucleus and hippocampus were analyzed in 27 mice divided in contingent MDMA, yoked MDMA and yoked saline groups, and the observed changes were validated by qRT-PCR. The comparison of contingent MDMA and yoked MDMA versus yoked saline mice allowed identification of differential expression in several genes, most of them with immunological and inflammatory functions, which pinpoints to direct effects of the drug on the brain transcriptome. In the comparison of contingent MDMA versus yoked MDMA administration, hippocampus and the dorsal raphe nucleus showed statistically significant changes. The altered expression of several genes involved in neuroadaptive changes, which may be related to learning self-administration behaviour, could be validated in dorsal raphe nucleus. In conclusion, our study shows a strong effect of MDMA administration

on the expression of immunological and inflammatory genes in all the four brain regions studied. In addition, experiments on MDMA self-administration suggest that the dorsal raphe nucleus may be involved in active MDMA seeking behaviour, and show specific alterations on gene expression that support the addictive potential of this drug.

## INTRODUCTION

3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”) is a recreational drug used around the world by young adults. MDMA induces euphoria and well being in humans (Parrott, 2001), and its rewarding/reinforcing effects have been well established in animal models (Cole & Sumnall, 2003). Although the addictive potential of this substance is still a matter of debate, there is evidence showing that a proportion of MDMA users meet the *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM) criteria for dependence (Cottler *et al.*, 2001; Leung & Cottler, 2008; Stone *et al.*, 2006). MDMA acutely increases brain levels of dopamine (DA), serotonin (5-HT) and noradrenalin in monkeys, rats and mice by potently inhibiting neurotransmitter reuptake mechanisms (Green *et al.*, 2003). Repeated administration of MDMA in humans produces long-term psychiatric disorders, including anxiety and mood alterations, as well as cognitive deficits (Zakzanis *et al.*, 2007), which may be associated with persistent neuroadaptations dependent on changes in gene expression.

Single or repeated administration of MDMA in animals induce changes in gene expression similar to what has been observed following treatment with other psychostimulants such as cocaine, amphetamine or methamphetamine (Hemby, 2006, Yuferov *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2005). Acute administration has been reported to dose-dependently increase the expression of several immediate early genes, such as *c-fos* and *Egr1* in different brain structures (Stephenson *et al.*, 1999; Shirayama *et al.*, 2000). Similarly, the *Rnd3* gene involved in actin cytoskeleton modulation and cell adhesion was up-regulated in the striatum of mice after acute MDMA administration (Marie-Claire *et al.*, 2007). Repeated treatment with MDMA increased *DeltaFosB* expression in mice (Olausson *et al.*, 2006) and induced pronounced alterations in gene expression of glutamate transporters as well as AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid), NMDA (N-methyl D-aspartate) and metabotropic glutamate receptor subunits in different brain regions in rats (Kindlundh-Hogberg *et al.*, 2008). In addition, changes in pro-dynorphin (*Pdyn*) and pro-enkephalin (*Penk*) gene expression have been observed in several brain areas of rats treated either acutely or repeatedly with MDMA (Adams *et al.*, 2005; Di Benedetto *et al.*, 2006). Using microarray technology, alterations in the expression of numerous genes involved in the modulation of signalling pathways, transcription regulators or xenobiotic metabolism have been demonstrated in the frontal cortex of rats following a single MDMA administration (Thiriet *et al.*, 2002). Although these data provide evidence for the effects of non-contingent administration of MDMA on gene expression in the brain, there are no studies available using models of MDMA operant self-administration, which are more relevant to the human pattern of drug consumption. In this sense, the use of a yoked-control

operant intravenous self-administration paradigm coupled with microarray studies have shown different profiles of gene transcript alterations in the nucleus accumbens shell and core comparing contingent versus non-contingent heroin and cocaine administration (Jacobs *et al.*, 2004; Jacobs *et al.*, 2005), which suggests that the learning component associated with active drug-taking is a critical factor affecting changes in gene transcription.

This study was designed to identify changes in gene expression in different brain structures (ventral striatum, frontal cortex, dorsal raphe nucleus and hippocampus) in mice receiving repeated contingent or yoked administration of MDMA in order to better understand the consequences of MDMA consumption and seeking behaviour. These structures are known to mediate different aspects of drug reward and instrumental conditioning (Belin *et al.*, 2009; Ikemoto, 2010), participate in the neurochemical and behavioural effects of MDMA (Cole & Sumnall, 2003) and show gene expression changes following acute (Stephenson *et al.*, 1999; Thiriet *et al.*, 2002) and repeated (Kindlundh-Hogberg *et al.*, 2008; Olausson *et al.*, 2006) non-contingent MDMA administration.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Male C57Bl/6J mice weighing 20–24 g at the beginning of the experiments were initially housed five per cage in a room with controlled temperature ( $21 \pm 1$  °C) and humidity ( $65 \pm 10\%$ ), with a reversed light/dark cycle (lights off from 08:00 to 20:00 hours), and with *ad libitum* food and water. The experiments took place during the dark phase. Behavioural tests and animal care were conducted in accordance with the standard ethical guidelines (National Institutes of Health, 1995; European Communities Directive 86/609 EEC) and approved by the local ethical committee (CEEA-PRBB).

### **Drugs**

MDMA hydrochloride was obtained from Lipomed, A.G. (Arlesheim, Switzerland) and dissolved in sterile 0.9% physiological saline solution.

### **Surgery and self-administration procedure**

Mice were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of a ketamine/xylazine mixture (5:1; 0.10 ml/10 g) and then implanted with an indwelling intravenous (i.v.) silastic catheter in the right jugular vein, as previously described (Orejarena *et al.*, 2009). The animals were pre-treated with ketoprofen 5 mg/kg subcutaneously (s.c.) for post-surgery analgesia. After surgery, the mice were housed individually for the remainder of the experiments. In order to avoid clots and infection, the animals were flushed through the catheter with 0.02 ml of a solution containing heparin (30 UI/ml), cefazoline (50 mg/ml) and sodium chloride (0.09%) for 5 days.

The patency of the catheters was evaluated once a week by the injection of 0.1 ml of thiopental (5 mg/ml). If prominent signs of anaesthesia were not apparent within 3 s of the infusion, the mouse and its corresponding data were removed from the experiment. Three days after surgery, the animals were randomly assigned to either contingent or yoked groups. Contingent mice were trained to self-administer MDMA (0.125 mg/kg/infusion delivered in a volume of 23.5 µl over 2 s) in single daily 3-h sessions. Acquisition of drug self-administration was performed using a fixed ratio 1 (FR1) schedule of reinforcement such that one nose poke in the active hole resulted in one MDMA infusion, while nose poking in the inactive hole had no programmed consequences. As previously reported (Orejarena *et al.*, 2009), mice had to achieve all of the following conditions to be included in the analysis: (i) less than 20% deviation from the mean of the total number of infusions earned in three consecutive sessions (80% stability), (ii) at least 65% responses at the active hole, and (iii) a minimum of five infusions earned per session. Each contingent mouse was connected to two yoked mice; one receiving an identical dose of MDMA (yoked MDMA) and the other a saline solution (yoked saline). When a contingent mouse had a failed catheter or did not meet the acquisition criteria, the corresponding yoked mice were discarded from the study. A light stimulus, located above the active hole, was paired with the delivery of the drug or saline according to the response of the contingent mouse. To avoid interference by acute transcriptional changes, animals were sacrificed by cervical dislocation eight hours after the last exposure to the self-administration boxes. The brains were quickly removed, and the following brain areas were dissected according to Franklin and Paxinos (Franklin & Paxinos, 1997): ventral striatum, frontal cortex, dorsal raphe nucleus and hippocampus. Brain tissues were then frozen by immersion in 2-methylbutane surrounded by dry ice, and stored at -80 °C for later quantification of gene expression.

### **RNA isolation and microarray hybridization**

Twenty-seven mice (9 animals per group of contingent MDMA, yoked MDMA and yoked saline) and four brain areas (ventral striatum, frontal cortex, dorsal raphe nucleus and hippocampus) were used in the expression microarray study. Three pools consisting of three mice per pool were used for each experimental group. The pools were organized to homogenize the average number of nose pokes in the different pools. The pooled individuals were the same for all brain regions. The frontal cortex and dorsal raphe nuclei tissue samples belonging to the same pool were pooled before RNA extraction to optimize the yielding of the isolation, given the limited tissue size. In contrast, for the hippocampus and ventral striatum, which are larger brain structures, RNA was isolated separately from each animal and then pooled for the array hybridization. Samples from all tissues were homogenized using the TissueRuptor system (Qiagen. Düsseldorf, Germany) and total RNA was isolated using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen. Düsseldorf, Germany) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was determined using the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies. Wilmington, DE, USA) and integrity was evaluated using the Bioanalyzer 2100 platform (Agilent Technologies. Santa Clara, CA, USA). RNA samples were stored at -80°C until analyzed. For the microarray experiment, we used the GeneChip® Mouse Expression Set



430 array (Affymetrix. Santa Clara, CA, USA), which contains probes that cover over 39,000 transcripts and variants from over 34,000 genes. A total of 36 chips were used: three pools of three individuals per condition (contingent, MDMA, yoked MDMA and yoked saline) and four brain areas. Two  $\mu\text{g}$  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 (Molecular Devices, Inc. Sunnyvale, CA, USA) and raw data were obtained using the GenePix Pro 4.0 (Molecular Devices. Sunnyvale, CA, USA) and GCOS softwares (Affymetrix. Santa Clara, CA, USA).

### **Quantitative RT-PCR**

To confirm the most relevant results obtained in the microarray study, total RNA from the four brain regions of contingent MDMA, yoked MDMA and yoked saline mice was reverse-transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems. Foster city, CA, USA). For this experiment, we used the same pools that were previously subjected to hybridization with the arrays. The Mouse Endogenous Control Array (Applied Biosystems. Foster city, CA, USA) was used to select endogenous controls. Real Time-PCR experiments were performed for 15 genes using the LightCycler 480 II system and the Universal Probe Library (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Gene assays were designed using the Universal ProbeLibrary Assay Design Center software (Roche Applied Science, [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com)). Sequence of the primers and probes used are available upon request. Beta-actin (*Actb*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) were used to normalize the relative amounts of mRNA.

### **Statistical and bioinformatic analyses**

The self-administration behavioural data were analyzed using a three-way repeated measures ANOVA with group as a between subject factor and hole and day as within subjects factors followed by post-hoc tests for individual comparisons when appropriate. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ .

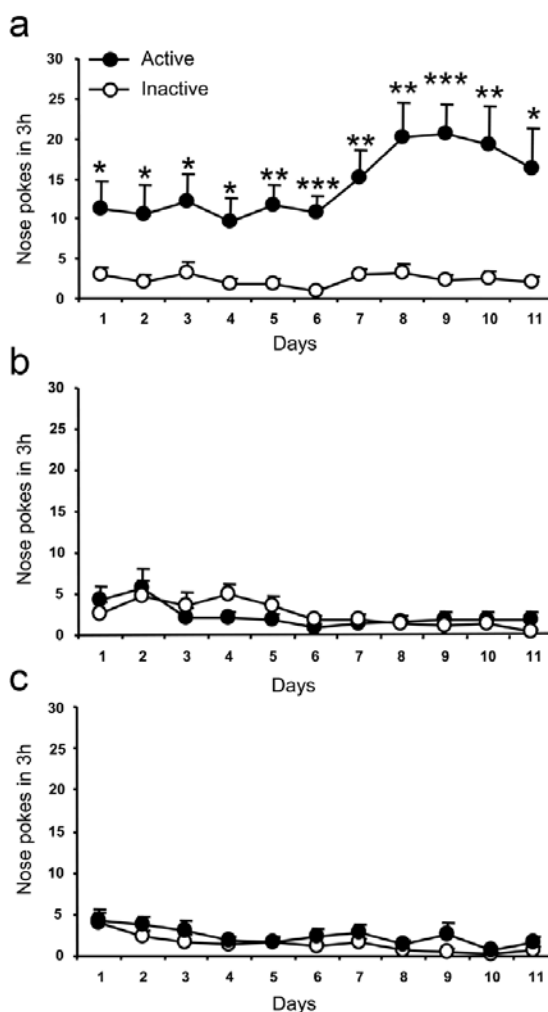
For the microarray data, we used the Bioconductor software for R environment and the *affy* library ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)) (Gentleman *et al.*, 2004). The quality assessment of the chips was performed using the *affyPLM* library. Background correction, normalization and summarization were performed using the background method, Robust Multichip Average (RMA) (Irizarry *et al.*, 2003) and the median-polish method, respectively. For gene filtering we discarded those probes that did not correspond to known genes and considered a threshold of  $\log_2(60)$  for signal filtering and an interquartile range (IQR) > 25% for variability filtering. The IQR method discards genes showing low expression variance among arrays without considering the comparisons performed, and is described to increase statistical power (Hackstadt & Hess, 2009). The Linear Modeling for Microarray Analysis (LIMMA) package (Smyth, 2004) was used for class comparison, by which we compared the expression patterns of the pairs contingent MDMA-yoked MDMA, contingent MDMA-yoked saline, and yoked MDMA-yoked saline.

Correction for multiple testing was achieved by adjusting the p-value with a False Discovery Rate (FDR) of 5%. Functional group over-representation analysis of genes with significant differential expression was performed using the DAVID Annotation Tool (david.abcc.ncifcrf.gov) (Dennis *et al.*, 2003) and was supported by literature searches.

Gene expression networks were constructed using the Ingenuity Pathway Analysis 8.8 software (Ingenuity Systems, Redwood city, CA, USA). To assess the direct effect of the drug, genes differentially expressed in both the contingent MDMA-yoked saline and the yoked MDMA-yoked saline comparisons (after 5% FDR) were considered in ventral striatum, frontal cortex, dorsal raphe nucleus and hippocampus. To evaluate drug reinforced learning, gene networks were performed considering genes differentially expressed in the comparisons of contingent MDMA-yoked MDMA and contingent MDMA-yoked saline in hippocampus and in dorsal raphe nucleus (after 15% FDR). This software estimates a score, calculated with the right-tailed Fisher's Exact Test, based on the probability of finding the observed number of differentially expressed genes in a given network by chance.

The identification of over-represented transcription factor binding sites in the different sets of differentially expressed genes was performed using Single Site Analysis with the oPOSSUM 2.0 software ([www.cisreg.ca/cgi-bin/oPOSSUM/oPOSSUM](http://www.cisreg.ca/cgi-bin/oPOSSUM/oPOSSUM)) (Ho Sui *et al.*, 2005) using default parameters and sorting the results by Z-score.

In the quantitative RT-PCR experiments, gene expression changes for each comparison were evaluated using a U-Mann-Whitney non-parametric test, and statistical significance was set at  $p < 0.05$ .



**Figure 1: Operant yoked-control responding for intravenous infusions of MDMA (0.125 mg/kg/infusion).** (a) The contingent group received an infusion of MDMA with every active nose-poke ( $n = 9$ ), (b) the yoked MDMA group received an MDMA infusion everytime the contingent mouse made an active nose-poke ( $n = 9$ ), (c) the yoked saline group received a saline infusion everytime the contingent mouse made an active nose-poke ( $n = 9$ ). The data represent means + SEM active and inactive nose-pokes in 3 h sessions during the acquisition period. The asterisks denote significant differences between active and inactive nose-pokes for each training day. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  (one-way ANOVA).

## RESULTS

### ***MDMA self-administration***

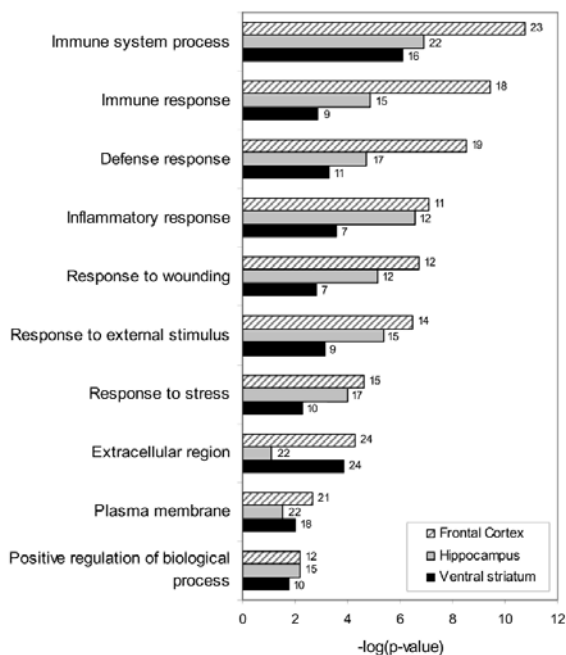
The average number of active and inactive nose pokes carried out by contingent mice trained to self-administer MDMA (0.125 mg/kg per infusion) as well as for yoked MDMA and yoked saline mice is shown in Figure 1. Seventy percent of the contingent mice met all the acquisition criteria within a short time period ( $8 \pm 0.76$  days), and showed a mean cumulative intake of  $19.7 \pm 1.62$  mg/kg of MDMA during the entire training period. Saline- or MDMA-yoked animals did not discriminate between holes on any of the training sessions. Eleven training sessions were performed until all contingent mice reliably acquired MDMA self-administration behaviour. Three-way repeated measures ANOVA comparing responses in the active and inactive holes for all groups during the entire testing period revealed a significant main effect of group [ $F(2,24) = 80.600, p < 0.001$ ], a significant main effect of hole [ $F(1,24) = 77.770, p < 0.001$ ], a significant group x hole interaction [ $F(2,24) = 77.498, p < 0.001$ ], and a significant group x day interaction [ $F(20,240) = 1.969, p < 0.01$ ]. Subsequent Bonferroni post-hoc analysis revealed significant differences between contingent mice versus both yoked groups ( $p < 0.001$ ). Discrimination between holes was significant only in the contingent MDMA group from day 1 through day 11 (Table S1).

### ***MDMA-induced transcriptional changes***

To assess possible transcriptional changes caused by active or passive MDMA administration, gene expression profiles in the four brain areas (ventral striatum, frontal cortex, dorsal raphe nucleus and hippocampus) from contingent MDMA, yoked MDMA and yoked saline mice were compared between the three possible pairs of experimental situations using microarray technology. This study design allowed to identify genes modulated by the direct pharmacological effect of MDMA on the brain (those differentially expressed in both the contingent MDMA-yoked saline and yoked MDMA-yoked saline comparisons) as well as genes involved in the cognitive processes related to active MDMA self-administration (those differentially expressed in the contingent MDMA-yoked MDMA comparison and in the contingent MDMA-yoked saline comparison).

#### *Active and passive MDMA administration versus saline: direct effect of the drug*

When gene expression levels were compared between yoked MDMA and yoked saline mice, significant differences (5% FDR) were observed in the four brain structures studied, ranging from 503 genes in hippocampus to 1340 genes in ventral striatum. Some of these particular genes were also identified in the comparison of contingent MDMA versus yoked saline, ranging from 16 in dorsal raphe nucleus to 192 in hippocampus (Supplementary Fig. 1a, Tables S2-S5). Genes identified in the two comparisons were analyzed for functional group over-representation using the DAVID database (except from raphe, due to the low number of common positive genes in the two comparisons), and similar clusters were obtained in all brain regions, the most significant ones being those involved in immune or inflammatory response, as well as in



**Figure 2: Top ten of the most significant overrepresented biological categories that showed differential expression after exposure to MDMA (contingent MDMA and yoked MDMA mice versus yoked saline).** The number of positive genes included in each category is indicated on the right side of each bar. Biological categories correspond to the following Gene Ontology (GO) terms: GO:0002376 (immune system process), GO:0006955 (immune response), GO:0006952 (defense response), GO:0006954 (inflammatory response), GO:0009611 (response to wounding), GO:0009605 (response to external stimulus), GO:0006950 (response to stress), GO:0005576 (extracellular region), GO:0005886 (plasma membrane) and GO:0048518 (positive regulation of biological process).

response to wounding or to stress (Fig. 2-3).

The construction of interaction networks for the common positive genes in the two comparisons revealed gene networks of inflammatory and immune response as the best scored in all four brain regions (Supplementary Fig. 2-3). Interestingly, all the identified networks included the *Lcn2* gene, which showed a dramatic differential expression in all regions, as well as *Tgtp* (frontal cortex and hippocampus; Supplementary Fig. 3a and 3b, respectively). The analysis of overrepresentation of transcription factor binding sites could not identify a common transcription factor for all brain regions (data not shown).

Based on their function, we chose 10 genes among those that were differentially expressed in the two comparisons, with a Log Fold Change over 1.5 or below -1.5 (difference in expression over 2.8-fold) for further validation: seven genes related to immunological functions (*Lcn2*, that was differentially expressed in all four brain regions, and *Ctla2a*, *Gbp2*, *Igtp*, *ligp1*, *ligp2* and *Tgtp*, that were identified in hippocampus and frontal cortex) and three genes involved in neurological processes (*Sgk1* and *Sgk3* in dorsal raphe nucleus and *Slc17a7* in ventral striatum) (Table 1). QRT-PCR experiments validated the results of the microarray analysis, confirming the overexpression of these genes caused by active and passive MDMA intake in these particular brain structures, with the exception of differences in *Sgk3* and *ligp2* that were not confirmed in the dorsal raphe nucleus and in hippocampus, respectively (Table 1).

#### *Contingent MDMA self administration versus yoked MDMA: drug reinforced learning*

The contingent MDMA versus yoked MDMA comparison displayed significant (5% FDR) gene expression differences only in hippocampus (n = 945) and dorsal raphe nucleus (n = 1) (Supplementary Fig. 1a). Among them, 537 genes were also identified when we compared

**Table 1:** Direct pharmacological effect of MDMA: qRT-PCR validation of microarray data of genes showing a Log Fold Change over 1.5

Gene Symbol	Gene name	Ave Expr <sup>a</sup>	Contingent-MDMA vs Yoked-Saline			Yoked-MDMA vs Yoked-Saline		
			Microarray		qRT-PCR	Microarray		qRT-PCR
			Fold Change	P-value (Adj P-value)	Fold Change	Fold Change	P-value (Adj P-value)	Fold Change
<b>Frontal Cortex</b>								
<i>Lcn2</i>	Lipocalin 2	8.8		5.5 e-8 (3 e-4)			4.7 e-8 (2.5 e-4)	
<i>Ctla2a</i> <sup>c</sup>	Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2	8.8		8.5 e-4 (0.04)			3.7 e-5 (8 e-3)	
<i>Gbp2</i> <sup>c</sup>	Guanylate binding protein 2	8.7		2.5 e-4 (0.03)			3.3 e-4 (0.01)	
<i>Igtp</i>	Interferon gamma Induced GTPase	8.4		3.7 e-4 (0.04)			5 e-4 (0.02)	
<i>Igtp1</i> <sup>c</sup>	Interferon inducible GTPase 1	7.1		2.1 e-4 (0.03)			1 e-4 (0.01)	
<i>Igtp2</i>	Interferon inducible GTPase 2	7.4		1.9 e-4 (0.03)			3 e-4 (0.02)	
<i>Tgtp</i>	T-cell specific GTPase	9.2		1.2 e-4 (0.03)			6.7 e-5 (9.2 e-3)	
<b>Hippocampus</b>								
<i>Lcn2</i>	Lipocalin 2	8.5		1.7 e-6 (4 e-3)			7 e-7 (1.6 e-3)	
<i>Ctla2a</i> <sup>c</sup>	Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2	8.2		1.5 e-3 (0.01)			9.6 e-5 (0.01)	
<i>Gbp2</i> <sup>c</sup>	Guanylate binding protein 2	8.0		4 e-3 (0.02)			5 e-3 (0.03)	
<i>Igtp</i>	Interferon gamma Induced GTPase	8.5		4.8 e-3 (0.02)			4.3 e-3 (0.03)	
<i>Igtp1</i> <sup>c</sup>	Interferon inducible GTPase 1	7.0		0.01 (0.04)			6 e-3 (0.04)	
<i>Igtp2</i>	Interferon inducible GTPase 2	7.3		3.7 e-3 (0.02)	N		4.9 e-3 (0.03)	N
<i>Tgtp</i>	T-cell specific GTPase	9.2		1.6 e-3 (0.01)			1.1 e-3 (0.02)	
<b>Dorsal Raphe Nucleus</b>								
<i>Lcn2</i>	Lipocalin 2	8.7		2.7 e-6 (8 e-3)			5 e-7 (7 e-4)	
<i>Sgk1</i>	Serum/glucocorticoid regulated kinase 1	10.8		1.3 e-5 (0.01)			1.6 e-6 (1.4 e-3)	
<i>Sgk3</i> <sup>c</sup>	Serum/glucocorticoid regulated kinase 3	8.6		0.01 (0.09)	N		5.3 e-4 (9 e-3)	
<b>Ventral Striatum</b>								
<i>Lcn2</i>	Lipocalin 2	8.1		1.6 e-7 (3.8 e-4)			9.5 e-8 (2.2 e-4)	
<i>Slc17a7</i>	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter)	8.1		6.9 e-4 (0.04)			7.2 e-4 (7.4 e-3)	

<sup>a</sup> Ave Expr: Average log<sub>2</sub>-expression for the gene probe over all arrays and channels.

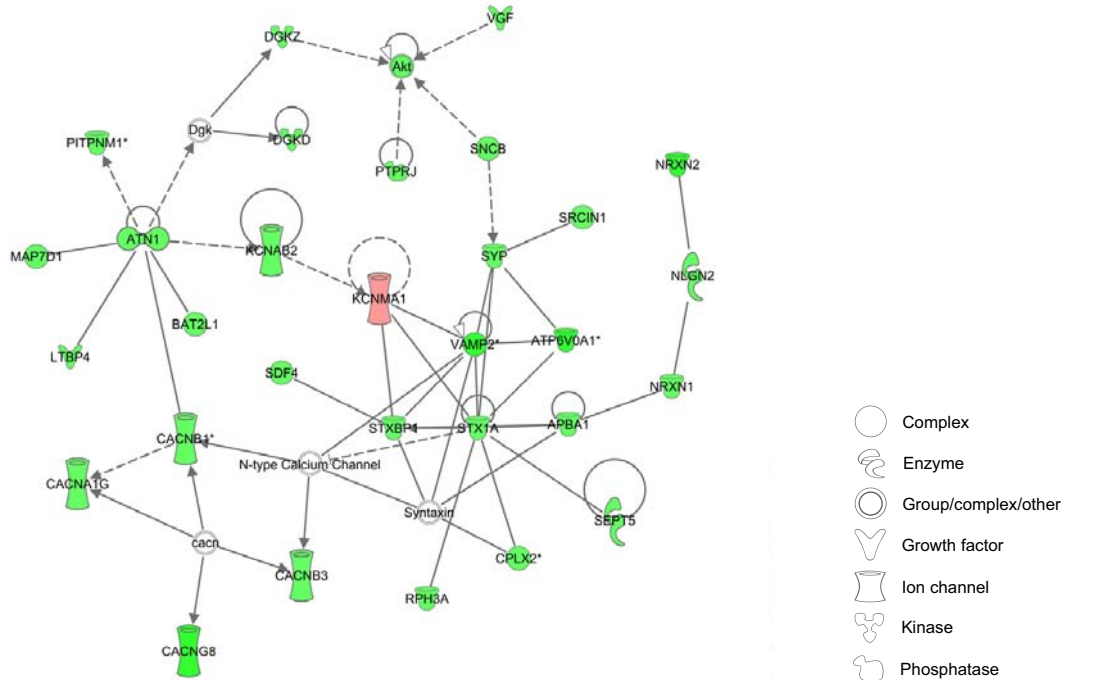
<sup>b</sup> p-value < 0.05; normalized to *Actb*

<sup>c</sup> Genes showing significant differential expression in two independent probe sets. The smallest absolute fold change is shown.

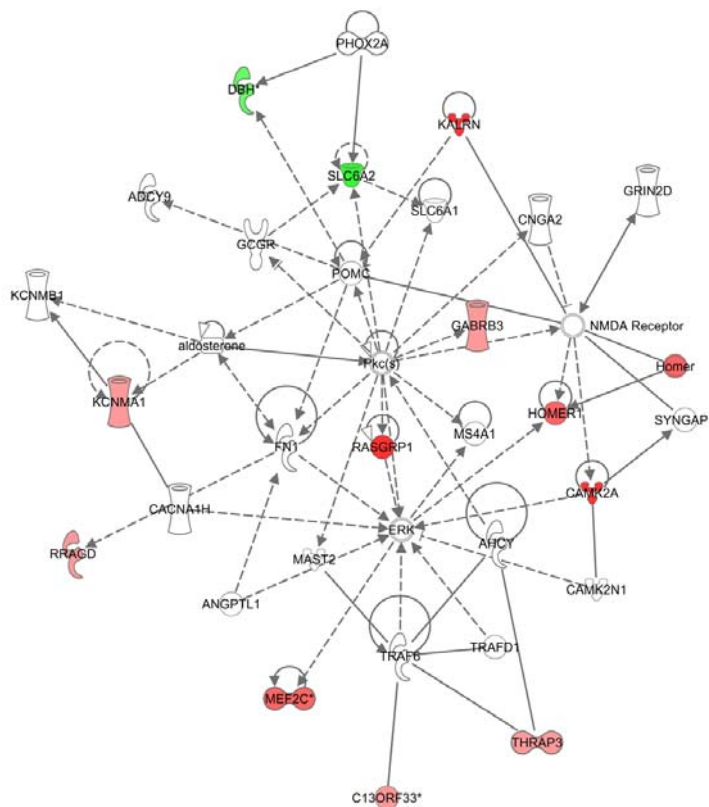
NS, not significant

hippocampus of contingent MDMA and yoked saline mice and, thus, were assumed to be more consistent (Table S6). Functional clustering performed with the DAVID database targeted some interesting neurological functions, such as synapse, synaptosome, neurotransmitter secretion, regulation of neurotransmitter levels, nervous system development, neuron projection, axonogenesis, axon guidance, dendrite, neurite morphogenesis, neuron morphogenesis, neuron differentiation and learning and memory (Table S7). However, none of these 537 genes displayed a Log Fold Change over 1 or below -1 (differential expression greater than 2-fold) (Supplementary Fig. 1b, Table S6), low values that discouraged further validation by qRT-PCR. For this reason, we changed the significance threshold to a less restrictive FDR value (from 5% to 15%) and the number of genes showing differential expression in both comparisons increased from 537 to 706: 61 in the dorsal raphe nucleus (Table S8), 645 in hippocampus and none in the frontal cortex nor in the ventral striatum. Among them, only four genes (*Camk2a*, *Kalrn*, *Ddn* and *Egr3*; Table 2) displayed a Log Fold Change over 1.5 or below -1.5 in the contingent MDMA

**A**



**B**



**Figure 3: Gene network graphical representation of interaction between differentially expressed genes after MDMA reinforced learning (contingent MDMA versus yoked MDMA and yoked saline mice).** The best scored gene network in (a) hippocampus and in (b) dorsal raphe nucleus includes genes involved both in cell-to-cell signaling and interaction as well as in nervous system development functions. Genes differentially expressed in the two comparisons in the same direction are represented as nodes depicted in red (up-regulated) or green (down-regulated) and biological relationship between two nodes is represented with a solid or dashed line (indicating direct or indirect interaction, respectively). Each node is displayed with different shapes that indicate the functional class of the gene product shown on the right. Modulatory effects on expression are indicated by arrows.

versus yoked MDMA comparison. Interestingly, these genes are involved in neuroadaptation and synaptic plasticity. All four genes were overexpressed in the dorsal raphe nucleus of contingent mice and the differential expression in this brain structure was validated by qRT-PCR (Table 2).

Gene network construction on all the genes showing differential expression at 15% FDR revealed that the best scored network in hippocampus (score = 47; Fig. 3a) involves cell-to-cell signalling and interaction/nervous system development and function, including some interesting genes, such as *Syp*, *Stxbp1*, *Cplx2*, *Vamp2*, *Ngln2*, *Nrxn1* and *Nrxn2*, involved in synaptic vesicle fusion, synapsis formation and neurotransmitter release. Interestingly, the best scored network in dorsal raphe nucleus considering 15% FDR (score = 26; Fig. 3b) also includes genes involved in cell-to-cell signalling, interaction/nervous system development and function and behavior, such as *Camk2a* and *Kalrn* (both with a differential expression validated by qRT-PCR).

Over-representation of transcription factor binding sites analysis in hippocampus and dorsal raphe nucleus showed no common regulatory mechanisms. The best scored prediction in hippocampus pointed at the transcription factor Mzf1\_1-4 (Z-score = 68.75) and at Pdx1 in dorsal raphe nucleus (Z-score = 16.64), both predicting binding sites of these transcription factors in more than 90% of the differentially expressed genes. The four genes whose differential expression was validated by qRT-PCR (*Camk2a*, *Kalrn*, *Ddn* and *Egr3*) have predicted binding sites for Pdx1.

**Table 2:** Effect of active MDMA self-administration: qRT-PCR validation of microarray data of four genes showing a Log Fold Change of  $\pm 1.5$  in dorsal raphe nucleus

Gene Symbol	Gene name	Ave Expr <sup>a</sup>	Contingent-MDMA vs Yoked-MDMA		Contingent-MDMA vs Yoked-Saline		
			Microarray		qRT-PCR		
			Fold Change	P-value (Adj P value)	Fold Change	P-value (Adj P value)	
<i>Camk2a</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	7.1		0.01 (0.11)		0.02 (0.12)	N
<i>Kalrn</i>	Kalirin, Rho GEF kinase	7.8		4 e-3 (0.10)		2.3 e-3 (0.06)	N
<i>Ddn</i>	Dendrin	7.1		8 e-3 (0.11)		0.01 (0.09)	
<i>Egr3</i>	Early growth response 3	5.4		5 e-4 (0.09)		1.5 e-3 (0.06)	

<sup>a</sup> Ave Expr: Average log<sub>2</sub>-expression for the gene probe over all arrays and channels.

<sup>b</sup> p<0.05; normalized to *Actb*

<sup>c</sup> Genes showing significant differential expression in two independent probe sets. The smallest absolute fold change is shown.

NS, not significant.

## DISCUSSION

The aim of the present study was to identify alterations in brain gene expression due to the pharmacological effect of MDMA administration, as well as neuroadaptive changes underlying the learning process associated with operant MDMA self-administration. For that purpose, we have validated a new operant paradigm consisting in master mice that are trained to acquire a stable operant behaviour to self-administer a reinforcing dose of MDMA (Orejarena *et al.*, 2009). Each master mouse is connected to an MDMA yoked animal that passively receives an identical dose of MDMA and to another yoked mouse that receives saline infusions. This yoked-control operant intravenous self-administration paradigm was combined with microarray technology. The results of this experimental design suggested that (i) MDMA modulates the expression of genes involved in inflammatory and immune response in different brain areas; and (ii) the dorsal raphe nucleus may participate in the neuroadaptive changes leading to active MDMA seeking behaviour.

Changes in gene expression relevant to the direct effects of the drug were evaluated by comparing the contingent MDMA and the yoked MDMA mice to the yoked saline mice. In this case, most of the hits corresponded to genes involved in immunological or inflammatory response. Among them, we identified a strong overexpression of *Lcn2* in all the brain regions, which was also present in all the best scored gene networks identified. The *Lcn2* gene encodes lipocalin2 that mediates astrocytosis under inflammatory conditions and is induced after chronic or thermal stress in brain reward regions (Krishnan *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2009, Roudkenar *et al.*, 2009). We also validated the overexpression of other genes (*Ctla2a*, *Gbp2*, *Igtp*, *Igp1*, *Igp2* and *Tgtp*) both in hippocampus and in frontal cortex. All of them, except for *Ctla2a*, are genes coding for GTPases that are induced by type II interferon (INF- $\gamma$ ) (Carlow *et al.*, 1998; Miyairi *et al.*, 2007; Vestal *et al.*, 1998; Yamada *et al.*, 2009; Zerrahn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003), and are involved in some cellular processes mediating interferon control of immune and inflammatory responses. The *Ctla2a* gene encodes the cytotoxic T lymphocyte antigen-2 alpha protein which is a cysteine proteinase inhibitor protein initially discovered in mouse activated T-cells and mast cells (Denizot *et al.*, 1989). A recent study described a dendritic and axonal localization for this protein in the mouse brain (Luziga *et al.*, 2008) and a possible role in neuronal function. Our results showing that repeated MDMA administration produces generalized changes in the expression of genes related to inflammatory and immunological responses are in accordance with previous evidence demonstrating that exposure to MDMA disrupts the immune system (Connor, 2004), which may contribute to its neurotoxic effects (Torres *et al.*, 2010). Our results differ from previous data obtained after acute MDMA exposure in murine models, where mainly serotonin receptors, transcription factors, cytoskeletal, cell adhesion and metabolic genes were differentially expressed in cortical areas or in the striatum (Thiriet *et al.*, 2002; Marie-Claire *et al.*, 2007).

Another direct consequence of the exposure to MDMA was the upregulation of genes involved



in neuroadaptations and synaptic plasticity, including the *Sgk1*, *Sgk3* and *Slc17a7* genes. *Sgk1* and *Sgk3*, which encode the serum/glucocorticoid regulated kinase 1 and 3, respectively, were identified in the dorsal raphe nucleus, composed mainly by serotonergic neurons. Both have been described to be involved in memory consolidation in hippocampus (Von Herten & Giese, 2005) and regulate glutamatergic neurotransmission (Boehmer *et al.*, 2003a, Boehmer *et al.*, 2003b, Boehmer *et al.*, 2006, Boehmer *et al.*, 2005, Strutz-Seebohm *et al.*, 2005a, Strutz-Seebohm *et al.*, 2005b). In addition, *Sgk1* increases neurite formation and dendrite growth in spinal cord and hippocampal neurons (David *et al.*, 2005, Yang *et al.*, 2006). Although these functions have been described in hippocampus and are related to the glutamatergic neurotransmission, they may also occur in other cell types, such as serotonergic neurons. Interestingly, *Slc17a7*, encoding the vesicular glutamate transporter 1 (Vglut1), was upregulated in ventral striatum. Vglut1 is involved in synaptic plasticity and plays an important role in excitatory transmission (Fremeau *et al.*, 2004). In this regard, our findings are consistent with a recent study showing gene expression changes in several glutamine transporters and receptors after repeated MDMA administration (Kindlundh-Hogberg *et al.*, 2008). Although the ventral striatum is mainly formed by GABAergic neurons, it contains glutamatergic afferences, and overexpression of Vglut1 may be localized in glutamatergic axons after axonal transport of the corresponding mRNA molecules followed by translation *in situ* as previously described (Donnelly *et al.*, 2010; Wei, 2011). In order to evaluate gene expression changes related to the learning component of the operant task to obtain MDMA infusions, we compared brain expression profiles of contingent MDMA versus yoked MDMA mice. The highest number of statistically significant changes in gene expression at 5% FDR was observed in the hippocampus, with a single hit in the dorsal raphe nucleus. Although in our experimental conditions these changes were too subtle to be validated by qRT-PCR, our results support the crucial role of the hippocampus in the control of memory and cognitive functions. These results are also in agreement with previous studies showing that cocaine-induced conditioned place preference (CPP) depends on molecular changes that occur in the hippocampus of trained rats (Krasnova *et al.*, 2008, Tzschentke, 1998).

When we used a less restrictive 15% FDR threshold, several additional genes showed differential expression in hippocampus and in dorsal raphe nucleus and we identified common gene networks in the two structures. Analysis of over-representation of transcription binding sites could not identify a common mechanism regulating transcription in active MDMA self-administration in both brain regions. The dorsal raphe nucleus was the only brain region in the comparison of contingent MDMA versus yoked MDMA groups with differentially expressed genes in the microarray experiments that could be further validated by qRT-PCR, including *Camk2a*, *Kalrn*, *Ddn* and *Egr3*. Interestingly, recent evidence suggests that this structure is involved in encoding reward-related aspects of motivated behaviour (Bromberg-Martin *et al.*, 2010, Nakamura *et al.*, 2008), and although none of the validated genes were statistically significant under 5% FDR in the initial microarray study, all four indeed passed a less restricting FDR threshold of 11% (Table 2). The *Camk2a* gene encodes the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent

protein kinase II alpha (CaMKIIalpha), which mediates activity-dependent synaptic plasticity. A recent study demonstrated its essential role in dendritic spine enlargement, long-term potentiation and learning (Yamagata *et al.*, 2009). Dendritic spine morphogenesis is also induced by kalirin-7, an isoform encoded by the *Kalrn* gene (Penzes & Jones, 2008). In addition, another study links these two proteins with the same signalling pathway that controls functional and structural spine plasticity (Xie *et al.*, 2007). In this regard, the NMDA glutamate receptor activation in pyramidal neurons causes CaMKII-dependent phosphorylation of kalirin-7 leading to a rapid enlargement of existing spines. Kalirin is also involved in neurite outgrowth through the nerve growth factor (NGF) signalling pathway (Chakrabarti *et al.*, 2005). In addition, we identified these two genes in the best scored network in dorsal raphe nucleus, in which the ras-dependent protein kinase ERK is a central node (Fig. 3b). This is in agreement with a previous study supporting the role of the ERK pathway in the development of addiction-like properties of MDMA (Salzmann *et al.*, 2003). On the other hand, the *Ddn* gene encodes a dendritically localized mRNA that is translated to the protein dendrin, potentially involved in neuroplasticity events and modulation of post-synaptic cytoskeleton (Kremerskothen *et al.*, 2006). In addition, *Egr3* is a member of the *Egr* gene family, a group of synaptic activity-inducible immediate early genes involved in neuroplasticity related to memory and learning (Guzowski, 2002, Li *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2007). Interestingly, the best characterized gene of the family is *Egr1*, and its expression is increased by MDMA in rat prefrontal cortex, striatum and hippocampal dentate gyrus (Shirayama *et al.*, 2000). Our results may suggest a role for dorsal raphe nucleus in the motivational and learning processes needed to actively self-administer MDMA since it is the only brain region, besides hippocampus, showing several statistically significant changes in the comparison of contingent MDMA versus yoked MDMA mice. In addition, the best scored gene network identified common functions within this brain region and hippocampus, with genes involved in cell-to-cell signaling and nervous system development functions. And finally, validated genes that are upregulated in the dorsal raphe nucleus are involved in neuroplasticity and neuron remodelling.

In conclusion, using the yoked-control operant intravenous self-administration paradigm, which is the most relevant animal model to study the addictive potential of drugs of abuse in humans, we showed that repeated exposure to MDMA induces the expression of genes related to inflammatory and immunological responses in several brain structures including the ventral striatum, frontal cortex, dorsal raphe nucleus and hippocampus. In addition, the gene expression changes identified in the dorsal raphe nucleus following MDMA self-administration suggest that this brain region may be involved in motivated learning associated with active MDMA seeking behaviour. However, due to sample size limitation, as we evaluated 9 mice per condition in pools of three animals of contingent MDMA, yoked-MDMA and yoked-saline, further studies should be performed in order to confirm these results.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Spanish “Ministerio de Ciencia e Innovación” (SAF2007-64062), “Instituto

de Salud Carlos III” (RD06/001/001 and PI070709), the Catalan Government (SGR2009-00131 and SGR2009-00971), the ICREA Foundation (ICREA Academia-2008), “Plan Nacional Sobre Drogas” (PNSD#2009/022 and PNSD#2009/026) and the DG Research of the European Commission (GENADDICT, LSHM-CT-2004-05166; and PHECOMP, LSHM-CT-2007-037669). Partial support from FEDER funds is also acknowledged. MR is a recipient of a Miguel de Servet contract from “Instituto de Salud Carlos III”. These institutions had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

## REFERENCES

- Adams, D.H., Hanson, G.R. & Keefe, K.A. (2005) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine increases neuropeptide messenger RNA expression in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* **133**, 131-142.
- Belin D, Jonkman S, Dickinson A, Robbins TW, Everitt BJ. (2009) Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. *Behav Brain Res* **199**, 89-102.
- Boehmer, C., Henke, G., Schniepp, R., Palmada, M., Rothstein, J.D., Broer, S. & Lang, F. (2003a) Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J Neurochem* **86**, 1181-1188.
- Boehmer, C., Okur, F., Setiawan, I., Broer, S. & Lang, F. (2003b) Properties and regulation of glutamine transporter SN1 by protein kinases SGK and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 156-162.
- Boehmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Schniepp, R., Amara, S. & Lang, F. (2006) Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J Neurochem* **97**, 911-921.
- Boehmer, C., Rajamanickam, J., Schniepp, R., Kohler, K., Wulff, P., Kuhl, D., Palmada, M. & Lang, F. (2005) Regulation of the excitatory amino acid transporter EAAT5 by the serum and glucocorticoid dependent kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 738-742.
- Bromberg-Martin, E.S., Hikosaka, O. & Nakamura, K. (2010) Coding of task reward value in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* **30**, 6262-6272.
- Carlow, D.A., Teh, S.J. & Teh, H.S. (1998) Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J Immunol* **161**, 2348-2355.
- Cole, J.C. & Sumnall, H.R. (2003) The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Neurosci Biobehav Rev* **27**, 199-217.
- Connor, T.J. (2004) Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ‘Ecstasy’): a stressor on the immune system. *Immunology* **111**, 357-367.
- Cottler, L.B., Womack, S.B., Compton, W.M. & Ben-Abdallah, A. (2001) Ecstasy abuse and

dependence among adolescents and young adults: applicability and reliability of DSM-IV criteria. *Hum Psychopharmacol* **16**, 599-606.

Chakrabarti, K., Lin, R., Schiller, N.I., Wang, Y., Koubi, D., Fan, Y.X., Rudkin, B.B., Johnson, G.R. & Schiller, M.R. (2005) Critical role for Kalirin in nerve growth factor signaling through TrkA. *Mol Cell Biol* **25**, 5106-5118.

David, S., Stegenga, S.L., Hu, P., Xiong, G., Kerr, E., Becker, K.B., Venkatapathy, S., Warrington, J.A. & Kalb, R.G. (2005) Expression of serum- and glucocorticoid-inducible kinase is regulated in an experience-dependent manner and can cause dendrite growth. *J Neurosci* **25**, 7048-7053.

Denizot, F., Brunet, J.F., Roustan, P., Harper, K., Suzan, M., Luciani, M.F., Mattei, M.G. & Golstein, P. (1989) Novel structures CTLA-2 alpha and CTLA-2 beta expressed in mouse activated T cells and mast cells and homologous to cysteine proteinase proregions. *Eur J Immunol* **19**, 631-635.

Dennis, G., Jr., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C. & Lempicki, R.A. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* **4**, P3.

Di Benedetto, M., D'Addario, C., Candeletti, S. & Romualdi, P. (2006) Chronic and acute effects of 3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine ('Ecstasy') administration on the dynorphinergic system in the rat brain. *Neuroscience* **137**, 187-196.

Donnelly, C.J., Fainzilber, M. & Twiss, J.L. (2010) Subcellular communication through RNA transport and localized protein synthesis. *Traffic* **11**, 1498-1505.

Franklin, K. & Paxinos, G. (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.

Fremeau, R.T., Jr., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A. & Edwards, R.H. (2004) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* **304**, 1815-1819.

Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, A.J., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, J.Y. & Zhang, J. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**, R80.

Green, A.R., Mechan, A.O., Elliott, J.M., O'Shea, E. & Colado, M.I. (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* **55**, 463-508.

Guzowski, J.F. (2002) Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* **12**, 86-104.

Hackstadt, A.J. & Hess, A.M. (2009) Filtering for increased power for microarray data analysis.

*BMC Bioinformatics* **10**, 11.

- Hemby, S.E. (2006) Assessment of genome and proteome profiles in cocaine abuse. *Prog Brain Res* **158**, 173-195.
- Ho Sui, S.J., Mortimer, J.R., Arenillas, D.J., Brumm, J., Walsh, C.J., Kennedy, B.P. & Wasserman, W.W. (2005) oPOSSUM: identification of over-represented transcription factor binding sites in co-expressed genes. *Nucleic Acids Res* **33**, 3154-3164.
- Ikemoto S. (2010) Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev* **35**, 129-150.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. & Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264.
- Jacobs, E.H., de Vries, T.J., Smit, A.B. & Schoffelmeer, A.N. (2004) Gene transcripts selectively down-regulated in the shell of the nucleus accumbens long after heroin self-administration are up-regulated in the core independent of response contingency. *Faseb J* **18**, 200-202.
- Jacobs, E.H., Smit, A.B., de Vries, T.J. & Schoffelmeer, A.N. (2005) Long-term gene expression in the nucleus accumbens following heroin administration is subregion-specific and depends on the nature of drug administration. *Addict Biol* **10**, 91-100.
- Kindlundh-Hogberg, A.M., Blomqvist, A., Malki, R. & Schioth, H.B. (2008) Extensive neuroadaptive changes in cortical gene-transcript expressions of the glutamate system in response to repeated intermittent MDMA administration in adolescent rats. *BMC Neurosci* **9**, 39.
- Krasnova, I.N., Li, S.M., Wood, W.H., McCoy, M.T., Prabhu, V.V., Becker, K.G., Katz, J.L. & Cadet, J.L. (2008) Transcriptional responses to reinforcing effects of cocaine in the rat hippocampus and cortex. *Genes Brain Behav* **7**, 193-202.
- Kremerskothen, J., Kindler, S., Finger, I., Veltel, S. & Barnekow, A. (2006) Postsynaptic recruitment of Dendrin depends on both dendritic mRNA transport and synaptic anchoring. *J Neurochem* **96**, 1659-1666.
- Krishnan, V., Han, M.H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K. & Nestler, E.J. (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* **131**, 391-404.
- Lee, S., Park, J.Y., Lee, W.H., Kim, H., Park, H.C., Mori, K. & Suk, K. (2009) Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrogliosis. *J Neurosci* **29**, 234-249.
- Leung, K.S. & Cottler, L.B. (2008) Ecstasy and other club drugs: a review of recent epidemiologic studies. *Curr Opin Psychiatry* **21**, 234-241.
- Li, L., Carter, J., Gao, X., Whitehead, J. & Tourtellotte, W.G. (2005) The neuroplasticity-associated

arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol* **25**, 10286-10300.

Li, L., Yun, S.H., Keblesh, J., Trommer, B.L., Xiong, H., Radulovic, J. & Tourtellotte, W.G. (2007) Egr3, a synaptic activity regulated transcription factor that is essential for learning and memory. *Mol Cell Neurosci* **35**, 76-88.

Luziga, C., Nakamura, O., Deshapriya, R.M., Usui, M., Miyaji, M., Wakimoto, M., Wada, N., Mbassa, G. & Yamamoto, Y. (2008) Dendritic and axonal localization of cytotoxic T-lymphocyte antigen-2 alpha protein in mouse brain. *Brain Res* **1204**, 40-52.

Marie-Claire, C., Salzmann, J., David, A., Courtin, C., Canestrelli, C. & Noble, F. (2007) Rnd family genes are differentially regulated by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine acute treatment in mice brain. *Brain Res* **1134**, 12-17.

Miyairi, I., Tatireddigari, V.R., Mahdi, O.S., Rose, L.A., Belland, R.J., Lu, L., Williams, R.W. & Byrne, G.I. (2007) The p47 GTPases ligp2 and Irgb10 regulate innate immunity and inflammation to murine Chlamydia psittaci infection. *J Immunol* **179**, 1814-1824.

Nakamura, K., Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2008) Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* **28**, 5331-5343.

Olausson, P., Jentsch, J.D., Tronson, N., Neve, R.L., Nestler, E.J. & Taylor, J.R. (2006) DeltaFosB in the nucleus accumbens regulates food-reinforced instrumental behavior and motivation. *J Neurosci* **26**, 9196-9204.

Orejarena, M.J., Berrendero, F., Maldonado, R. & Robledo, P. (2009) Differential changes in mesolimbic dopamine following contingent and non-contingent MDMA self-administration in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **205**, 457-466.

Parrott, A.C. (2001) Human psychopharmacology of Ecstasy (MDMA): a review of 15 years of empirical research. *Hum Psychopharmacol* **16**, 557-577.

Penzes, P. & Jones, K.A. (2008) Dendritic spine dynamics--a key role for kalirin-7. *Trends Neurosci* **31**, 419-427.

Roudkenar, M.H., Halabian, R., Roushandeh, A.M., Nourani, M.R., Masroori, N., Ebrahimi, M., Nikogoftar, M., Rouhbakhsh, M., Bahmani, P., Najafabadi, A.J. & Shokrgozar, M.A. (2009) Lipocalin 2 regulation by thermal stresses: protective role of Lcn2/NGAL against cold and heat stresses. *Exp Cell Res* **315**, 3140-3151.

Salzmann, J., Marie-Claire, C., Le Guen, S., Roques, B.P. & Noble, F. (2003) Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br J Pharmacol* **140**, 831-838.

Shirayama, Y., Hashimoto, K., Iyo, M., Watanabe, K., Higuchi, T. & Minabe, Y. (2000) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-induced egr-1 mRNA in rat brain: pharmacological manipulation. *Eur J Pharmacol* **402**, 215-222.

Smyth, G.K. (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* **3**, Article3.

- Stephenson, C.P., Hunt, G.E., Topple, A.N. & McGregor, I.S. (1999) The distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine “Ecstasy”-induced c-fos expression in rat brain. *Neuroscience* **92**, 1011-1023.
- Stone, A.L., Storr, C.L. & Anthony, J.C. (2006) Evidence for a hallucinogen dependence syndrome developing soon after onset of hallucinogen use during adolescence. *Int J Methods Psychiatr Res* **15**, 116-130.
- Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G., Mack, A.F., Wagner, H.J., Just, L., Skutella, T., Lang, U.E., Henke, G., Striegel, M., Hollmann, M., Rouach, N., Nicoll, R.A., McCormick, J.A., Wang, J., Pearce, D. & Lang, F. (2005a) Regulation of GluR1 abundance in murine hippocampal neurones by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3. *J Physiol* **565**, 381-390.
- Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G., Shumilina, E., Mack, A.F., Wagner, H.J., Lampert, A., Grahmmer, F., Henke, G., Just, L., Skutella, T., Hollmann, M. & Lang, F. (2005b) Glucocorticoid adrenal steroids and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in the regulation of GluR6 expression. *J Physiol* **565**, 391-401.
- Thiriet, N., Ladenheim, B., McCoy, M.T. & Cadet, J.L. (2002) Analysis of ecstasy (MDMA)-induced transcriptional responses in the rat cortex. *Faseb J* **16**, 1887-1894.
- Torres, E., Gutierrez-Lopez, M.D., Borcel, E., Peraile, I., Mayado, A., O’Shea, E. & Colado, M.I. (2010) Evidence that MDMA (“ecstasy”) increases cannabinoid CB2 receptor expression in microglial cells: role in the neuroinflammatory response in rat brain. *J Neurochem* **113**, 67-78.
- Tzschentke, T.M. (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* **56**, 613-672.
- Vestal, D.J., Buss, J.E., McKercher, S.R., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kelner, G.S., Asundi, V.K. & Maki, R.A. (1998) Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 977-985.
- von Herten, L.S. & Giese, K.P. (2005) Memory reconsolidation engages only a subset of immediate-early genes induced during consolidation. *J Neurosci* **25**, 1935-1942.
- Wei, L.N. (2011) The RNA superhighway: axonal RNA trafficking of kappa opioid receptor mRNA for neurite growth. *Integr Biol (Camb)* **3**, 10-16.
- Xie, Z., Srivastava, D.P., Photowala, H., Kai, L., Cahill, M.E., Woolfrey, K.M., Shum, C.Y., Surmeier, D.J. & Penzes, P. (2007) Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* **56**, 640-656.
- Yamada, K., Akimoto, H., Ogawa, Y., Kinumi, T., Kamagata, Y. & Ohmiya, Y. (2009) Upregulation of immunity-related GTPase (IRG) proteins by TNF-alpha in murine astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 434-439.
- Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Hatanaka, N., Totsuka, M., Yagi, T., Obata, K., Imoto, K., Yanagawa, Y., Manabe, T. &

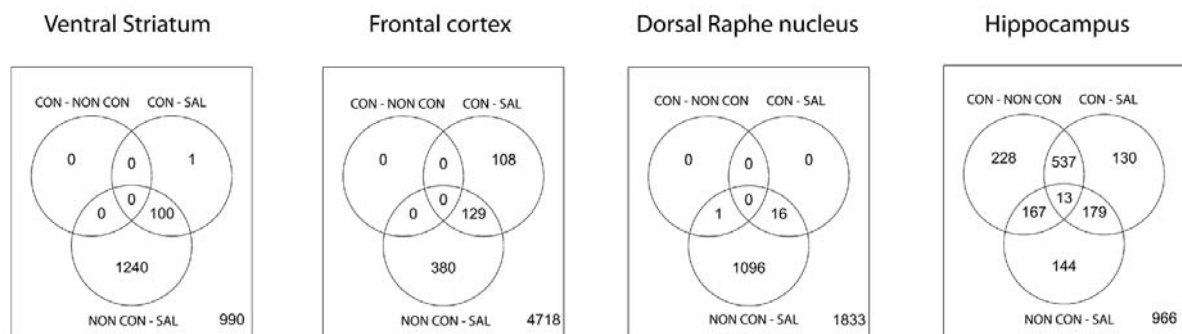
- Okabe, S. (2009) Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning. *J Neurosci* **29**, 7607-7618.
- Yang, Y.C., Lin, C.H. & Lee, E.H. (2006) Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) increases neurite formation through microtubule depolymerization by SGK1 and by SGK1 phosphorylation of tau. *Mol Cell Biol* **26**, 8357-8370.
- Yuferov, V., Nielsen, D., Butelman, E. & Kreek, M.J. (2005) Microarray studies of psychostimulant-induced changes in gene expression. *Addict Biol* **10**, 101-118.
- Zakzanis, K.K., Campbell, Z. & Jovanovski, D. (2007) The neuropsychology of ecstasy (MDMA) use: a quantitative review. *Hum Psychopharmacol* **22**, 427-435.
- Zerrahn, J., Schaible, U.E., Brinkmann, V., Gühlich, U. & Kaufmann, S.H. (2002) The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum-associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J Immunol* **168**, 3428-3436.
- Zhang, D., Zhang, L., Tang, Y., Zhang, Q., Lou, D., Sharp, F.R., Zhang, J. & Xu, M. (2005) Repeated cocaine administration induces gene expression changes through the dopamine D1 receptors. *Neuropsychopharmacology* **30**, 1443-1454.
- Zhang, H.M., Yuan, J., Cheung, P., Luo, H., Yanagawa, B., Chau, D., Stephan-Tozy, N., Wong, B.W., Zhang, J., Wilson, J.E., McManus, B.M. & Yang, D. (2003) Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J Biol Chem* **278**, 33011-33019.



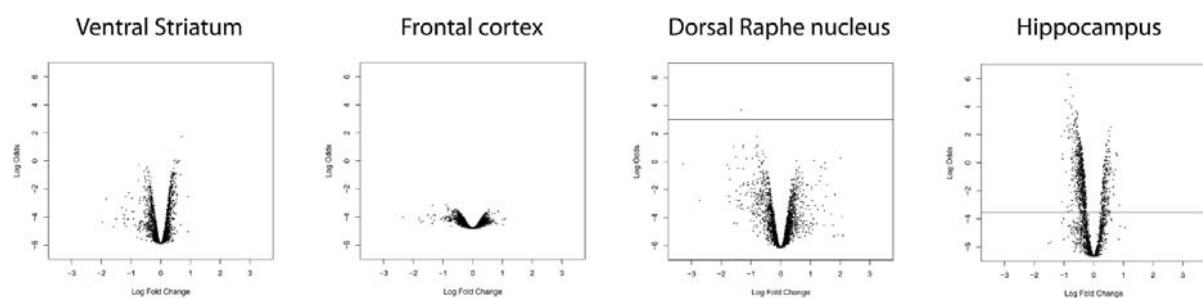
**Table S1:** One-way ANOVA for active versus inactive hole discrimination in contingent mice self-administering MDMA (0.25 mg/kg/inf).

Probe	F- value	p- value
Day 1	$F_{(1,17)} = 6.010$	<0.05
Day 2	$F_{(1,17)} = 4.779$	<0.05
Day 3	$F_{(1,17)} = 5.416$	<0.05
Day 4	$F_{(1,17)} = 6.877$	<0.05
Day 5	$F_{(1,17)} = 15.154$	<0.01
Day 6	$F_{(1,17)} = 20.512$	<0.001
Day 7	$F_{(1,17)} = 12.115$	<0.01
Day 8	$F_{(1,17)} = 14.967$	<0.01
Day 9	$F_{(1,17)} = 25.474$	<0.001
Day 10	$F_{(1,17)} = 12.745$	<0.01
Day 11	$F_{(1,17)} = 7.434$	<0.05

**a**



**b**



**Supplementary Figure 1: Differentially expressed genes in four brain regions in mice that self-administer MDMA (contingent MDMA), mice that receive the drug passively (yoked MDMA) and mice receiving a saline solution (yoked saline), identified through transcriptomic microarray analysis. (a) Venn Diagrams of the microarray data showing statistically significant genes (FDR < 5%) differentially expressed between contingent MDMA-yoked MDMA (con-non con), contingent MDMA-yoked saline (con-sal) and yoked MDMA-yoked saline (non con-sal). (b) Volcanoplots of the contingent MDMA-yoked MDMA comparison showing the significance (logOdds) and the Log Fold Change. Significance threshold (FDR < 5%) is represented by a horizontal line.**

**Table S2:** Ventral striatum: Genes differentially expressed both in the contingent-MDMA vs yoked-saline and yoked-MDMA vs yoked-saline comparisons after applying a 5% FDR.

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
1427747_a_at	Lcn2	lipocalin 2	8.12	32.83	41.35
1417290_at	Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	6.30	4.86	4.19
1455393_at	Cp	ceruloplasmin	6.64	3.10	3.30
1418595_at	S3-12	plasma membrane associated protein. S3-12	6.92	2.40	2.70
1451006_at	Xdh	xanthine dehydrogenase	6.92	2.52	2.17
1418674_at	Osmr	oncostatin M receptor	6.74	2.91	3.47
1428352_at	Arrdc2	arrestin domain containing 2	6.22	1.97	1.85
1423233_at	Cebpd	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). delta	6.94	2.46	2.90
1417185_at	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex. locus A	10.75	2.64	2.68
1448734_at	Cp	ceruloplasmin	6.47	2.54	2.61
1419606_a_at	Tnnt1	troponin T1. skeletal. slow	6.80	2.20	1.65
1455753_at	C630035N08Rik	RIKEN cDNA C630035N08 gene	7.69	1.67	1.64
1426600_at	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter). member 1	9.24	1.67	1.87
1448688_at	Podxl	podocalyxin-like	8.24	1.79	1.89
1439926_at	Heg1	HEG homolog 1 (zebrafish)	5.93	1.53	1.62
1449184_at	Pglyrp1	peptidoglycan recognition protein 1	6.98	2.64	3.14
1423754_at	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	9.52	2.72	3.28
1422869_at	Mertk	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	8.82	1.43	1.40
1416125_at	Fkbp5	FK506 binding protein 5	9.05	1.74	2.17
1450034_at	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	7.90	1.69	1.41
1455900_x_at	Tgm2	transglutaminase 2. C polypeptide	8.25	2.30	2.53
1435342_at	Kcnk6	potassium inwardly-rectifying channel. subfamily K. member 6	6.91	1.51	1.48
1451355_at	Asah3l	N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like	7.48	2.86	3.65
1432273_a_at	Darc	Duffy blood group. chemokine receptor	9.89	1.46	1.56
1421321_a_at	Net1	neuroepithelial cell transforming gene 1	6.44	1.40	1.48
1428986_at	Slc17a7	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter). member 7	8.07	3.62	3.59
1423306_at	2010002N04Rik	RIKEN cDNA 2010002N04 gene	7.20	1.61	1.47
1424638_at	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	8.69	1.95	2.72
1426368_at	Rin2	Ras and Rab interactor 2	7.21	1.36	1.28
1439163_at	Zbtb16	zinc finger and BTB domain containing 16	7.75	1.94	2.45
1418586_at	Adcy9	adenylate cyclase 9	9.94	1.34	1.51
1437595_at	E030010A14Rik	RIKEN cDNA E030010A14 gene	6.62	2.08	2.11
1417495_x_at	Cp	ceruloplasmin	7.08	2.33	2.26
1438752_at	A230058F20Rik	RIKEN cDNA A230058F20 gene	9.22	1.37	1.69
1417318_at	Dbc1	deleted in bladder cancer 1 (human)	9.92	1.32	1.27
1435477_s_at	Fcgr2b	Fc receptor. IgG. low affinity IIb	7.50	2.18	2.90
1458233_at	Fryl	furry homolog-like (Drosophila)	6.49	1.45	1.77
1452067_at	Naaa	N-acylethanolamine acid amidase	8.39	1.33	1.27
1422903_at	Ly86	lymphocyte antigen 86	9.38	1.68	1.42
1450850_at	Ezr	ezrin	8.54	1.44	1.41
1419699_at	Scgb3a1	secretoglobin. family 3A. member 1	6.25	2.60	1.37
1418937_at	Dio2	deiodinase. iodothyronine. type II	8.82	1.48	1.39
1417063_at	C1qb	complement component 1. q subcomponent. beta polypeptide	9.99	1.48	1.49
1417262_at	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	6.93	2.17	2.32
1421571_a_at	Ly6c1	lymphocyte antigen 6 complex. locus C1	10.75	1.91	1.96
1430808_at	Tbc1d5	TBC1 domain family. member 5	6.30	1.33	1.40
1436763_a_at	Klf9	Kruppel-like factor 9	9.23	1.37	1.40
1458459_a_at	E230029C05Rik	RIKEN cDNA E230029C05 gene	6.58	1.30	1.34
1437277_x_at	Tgm2	transglutaminase 2. C polypeptide	8.02	2.54	2.63
1419483_at	C3ar1	complement component 3a receptor 1	5.53	1.54	1.89
1427307_a_at	Dab1	disabled homolog 1 (Drosophila)	8.37	1.32	1.54
1417785_at	Pla1a	phospholipase A1 member A	5.86	1.45	1.53
1441624_at	Sorbs2	sorbin and SH3 domain containing 2	7.17	1.35	1.56
1450033_a_at	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	7.99	1.74	1.38
1458203_at	Spire1	spire homolog 1 (Drosophila)	8.31	1.32	1.39
1424727_at	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	5.98	1.34	1.24
1433428_x_at	Tgm2	transglutaminase 2. C polypeptide	8.31	2.43	2.54
1416041_at	Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	10.57	1.64	1.88

Table S2: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
1455754_at	Lmo3	LIM domain only 3	10.25	1.43	1.51
1430675_at	2900055J20Rik	RIKEN cDNA 2900055J20 gene	8.86	1.32	1.47
1448620_at	Fcgr3	Fc receptor. IgG. low affinity III	8.60	1.75	2.04
1423395_at	Tsnax	translin-associated factor X	11.22	1.33	1.29
1423854_a_at	Rasl11b	RAS-like. family 11. member B	9.27	1.41	1.57
1446190_at	Dclk1	doublecortin-like kinase 1	10.38	1.48	2.15
1417496_at	Cp	ceruloplasmin	6.50	1.94	1.82
1459223_at	B930095G15Rik	RIKEN cDNA B930095G15 gene	7.85	1.47	1.41
1428909_at	A130040M12Rik	RIKEN cDNA A130040M12 gene	5.94	2.64	2.84
1423619_at	Rasd1	RAS. dexamethasone-induced 1	7.51	1.82	1.88
1417494_a_at	Cp	ceruloplasmin	7.68	1.89	2.10
1449731_s_at	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor. alpha	8.09	1.52	1.78
1449289_a_at	Phf20l1	PHD finger protein 20-like 1	11.20	1.74	1.98
1440586_at	B430203I24Rik	RIKEN cDNA B430203I24 gene	7.25	1.32	1.45
1417381_at	C1qa	complement component 1. q subcomponent. alpha polypeptide	10.02	1.41	1.37
1451716_at	Mafb	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family. protein B (avian)	7.09	1.30	1.41
1422264_s_at	Klf9	Kruppel-like factor 9	7.77	1.38	1.57
1435906_x_at	Gbp2	guanylate binding protein 2	7.99	11.09	8.47
1452428_a_at	B2m	beta-2 microglobulin	11.48	1.72	1.98
1417460_at	Ifitm2	interferon induced transmembrane protein 2	7.98	2.33	3.14
1423125_at	Dclk1	doublecortin-like kinase 1	8.92	1.37	1.51
1451941_a_at	Fcgr2b	Fc receptor. IgG. low affinity IIb	6.77	1.86	2.42
1431118_at	6720427H10Rik	RIKEN cDNA 6720427H10 gene	7.49	1.27	1.26
1426397_at	Tgfr2	transforming growth factor. beta receptor II	8.21	1.41	1.53
1458111_at	C530043G21Rik	RIKEN cDNA C530043G21 gene	5.91	1.32	1.46
1423584_at	Polr2b	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B	9.08	1.87	2.32
1434270_at	Nptxr	neuronal pentraxin receptor	9.89	1.92	1.94
1433607_at	Cbln4	cerebellin 4 precursor protein	7.76	-1.57	-1.63
1440413_at	A830006F12Rik	RIKEN cDNA A830006F12 gene	6.58	-1.39	-1.42
1440803_x_at	Tacr3	tachykinin receptor 3	8.21	-1.57	-1.70
1421379_at	Zfp354b	zinc finger protein 354B	6.10	-1.40	-1.54
1446681_at	BB086117	expressed sequence BB086117	8.17	-1.41	-1.50
1427300_at	Lhx8	LIM homeobox protein 8	8.83	-1.75	-1.87
1421428_at	Slc5a7	solute carrier family 5 (choline transporter). member 7	6.25	-1.42	-1.63
1437029_at	Tacr3	tachykinin receptor 3	7.03	-1.59	-1.82
1437268_at	LanC3	LanC lantibiotic synthetase component C-like 3 (bacterial)	7.31	-1.37	-1.36
1417110_at	Man1a	mannosidase 1. alpha	8.28	-1.32	-1.26
1443997_at	Gprin2	G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2	6.37	-1.50	-1.36
1450319_at	Gabbr2	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor. subunit beta 2	8.85	-1.40	-1.76
1454032_at	Neto2	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	7.29	-1.48	-1.74
1447825_x_at	Pcdh8	protocadherin 8	10.66	-1.33	-1.40
1444058_at	Dzip3	DAZ interacting protein 3. zinc finger	7.37	-1.32	-1.38
1418688_at	Calcr	calcitonin receptor	5.53	-1.91	-1.56

Ave Expr: average log<sub>2</sub>-expression for the gene probe over all arrays and channels.

Con - sal: contingent-MDMA vs yoked-saline comparison; Non con - Sal: yoked-MDMA vs yoked-saline comparison.

**Table S3:** Frontal cortex: Genes differentially expressed both in the contingent-MDMA vs yoked-saline and yoked-MDMA vs yoked-saline comparisons after applying a 5% FDR.

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
<b>Upregulated</b>					
1427747_a_at	Lcn2	lipocalin 2	8.77	52.79	55.75
1417290_at	Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	7.50	5.64	4.93
1419282_at	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12	6.63	2.97	2.17
1451355_at	Asah3l	N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like	7.80	3.59	4.32
1451006_at	Xdh	xanthine dehydrogenase	7.12	3.13	3.01
1423233_at	Cebpd	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	7.50	2.99	3.22
1449184_at	Pglyrp1	peptidoglycan recognition protein 1	7.90	7.95	6.91
1417185_at	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	11.04	3.27	3.32
1455393_at	Cp	ceruloplasmin	7.58	4.58	4.47
1449227_at	Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase	6.86	3.43	4.52
1417500_a_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	8.15	3.39	3.41
1417063_at	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta	9.99	1.78	1.90
1416125_at	Fkbp5	FK506 binding protein 5	9.02	2.33	2.87
1419599_s_at	Ms4a6d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	5.84	2.29	3.21
1423584_at	Polr2b	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B	9.84	2.68	2.82
1450033_a_at	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	8.10	1.94	1.59
1433933_s_at	Slco2b1	solute carrier organic anion transporter family, member	7.92	1.84	1.87
1418674_at	Osmr	oncostatin M receptor	6.93	2.77	3.36
1431008_at	0610037M15Rik	RIKEN cDNA 0610037M15 gene	7.21	4.01	6.16
1449009_at	Tgtp	T-cell specific GTPase	9.24	5.86	6.63
1424923_at	Serpina3g	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member	5.57	5.92	6.25
1418240_at	Gbp2	guanylate binding protein 2	8.27	10.32	9.46
1449401_at	C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	9.21	1.75	1.88
1417381_at	C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha	10.00	1.65	1.66
1423754_at	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	10.44	3.48	3.72
1433428_x_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	8.59	2.55	2.78
1448620_at	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	8.52	1.81	2.26
1426509_s_at	Gfap	glial fibrillary acidic protein	9.07	3.18	3.09
1438672_at	Parvb	parvin, beta	6.73	1.72	1.88
1419043_a_at	ligp1	interferon inducible GTPase 1	7.75	7.60	8.34
1452352_at	Ctla2b	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	5.92	2.44	3.84
1417793_at	ligp2	interferon inducible GTPase 2	7.44	3.24	3.03
1426600_at	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter),	9.40	1.96	2.24
1428909_at	A130040M12Rik	RIKEN cDNA A130040M12 gene	6.72	3.18	3.69
1419042_at	ligp1	interferon inducible GTPase 1	7.08	5.54	6.45
1421571_a_at	Ly6c1	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1	10.95	2.30	2.62
1416811_s_at	Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	8.31	3.48	5.93
1435906_x_at	Gbp2	guanylate binding protein 2	8.69	8.30	7.72
1437277_x_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	8.33	2.50	2.91
1418536_at	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7	6.86	2.92	5.04
1421267_a_at	Cited2	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	8.45	2.15	1.87
1435477_s_at	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	7.77	2.23	3.26
1418187_at	Ramp2	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	8.40	1.77	1.64
1418826_at	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	6.98	2.65	3.87
1417292_at	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	7.79	3.13	3.72
1432273_a_at	Darc	Duffy blood group, chemokine receptor	10.04	1.62	1.57
1417141_at	Igtp	interferon gamma induced GTPase	8.36	4.18	4.04
1459740_s_at	Ucp2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	6.71	2.00	2.28
1426508_at	Gfap	glial fibrillary acidic protein	9.61	3.30	3.06
1417876_at	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	7.14	1.67	1.70
1418595_at	S3-12	plasma membrane associated protein, S3-12	7.11	2.41	3.44
1434329_s_at	Adipor2	adiponectin receptor 2	9.02	1.65	1.65
1457758_at	Eny2	enhancer of yellow 2 homolog (Drosophila)	6.02	1.98	1.68
1424254_at	Ifitm1	interferon induced transmembrane protein 1	8.35	2.69	2.41
1437968_at	Grin1	glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1)	10.24	1.78	1.62
1417013_at	Hspb8	heat shock protein 8	7.90	1.58	1.41

Table S3: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
1417821_at	D17H6S56E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	5.80	2.18	2.75
1418296_at	Fxyd5	FXVD domain-containing ion transport regulator 5	8.51	1.85	1.86
1451715_at	Mafb	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein B (avian)	5.77	1.61	1.43
1417494_a_at	Cp	ceruloplasmin	8.62	2.38	2.50
1448688_at	Podxl	podocalyxin-like	8.72	1.79	1.94
1417109_at	Tinagl1	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1	7.54	1.88	1.62
1448890_at	Klf2	Kruppel-like factor 2 (lung)	7.82	2.44	2.85
1450696_at	Psemb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)	6.82	2.04	2.01
1429843_at	Grrp1	glycine/arginine rich protein 1	6.82	1.60	1.58
1449731_s_at	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	8.98	1.80	2.12
1451335_at	Plac8	placenta-specific 8	6.98	3.39	6.33
1448471_a_at	Ctlaza	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	8.78	3.01	4.95
1452055_at	Ctdsp1	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 1	8.26	1.55	1.47
1418701_at	Comt1	catechol-O-methyltransferase 1	7.97	1.68	1.60
1428016_a_at	Rasip1	Ras interacting protein 1	6.07	1.86	1.90
1448306_at	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	8.96	1.93	2.60
1427844_a_at	Cebpb	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	6.90	1.88	1.95
1425545_x_at	H2-L	histocompatibility 2, D region	10.53	2.21	2.95
1448188_at	Ucp2	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	8.19	1.98	2.20
1423593_a_at	Csf1r	colony stimulating factor 1 receptor	9.25	1.46	1.38
1429954_at	Clec4a3	C-type lectin domain family 4, member a3	5.66	1.79	2.38
1422557_s_at	Mt1	metallothionein 1	12.50	1.59	1.62
1435386_at	Vwf	Von Willebrand factor homolog	8.57	2.76	4.24
1440926_at	Flt1	FMS-like tyrosine kinase 1	6.54	1.53	1.43
1420643_at	Lfng	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-	7.67	1.79	1.69
1448756_at	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	6.15	4.84	9.37
1437595_at	E030010A14Rik	RIKEN cDNA E030010A14 gene	6.99	2.13	2.30
1426599_a_at	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter),	10.30	1.66	2.10
1425336_x_at	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region	10.26	2.32	3.42
1455332_x_at	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	7.06	1.67	2.16
1451784_x_at	H2-D1	histocompatibility 2, D region locus 1	10.52	2.13	2.89
1436763_a_at	Klf9	Kruppel-like factor 9	9.65	1.61	1.58
1449110_at	Rhob	ras homolog gene family, member B	11.94	1.64	1.56
1417460_at	Ifitm2	interferon induced transmembrane protein 2	8.58	2.32	3.10
1436277_at	Rnf207	ring finger protein 207	6.89	1.67	1.86
1419100_at	Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member	7.95	2.09	2.16
1455900_x_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	8.05	2.03	2.45
1420653_at	Tgfb1	transforming growth factor, beta 1	6.12	1.96	2.09
1417495_x_at	Cp	ceruloplasmin	8.06	2.31	2.44
1422962_a_at	Psemb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	7.44	2.11	2.41
1418059_at	Eldt1	EGF, latrophilin seven transmembrane domain containing	7.98	1.79	2.02
1456772_at	Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1	7.01	1.53	1.51
1435124_at	EG328644	predicted gene, EG328644	7.43	1.54	1.54
1449851_at	Per1	period homolog 1 (Drosophila)	8.84	1.63	1.74
1451115_at	Pias3	protein inhibitor of activated STAT 3	7.18	1.50	1.46
1448825_at	Pdk2	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	9.17	1.48	1.43
1451255_at	Lsr	lipolysis stimulated lipoprotein receptor	7.79	1.68	1.68
1451767_at	Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1	6.31	1.48	1.67
1415712_at	Zranb1	zinc finger, RAN-binding domain containing 1	8.83	1.61	1.51
1449289_a_at	Phf20l1	PHD finger protein 20-like 1	11.49	1.73	1.98
1441972_at	6230424C14Rik	RIKEN cDNA 6230424C14 gene	7.51	1.73	1.83
1418131_at	Samhd1	SAM domain and HD domain, 1	7.07	2.12	2.77
1449620_s_at	Adcy9	adenylate cyclase 9	9.00	1.39	1.36
1436613_at	Coro6	coronin, actin binding protein 6	7.50	1.55	1.93

**Table S3:** (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
1427746_x_at	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region	7.94	2.08	2.94
1426025_s_at	Laptm5	lysosomal-associated protein transmembrane 5	8.13	1.59	1.51
1418825_at	Irgm1	immunity-related GTPase family M member 1	8.16	2.84	3.16
1451931_x_at	H2-L	histocompatibility 2, D region	10.00	2.04	2.75
1434380_at	Gbp6	guanylate binding protein 6	7.80	1.94	2.12
1429184_at	100042856	predicted gene, 100042856	7.40	2.83	3.53
1426004_a_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	6.82	1.96	2.11
<b>Downregulated</b>					
1437801_at	Morf4l1	mortality factor 4 like 1	7.44	-1.63	-1.49
1437729_at	Rpl27a	ribosomal protein L27a	7.10	-1.57	-1.56
1422168_a_at	Bdnf	brain derived neurotrophic factor	8.64	-1.65	-1.64
1438648_x_at	1190003M12Rik	RIKEN cDNA 1190003M12 gene	6.46	-1.53	-1.44
1423796_at	Sfpq	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	8.07	-1.45	-1.50
1436387_at	C330006P03Rik	RIKEN cDNA C330006P03 gene	9.90	-1.70	-1.83
1447669_s_at	Gng4	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 4	9.80	-1.51	-1.43
1438540_at	Col25a1	collagen, type XXV, alpha 1	7.56	-1.66	-1.65
1432432_a_at	Rab3c	RAB3C, member RAS oncogene family	8.78	-1.54	-1.68
1453578_at	Pter	phosphotriesterase related	5.62	-1.59	-1.50
1438624_x_at	Hs3st2	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2	8.31	-1.52	-1.70
1449494_at	Rab3c	RAB3C, member RAS oncogene family	9.09	-1.50	-1.64

Ave Expr: average log<sub>2</sub>-expression for the gene probe over all arrays and channels.

Con - sal: contingent-MDMA vs yoked-saline comparison; Non con - Sal: yoked-MDMA vs yoked-saline comparison.

**Table S4:** Dorsal Raphe Nucleus: Genes differentially expressed both in the contingent-MDMA vs yoked-saline and yoked-MDMA vs yoked-saline comparisons after applying a 5% FDR.

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
<b>Upregulated</b>					
1427747_a_at	Lcn2	lipocalin 2	8.66	26.09	52.40
1416041_at	Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	10.85	3.09	4.22
1422903_at	Ly86	lymphocyte antigen 86	9.15	1.83	1.63
1419699_at	Scgb3a1	secretoglobulin, family 3A, member 1	7.17	3.52	1.92
1417290_at	Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	7.12	4.78	4.04
1448734_at	Cp	ceruloplasmin	7.23	2.73	3.22
1451355_at	Asah3l	N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like	7.99	2.55	3.65
1436543_at	Gtpbp10	GTP-binding protein 10 (putative)	6.19	1.54	1.33
1423233_at	Cebpd	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	7.48	2.21	2.81
1417496_at	Cp	ceruloplasmin	6.89	2.17	2.54
1417381_at	C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	9.87	1.57	1.90
<b>Downregulated</b>					
1422705_at	Pmepa1	prostate transmembrane protein, androgen induced 1	7.59	-1.60	-1.54
1421163_a_at	Nfia	nuclear factor I/A	6.76	-1.57	-1.75
1425886_at	Fev	FEV (ETS oncogene family)	7.18	-1.85	-1.51
1428860_at	4930572J05Rik	RIKEN cDNA 4930572J05 gene	7.21	-1.56	-1.66
1451124_at	Sod1	superoxide dismutase 1, soluble	11.38	-1.69	-1.88

Ave Expr: average log<sub>2</sub>-expression for the gene probe over all arrays and channels.

Con - sal: contingent-MDMA vs yoked-saline comparison; Non con - Sal: yoked-MDMA vs yoked-saline comparison.

**Table S5:** Hippocampus: Genes differentially expressed both in the contingent-MDMA vs yoked-saline and yok4d-MDMA vs yoked-saline comparisons after applying a 5% FDR.

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
<b>Upregulated</b>					
1427747_a_at	Lcn2	lipocalin 2	8.55	25.03	36.39
1448620_at	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	8.40	2.26	2.49
1451006_at	Xdh	xanthine dehydrogenase	6.91	2.46	2.26
1417290_at	Lrg1	leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	6.67	3.84	4.03
1438251_x_at	Htra1	HtrA serine peptidase 1	11.24	1.42	1.18
1416041_at	Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	10.66	2.08	1.99
1431406_at	Agxt2l1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	5.44	2.97	3.14
1427345_a_at	Sult1a1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	8.45	2.02	1.87
1434773_a_at	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	10.60	1.70	1.80
1451355_at	Asah3l	N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like	7.69	2.91	4.14
1418595_at	S3-12	plasma membrane associated protein, S3-12	7.08	2.35	2.52
1445866_at	Mast4	microtubule associated serine/threonine kinase family	7.62	1.37	1.41
1417063_at	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta	9.93	1.65	1.85
1424671_at	Plekhh1	pleckstrin homology domain containing, family F (with FYVE domain) member 1	7.05	1.45	1.27
1417130_s_at	Angptl4	angiopoietin-like 4	6.63	1.60	1.59
1422903_at	Ly86	lymphocyte antigen 86	9.25	1.79	1.54
1427891_at	Gimap6	GTPase, IMAP family member 6	6.09	1.65	1.86
1448167_at	Ifngr1	interferon gamma receptor 1	7.60	1.37	1.38
1436905_x_at	Lapmt5	lysosomal-associated protein transmembrane 5	8.68	1.52	1.35
1435342_at	Kcnk6	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily K, member	6.52	1.51	1.48
1435477_s_at	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	7.43	2.26	3.10
1418674_at	Osmr	oncostatin M receptor	7.14	2.49	2.92
1418135_at	Aff1	AF4/FMR2 family, member 1	7.31	1.43	1.42
1426599_a_at	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter),	10.11	1.67	1.89
1455332_x_at	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	6.67	1.75	2.08
1448688_at	Podxl	podocalyxin-like	8.36	1.56	1.77
1428352_at	Arrdc2	arrestin domain containing 2	6.64	1.82	1.98
1417381_at	C1qa	complement component 1, q subcomponent, alpha	9.95	1.54	1.75
1418826_at	Ms4a6b	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	6.77	2.54	3.48
1417185_at	Ly6a	lymphocyte antigen 6 complex, locus A	10.75	2.49	2.82
1417495_x_at	Cp	ceruloplasmin	7.69	1.87	2.13
1433428_x_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	8.44	2.53	2.47
1455900_x_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	7.89	2.51	2.27
1420088_at	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	10.84	1.55	1.54
1417494_a_at	Cp	ceruloplasmin	8.29	1.86	2.08
1431248_at	5031426D15Rik	RIKEN cDNA 5031426D15 gene	7.53	1.27	1.22
1442700_at	Pde4b	phosphodiesterase 4B, cAMP specific	6.57	1.34	1.23
1448617_at	Cd53	CD53 antigen	7.88	1.55	1.59
1421571_a_at	Ly6c1	lymphocyte antigen 6 complex, locus C1	10.67	2.10	2.31
1437277_x_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	8.19	2.67	2.50
1449227_at	Ch25h	cholesterol 25-hydroxylase	6.62	2.40	2.34
1451941_a_at	Fcgr2b	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	6.80	2.11	2.61
1417876_at	Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I	7.08	1.47	1.58
1452352_at	Ctla2b	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	5.72	2.40	3.47
1434380_at	Gbp6	guanylate binding protein 6	7.48	2.35	2.29
1416811_s_at	Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	8.17	3.02	5.18
1441799_at	6030422H21Rik	RIKEN cDNA 6030422H21 gene	6.81	1.63	1.79
1417346_at	Pycard	PYD and CARD domain containing	7.12	1.75	1.68
1417496_at	Cp	ceruloplasmin	7.03	1.84	1.80
1449009_at	Tgtp	T-cell specific GTPase	9.21	4.40	4.76
1432273_a_at	Darc	Duffy blood group, chemokine receptor	9.84	1.40	1.65
1445091_at	Atr	ataxia telangiectasia and Rad3 related	6.90	1.30	1.22
1424254_at	Ifitm1	interferon induced transmembrane protein 1	7.97	2.28	2.25
1429642_at	Anubl1	AN1, ubiquitin-like, homolog (Xenopus laevis)	6.23	1.57	1.74

Table S5: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
1429413_at	Cpm	carboxypeptidase M	7.33	1.29	1.23
1455393_at	Cp	ceruloplasmin	7.09	2.33	2.94
1450033_a_at	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1	8.13	1.61	1.48
1459857_at	Usp32	ubiquitin specific peptidase 32	8.48	1.35	1.33
1438157_s_at	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	9.73	1.61	1.70
1415996_at	Txnip	thioredoxin interacting protein	8.87	1.86	1.87
1425428_at	Hif3a	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	7.50	1.36	1.44
1449401_at	C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain	9.21	1.42	1.75
1415997_at	Txnip	thioredoxin interacting protein	7.99	1.59	1.69
1460511_at	Pkp2	plakophilin 2	7.11	1.30	1.25
1450234_at	Ms4a6c	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C	6.06	1.69	2.11
1448591_at	Ctss	cathepsin S	11.27	1.40	1.59
1448471_a_at	Ctla2a	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	8.47	3.09	5.25
1448306_at	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	8.96	1.59	1.89
1417821_at	D17H6S56E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	5.77	1.91	2.20
1419647_a_at	Ier3	immediate early response 3	8.13	1.89	2.26
1427256_at	Vcan	versican	7.15	1.24	1.21
1417793_at	Iigp2	interferon inducible GTPase 2	7.26	2.86	2.73
1428223_at	Mfsd2	major facilitator superfamily domain containing 2	8.26	1.37	1.44
1437595_at	E030010A14Rik	RIKEN cDNA E030010A14 gene	6.66	1.70	1.88
1437726_x_at	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta	9.48	1.58	1.62
1435906_x_at	Gbp2	guanylate binding protein 2	8.04	8.10	7.57
1418240_at	Gbp2	guanylate binding protein 2	8.01	7.49	6.91
1425156_at	Gbp6	guanylate binding protein 6	6.56	1.75	1.91
1417292_at	Ifi47	interferon gamma inducible protein 47	7.37	2.94	3.53
1426004_a_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	6.65	1.64	1.76
1417822_at	D17H6S56E-5	DNA segment, Chr 17, human D6S56E 5	6.57	1.82	1.94
1425362_at	Hrbl	HIV-1 Rev binding protein-like	7.87	1.20	1.31
1438822_at	100041799	predicted gene, 100041799	7.20	1.32	1.44
1448734_at	Cp	ceruloplasmin	7.12	1.82	2.06
1417141_at	Igtp	interferon gamma induced GTPase	8.50	4.01	4.12
1429235_at	Galntl2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	5.87	1.53	1.59
1418554_at	Gpr182	G protein-coupled receptor 182	5.98	1.59	1.68
1426600_at	Slc2a1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter),	9.21	1.45	1.85
1456014_s_at	Trpt1	tRNA phosphotransferase 1	6.74	1.63	1.91
1434366_x_at	C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta	8.95	1.42	1.51
1438805_at	Ccnd3	cyclin D3	5.80	1.27	1.43
1439276_at	Adar	adenosine deaminase, RNA-specific	8.27	1.20	1.24
1445897_s_at	Ifi35	interferon-induced protein 35	7.33	1.68	1.59
1429184_at	100042856	predicted gene, 100042856	7.53	2.58	3.13
1419043_a_at	Iigp1	interferon inducible GTPase 1	7.57	4.82	5.54
1452428_a_at	B2m	beta-2 microglobulin	11.65	1.59	1.82
1451335_at	Plac8	placenta-specific 8	7.02	2.84	3.83
1433837_at	8430408G22Rik	RIKEN cDNA 8430408G22 gene	7.59	1.55	2.00
1417460_at	Ifitm2	interferon induced transmembrane protein 2	8.83	1.85	2.33
1426970_a_at	Ube1l	ubiquitin-activating enzyme E1-like	6.02	1.23	1.28
1433935_at	AU020206	expressed sequence AU020206	6.40	1.61	1.88
1459548_at	Spire1	spire homolog 1 (Drosophila)	8.00	1.22	1.25
1418536_at	H2-Q7	histocompatibility 2, Q region locus 7	6.66	2.58	4.30
1439087_a_at	5830455E04Rik	RIKEN cDNA 5830455E04 gene	8.54	1.20	1.27
1456772_at	Ncf1	neutrophil cytosolic factor 1	6.84	1.32	1.53
1441228_at	Apold1	apolipoprotein L domain containing 1	6.51	1.74	2.56
1448397_at	Gjb6	gap junction protein, beta 6	10.30	1.38	1.41
1448181_at	Klf15	Kruppel-like factor 15	8.79	1.29	1.37
1429946_at	2610301F02Rik	RIKEN cDNA 2610301F02 gene	5.96	1.26	1.30
1417500_a_at	Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide	7.64	1.85	2.26
1429745_at	DXBay18	DNA segment, Chr X, Baylor 18	5.75	1.25	1.27



Table S5: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
1449556_at	H2-T23	histocompatibility 2, T region locus 23	8.30	1.83	2.08
1422046_at	Itgam	integrin alpha M	6.01	1.27	1.35
1419599_s_at	Ms4a6d	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6D	5.74	2.23	3.27
1418340_at	Fcer1g	Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide	8.00	1.58	1.81
1428942_at	Mt2	metallothionein 2	11.78	1.68	1.88
1455899_x_at	Socs3	suppressor of cytokine signaling 3	6.03	1.96	2.47
1428306_at	Ddit4	DNA-damage-inducible transcript 4	9.63	1.32	1.46
1450696_at	Psmb9	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)	6.94	1.55	1.71
1436033_at	BC031353	cDNA sequence BC031353	8.61	1.17	1.22
1423754_at	Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3	10.07	1.87	2.70
1418059_at	Eldd1	EGF, latrophilin seven transmembrane domain containing 1	7.81	1.48	1.84
1437451_at	1110006O17Rik	RIKEN cDNA 1110006O17 gene	6.46	1.72	1.90
1418892_at	Rhoj	ras homolog gene family, member J	7.47	1.69	1.88
1419042_at	Ilgp1	interferon inducible GTPase 1	7.02	3.90	4.73
1453976_at	4432414F05Rik	RIKEN cDNA 4432414F05 gene	7.42	1.57	1.91
1419684_at	Ccl8	chemokine (C-C motif) ligand 8	5.64	1.36	1.69
1448756_at	S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	6.27	4.32	5.25
1452975_at	Agxt2l1	alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1	8.63	1.63	1.80
1424948_x_at	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region	7.90	1.62	2.31
1422962_a_at	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 8 (large multifunctional peptidase 7)	7.28	2.01	2.30
1425336_x_at	H2-K1	histocompatibility 2, K1, K region	9.94	1.78	2.77
1445104_at	E230029C05Rik	RIKEN cDNA E230029C05 gene	6.00	1.36	1.56
1416656_at	Clic1	chloride intracellular channel 1	7.85	1.43	1.49
1455314_at	Lpp	LIM domain containing preferred translocation partner in	7.14	1.22	1.34
1452730_at	Rps4y2	ribosomal protein S4, Y-linked 2	9.18	1.22	1.26
1422476_at	Ifi30	interferon gamma inducible protein 30	6.95	1.65	2.02
1427041_at	BC013712	cDNA sequence BC013712	5.84	1.23	1.25
1416612_at	Cyp1b1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	6.71	1.53	1.92
1425225_at	Fcgr4	Fc receptor, IgG, low affinity IV	5.70	1.69	2.24
1441462_at	Dock4	dedicator of cytokinesis 4	8.41	1.28	1.32
1428909_at	A130040M12Rik	RIKEN cDNA A130040M12 gene	6.26	1.89	2.40
1434372_at	AW112010	expressed sequence AW112010	7.82	2.82	3.28
1428332_at	Pik3ip1	phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	8.48	1.19	1.31
1448748_at	Plek	pleckstrin	7.37	1.29	1.50
1444681_at	Erc2	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2	7.24	1.53	1.61
1417961_a_at	Trim30	tripartite motif-containing 30	6.93	1.51	1.69
1416226_at	Arpc1b	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B	7.72	1.35	1.74
1449455_at	Hck	hemopoietic cell kinase	5.86	1.59	2.21
<b>Downregulated</b>					
1425369_a_at	Sox10	SRY-box containing gene 10	6.06	-1.64	-1.24
1448960_at	Cxxc5	CXXC finger 5	9.65	-1.42	-1.20
1423530_at	Stk32c	serine/threonine kinase 32C	6.64	-1.45	-1.31
1460173_at	Lasp1	LIM and SH3 protein 1	9.46	-1.35	-1.18
1421199_at	Dlg2	discs, large homolog 2 (Drosophila)	7.18	-1.48	-1.31
1454213_at	Armc9	armadillo repeat containing 9	6.05	-2.51	-3.15
1421200_at	Dlg2	discs, large homolog 2 (Drosophila)	7.67	-1.69	-1.44
1421399_at	Insm1	insulinoma-associated 1	6.09	-1.44	-1.45
1418356_at	Mpst	mercaptopyruvate sulfurtransferase	6.40	-1.32	-1.22
1433812_at	Lix1l	Lix1-like	6.58	-1.40	-1.30
1432383_a_at	Armc9	armadillo repeat containing 9	6.81	-1.74	-1.86
1420931_at	Mapk8	mitogen-activated protein kinase 8	7.62	-1.84	-1.61
1442319_at	Usp4	ubiquitin specific peptidase 4 (proto-oncogene)	6.33	-1.73	-1.86
1444396_at	Trp53inp2	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 2	6.34	-1.33	-1.31
1422331_at	Pou3f3	POU domain, class 3, transcription factor 3	6.81	-1.47	-1.40
1417155_at	Mycn	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	7.58	-1.24	-1.35
1427112_at	Ttl	tubulin tyrosine ligase	7.86	-1.28	-1.21

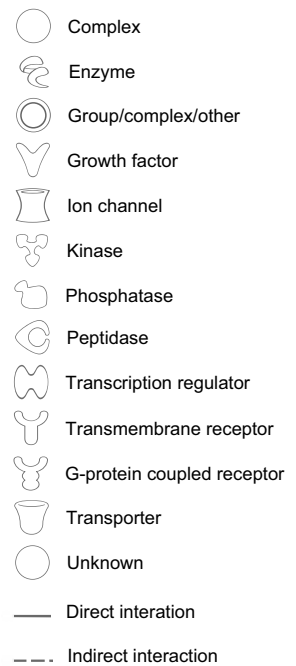
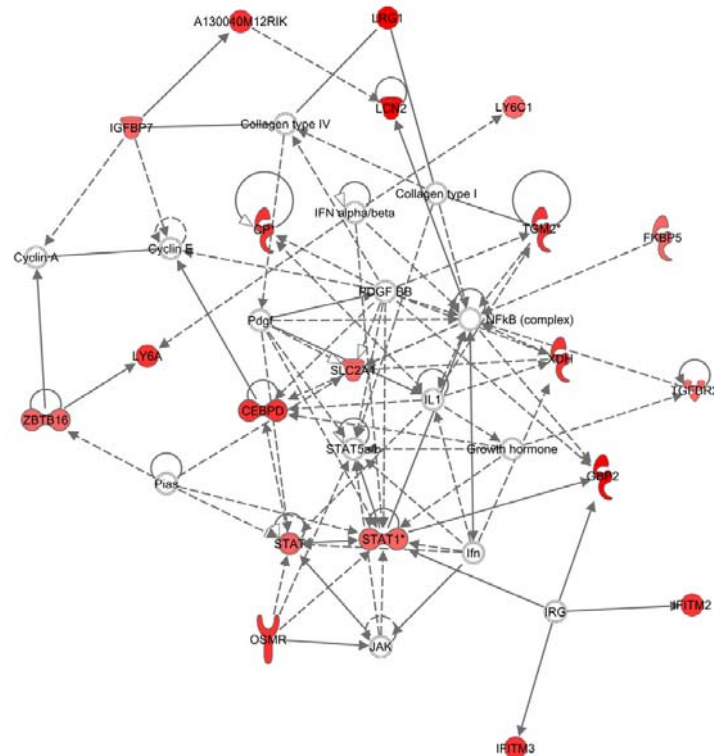
Table S5: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Sal Fold Change	Non con - Sal Fold Change
1421493_a_at	Rgs20	regulator of G-protein signaling 20	5.87	-1.40	-1.31
1455172_at	AU020094	expressed sequence AU020094	7.42	-1.33	-1.27
1426960_a_at	Fa2h	fatty acid 2-hydroxylase	9.25	-1.29	-1.29
1419429_at	Cntfr	ciliary neurotrophic factor receptor	8.12	-1.39	-1.31
1445387_at	Senp6	SUMO/sentrin specific peptidase 6	6.36	-1.44	-1.60
1431413_at	Ramp1	receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	5.97	-1.31	-1.29
1444599_at	Herc4	hect domain and RLD 4	6.05	-1.56	-1.63
1426640_s_at	Trib2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	8.71	-1.24	-1.28
1422258_at	Chrm3	cholinergic receptor, muscarinic 3, cardiac	6.22	-1.27	-1.30
1430177_at	Ube2b	ubiquitin-conjugating enzyme E2B, RAD6 homology (S.	8.08	-1.25	-1.28
1426641_at	Trib2	tribbles homolog 2 (Drosophila)	7.28	-1.25	-1.26
1421306_a_at	Hdac9	histone deacetylase 9	5.92	-1.30	-1.43
1421866_at	Nr3c1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1	7.90	-1.32	-1.36
1429284_at	Mobkl2b	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast)	6.64	-1.26	-1.30
1423152_at	Vapb	vesicle-associated membrane protein, associated protein B	9.28	-1.20	-1.38
1442051_at	Hist2h3c1	histone cluster 2, H3c1	7.39	-1.21	-1.46
1453837_at	6330500D04Rik	RIKEN cDNA 6330500D04 gene	8.11	-1.19	-1.22

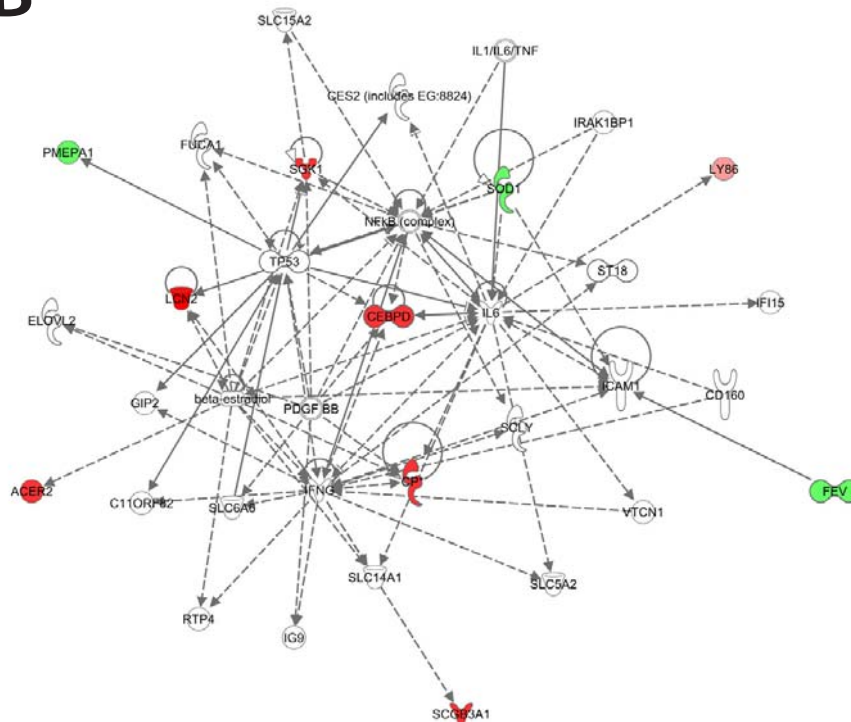
Ave Expr: average log<sub>2</sub>-expression for the gene probe over all arrays and channels.

Con - sal: contingent-MDMA vs yoked-saline comparison; Non con - Sal: yoked-MDMA vs yoked-saline comparison.

A

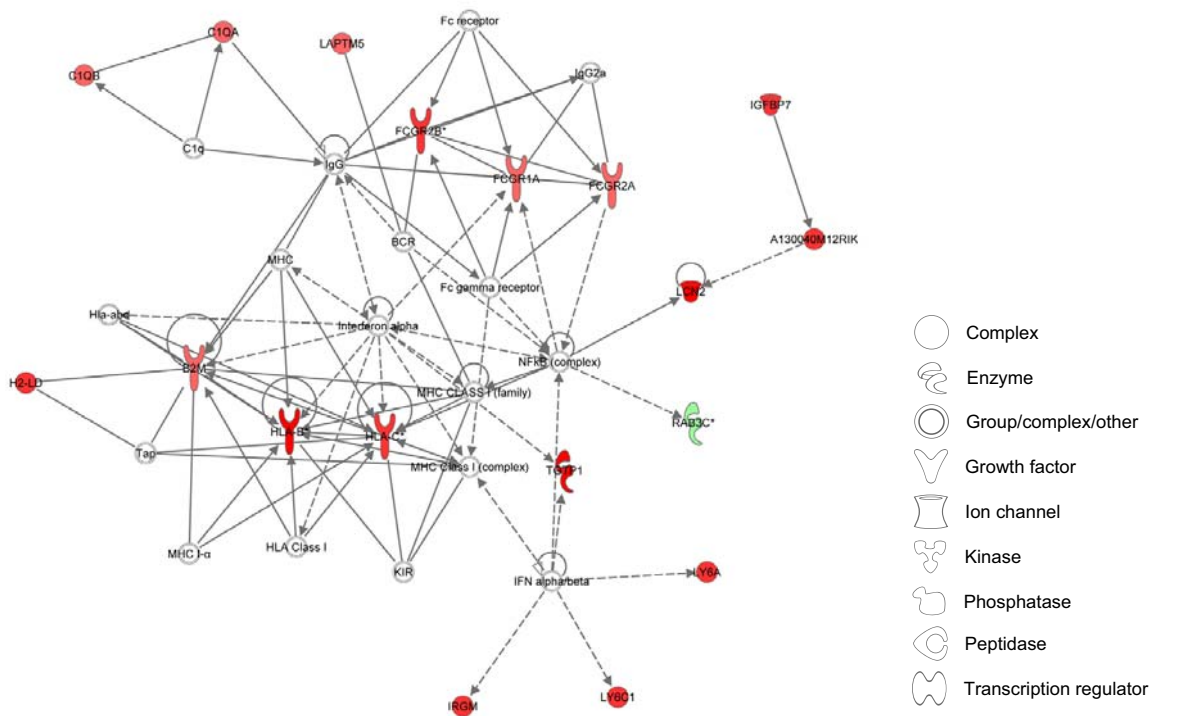


B

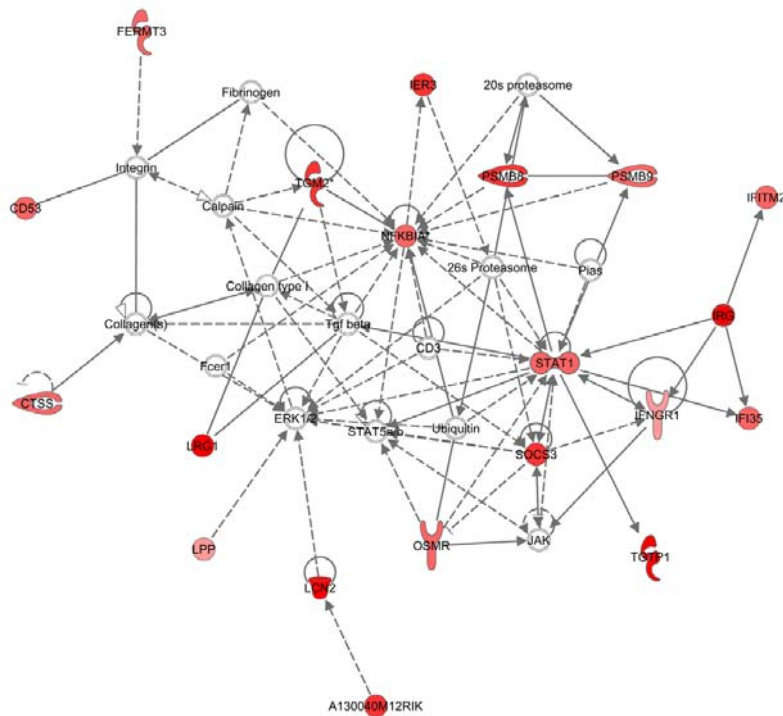


**Supplementary Figure 2: Gene network graphical representation of interaction between differentially expressed genes after MDMA exposure (contingent MDMA and yoked MDMA versus yoked saline mice) (I).** (a) Infection mechanism and infection disease gene network affected in ventral striatum; (b) Molecular transport, cell death and cell cycle gene network affected in dorsal raphe nucleus. Genes differentially expressed in both comparisons in the same direction are represented as nodes depicted in red (up-regulated) or green (down-regulated) and biological relationship between two nodes is represented with a solid or dashed line (indicating direct or indirect interaction respectively). Each node is displayed in different shapes corresponding to the functional class of the gene product showed in the legend. Modulatory effects on expression are indicated by arrows.

**A**



**B**



**Supplementary Figure 3: Gene network graphical representation of interaction between differentially expressed genes after MDMA exposure (contingent MDMA and yoked MDMA versus yoked saline mice) (II).** (a) Inflammatory response and immunological disease gene network affected in frontal cortex; (b) Antimicrobial response and inflammatory response gene network affected in hippocampus. Genes differentially expressed in both comparisons in the same direction are represented as nodes depicted in red (up-regulated) or green (down-regulated) and biological relationship between two nodes is represented with a solid or dashed line (indicating direct or indirect interaction respectively). Each node is displayed in different shapes corresponding to the functional class of the gene product showed in the legend. Modulatory effects on expression are indicated by arrows.

**Table S6:** Genes differentially expressed in hippocampus identified both in the contingent-MDMA vs yoked-MDMA and contingent-MDMA vs yoked-saline comparisons after applying a 5% FDR.

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con -Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
<b>Upregulated</b>					
1453578_at	Pter	phosphotriesterase related	5.61	1.50	1.53
1451996_at	Tm2d1	TM2 domain containing 1	6.72	1.42	1.22
1426857_a_at	Hsdl2	hydroxysteroid dehydrogenase like 2	8.23	1.38	1.20
1423711_at	Ndudaf1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, assembly factor 1	8.98	1.33	1.15
1453468_at	Cep290	centrosomal protein 290	7.10	1.39	1.17
1447807_s_at	Plekhh1	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1	8.76	1.45	1.27
1422685_at	Exoc4	exocyst complex component 4	9.19	1.38	1.18
1430991_at	1810014B01Rik	RIKEN cDNA 1810014B01 gene	5.68	1.73	1.49
1436559_a_at	Psmd10	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 10	8.16	1.33	1.20
1435377_at	2410002O22Rik	RIKEN cDNA 2410002O22 gene	8.85	1.43	1.26
1424105_a_at	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1	9.79	1.35	1.20
1422031_a_at	Zfand6	zinc finger, AN1-type domain 6	9.24	1.30	1.21
1444589_at	EG240038	predicted gene, EG240038	6.93	1.34	1.24
1428507_at	Hdhd2	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 2	9.45	1.31	1.16
1431507_a_at	Synj2bp	synaptojanin 2 binding protein	9.89	1.31	1.20
1439397_at	Fmn1	formin 1	6.53	1.48	1.32
1420620_a_at	Rnf13	ring finger protein 13	9.63	1.34	1.22
1444041_at	AU041133	expressed sequence AU041133	6.32	1.27	1.17
1453739_at	Tmem126b	transmembrane protein 126B	7.87	1.31	1.18
1417653_at	Pvalb	parvalbumin	9.72	1.35	1.19
1416867_at	Bet1	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae)	7.19	1.33	1.25
1438989_s_at	B130021B11Rik	RIKEN cDNA B130021B11 gene	8.52	1.27	1.16
1422868_s_at	Gda	guanine deaminase	7.65	1.65	1.41
1452007_at	Vamp7	vesicle-associated membrane protein 7	8.86	1.34	1.21
1419924_at	Fnip1	folliculin interacting protein 1	6.29	1.46	1.37
1418623_at	Rab2a	RAB2A, member RAS oncogene family	5.68	1.39	1.35
1419918_at	Tmed7	transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	6.98	1.53	1.54
1438260_at	Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2	6.12	1.25	1.35
1426243_at	Cth	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	6.05	1.43	1.28
1424912_at	Slc25a17	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, peroxisomal membrane protein), member 17	8.32	1.28	1.30
1422753_a_at	Polr3k	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K	7.23	1.43	1.27
1423740_a_at	Rbm10	RNA binding motif protein 10	9.71	1.25	1.21
1448309_at	Ap3m1	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	8.27	1.27	1.18
1423127_at	Impa1	inositol (myo)-1(or 4)-monophosphatase 1	10.06	1.23	1.20
1419975_at	Scp2	sterol carrier protein 2, liver	6.59	1.57	1.63
1447967_at	Tmem69	transmembrane protein 69	6.60	1.41	1.41
1423840_at	Ccdc56	coiled-coil domain containing 56	9.64	1.31	1.21
1419287_at	Tmem208	transmembrane protein 208	9.27	1.26	1.18
1457983_s_at	Rwdd4a	RWD domain containing 4A	9.59	1.28	1.22
1424508_at	Ttc5	tetratricopeptide repeat domain 5	8.93	1.23	1.22
1447623_s_at	Prkd1	protein kinase D1	8.01	1.25	1.28
1435999_at	Spink8	serine peptidase inhibitor, Kazal type 8	9.07	1.24	1.30
1459522_s_at	Gyg	glycogenin	9.44	1.27	1.20
1439511_at	Cdk7	cyclin-dependent kinase 7 (homolog of Xenopus MO15 cdk-activating kinase)	7.93	1.28	1.21
1419153_at	2810417H13Rik	RIKEN cDNA 2810417H13 gene	5.73	1.25	1.29
1417263_at	Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	7.84	1.26	1.23
1435222_at	Foxp1	forkhead box P1	9.69	1.26	1.26
1449388_at	Thbs4	thrombospondin 4	7.59	1.27	1.36
1423531_a_at	Hnrnpa1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	9.23	1.33	1.28
1437729_at	Rpl27a	ribosomal protein L27a	7.22	1.44	1.33
1438478_a_at	Ppp3ca	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	12.28	1.20	1.22
1438251_x_at	Htra1	HtrA serine peptidase 1	11.24	1.20	1.42
1436646_at	Scn2a1	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1	9.37	1.59	1.52
1416292_at	Prdx3	peroxiredoxin 3	10.08	1.19	1.21

Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con -Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1449799_s_at	Pkp2	plakophilin 2	9.36	1.28	1.33
1420982_at	Rbm39	RNA binding motif protein 39	7.12	1.29	1.28
1438654_x_at	Mmd2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2	10.38	1.21	1.22
1438975_x_at	Zdhhc14	zinc finger, DHHC domain containing 14	9.95	1.22	1.21
1419913_at	Strap	serine/threonine kinase receptor associated protein	7.33	1.40	1.34
1455860_at	Pigh	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class H	7.13	1.21	1.22
1437614_x_at	Zdhhc14	zinc finger, DHHC domain containing 14	10.01	1.21	1.20
1437418_at	100041799	predicted gene, 100041799	7.42	1.18	1.30
1419699_at	Scgb3a1	secretoglobin, family 3A, member 1	6.78	1.82	3.29
1456037_x_at	Preb	prolactin regulatory element binding	8.66	1.29	1.30
1459840_s_at	Ccdc28b	coiled coil domain containing 28B	8.17	1.24	1.24
1442051_at	Hist2h3c1	histone cluster 2, H3c1	7.39	1.21	-1.21
1417695_a_at	Soat1	sterol O-acyltransferase 1	6.81	1.30	1.36
1436948_a_at	6430550H21Rik	RIKEN cDNA 6430550H21 gene	8.90	1.15	1.25
<b>Downregulated</b>					
1418015_at	Pum2	pumilio 2 (Drosophila)	9.63	-1.82	-1.54
1422073_a_at	Celsr2	cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)	9.00	-1.72	-1.49
1434908_at	Scaf1	SR-related CTD-associated factor 1	8.46	-1.63	-1.42
1441312_at	Cnnm1	cyclin M1	6.31	-1.92	-1.63
1436780_at	Ogt	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl	7.89	-1.76	-1.61
1423561_at	Nell2	NEL-like 2 (chicken)	10.16	-1.68	-1.47
1429088_at	Lbh	limb-bud and heart	6.97	-1.69	-1.52
1424137_at	Gprin1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	9.15	-1.51	-1.40
1435889_at	Mark2	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	7.35	-1.46	-1.30
1438732_at	RP23-448C18.1	novel similar to human Nance-Horan syndrome protein (RP11-262D11.5)	6.64	-1.64	-1.48
1448901_at	Cpxm1	carboxypeptidase X 1 (M14 family)	6.03	-1.47	-1.27
1430197_a_at	Pitpnm2	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2	6.23	-1.83	-1.47
1447412_at	Gm996	gene model 996, (NCBI)	7.17	-1.49	-1.38
1416184_s_at	Hmga1	high mobility group AT-hook 1	8.84	-1.52	-1.37
1435152_at	Leng8	leukocyte receptor cluster (LRC) member 8	8.54	-1.53	-1.22
1434208_at	Rnf169	ring finger protein 169	6.53	-1.52	-1.31
1418784_at	Grik5	glutamate receptor, ionotropic, kainate 5 (gamma 2)	9.83	-1.56	-1.32
1452650_at	Trim62	tripartite motif-containing 62	6.55	-1.51	-1.35
1455701_at	Snx26	sorting nexin 26	8.96	-1.55	-1.50
1421053_at	Kif1a	kinesin family member 1A	9.53	-1.72	-1.49
1434032_at	Centg3	centaurin, gamma 3	9.14	-1.60	-1.23
1451762_a_at	Kif1b	kinesin family member 1B	8.68	-1.58	-1.53
1421181_at	Nptxr	neuronal pentraxin receptor	8.66	-1.85	-1.78
1419757_at	Pitpnm2	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2	9.79	-1.47	-1.35
1437968_at	Grin1	glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1)	9.85	-1.49	-1.33
1417440_at	Arid1a	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)	9.56	-1.47	-1.39
1416997_a_at	Hap1	huntingtin-associated protein 1	8.89	-1.65	-1.32
1442707_at	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	10.71	-1.75	-1.73
1443805_at	Dact3	dapper homolog 3, antagonist of beta-catenin (xenopus)	7.43	-1.76	-1.61
1443170_at	Cnnm1	cyclin M1	8.89	-1.49	-1.35
1437125_at	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	10.75	-1.98	-1.97
1455463_at	Phyhip	phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein	10.09	-1.51	-1.32
1436919_at	Trp53i11	transformation related protein 53 inducible protein 11	8.38	-1.48	-1.29
1452453_a_at	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	9.19	-1.78	-1.77
1422034_a_at	Palm	paralemmin	8.23	-1.58	-1.46
1455215_at	C530028O21Rik	RIKEN cDNA C530028O21 gene	8.84	-1.46	-1.40
1427763_a_at	Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	7.78	-1.76	-1.26
1429192_at	Ski	ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)	9.35	-1.58	-1.39
1423653_at	Atp1a1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide	10.67	-1.51	-1.58
1435558_at	Bai2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2	10.87	-1.43	-1.26
1438208_at	Taok2	TAO kinase 2	7.39	-1.45	-1.35
1426242_at	Polr2a	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A	8.24	-1.69	-1.33

Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1428054_at	Slc8a2	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 2	7.20	-1.51	-1.81
1460724_at	Ap2a1	adaptor protein complex AP-2, alpha 1 subunit	9.10	-1.64	-1.45
1455499_at	Nrxn2	neurexin II	7.46	-1.78	-1.82
1455942_at	Fbxl11	F-box and leucine-rich repeat protein 11	8.25	-1.46	-1.39
1454759_at	Git1	G protein-coupled receptor kinase-interactor 1	9.30	-1.41	-1.34
1417632_at	Atp6v0a1	ATPase, H+ transporting, lysosomal Vo subunit A1	10.66	-1.48	-1.30
1427481_a_at	Atp1a3	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3 polypeptide	11.85	-1.79	-1.64
1450903_at	Rad23b	RAD23b homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	9.70	-1.39	-1.32
1420834_at	Vamp2	vesicle-associated membrane protein 2	11.59	-1.43	-1.42
1428986_at	Slc17a7	solute carrier family 17 (sodium-dependent inorganic phosphate cotransporter), member 7	10.34	-1.54	-1.41
1423425_at	1300012G16Rik	RIKEN cDNA 1300012G16 gene	7.37	-1.47	-1.19
1455771_at	Bzrap1	benzodiazapine receptor associated protein 1	10.32	-1.40	-1.17
1435279_at	BC059842	cDNA sequence BC059842	7.93	-1.39	-1.20
1459107_at	Kcnh3	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3	8.40	-1.38	-1.20
1451808_at	Kcnj4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	8.05	-1.36	-1.26
1451475_at	Plxnd1	plexin D1	7.37	-1.57	-1.23
1449420_at	Pde1b	phosphodiesterase 1B, Ca2+-calmodulin dependent	9.74	-1.40	-1.21
1458441_at	Slc6a17	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 17	7.63	-1.40	-1.38
1435762_at	Paccs1	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1	8.26	-1.38	-1.26
1435026_at	Spock2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	11.39	-1.48	-1.41
1460692_at	Ehmt2	euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2	10.13	-1.39	-1.26
1451663_a_at	Trim3	tripartite motif-containing 3	9.81	-1.37	-1.20
1420752_at	Dtx3	deltex 3 homolog ( <i>Drosophila</i> )	9.40	-1.41	-1.36
1425760_a_at	Pitpnm1	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1	9.60	-1.42	-1.29
1444650_at	Arhgef18	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18	5.75	-1.43	-1.31
1433765_at	Ube2o	ubiquitin-conjugating enzyme E2O	8.63	-1.34	-1.24
1436078_at	Fcho1	FCH domain only 1	7.92	-1.46	-1.27
1445475_at	Pak6	p21 (CDKN1A)-activated kinase 6	7.44	-1.36	-1.31
1425777_at	Cacnb1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	7.63	-1.38	-1.40
1434270_at	Nptxr	neuronal pentraxin receptor	11.74	-1.43	-1.26
1435907_at	Nrxn2	neurexin II	9.55	-1.35	-1.19
1434415_at	Dact3	dapper homolog 3, antagonist of beta-catenin ( <i>xenopus</i> )	10.25	-1.40	-1.30
1450662_at	Tesk1	testis specific protein kinase 1	8.50	-1.36	-1.26
1426756_at	Galnt2	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2	8.46	-1.43	-1.28
1428382_at	Smarcc2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2	9.72	-1.32	-1.21
1427099_at	Maz	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)	7.97	-1.50	-1.45
1436094_at	Vgf	VGF nerve growth factor inducible	10.19	-1.36	-1.47
1424954_a_at	Pip5k1c	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 gamma	10.05	-1.34	-1.28
1449362_a_at	Mink1	misshapen-like kinase 1 ( <i>zebrafish</i> )	9.41	-1.36	-1.22
1452267_at	Flywch1	FLYWCH-type zinc finger 1	8.84	-1.41	-1.22
1420354_at	Cnnm1	cyclin M1	7.93	-1.37	-1.19
1451872_a_at	Neurl	neuralized-like homolog ( <i>Drosophila</i> )	7.56	-1.41	-1.31
1436381_at	Dlgap3	discs, large ( <i>Drosophila</i> ) homolog-associated protein 3	9.54	-1.36	-1.31
1418078_at	Psme3	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3	8.38	-1.64	-1.40
1433662_s_at	Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	10.97	-1.39	-1.22
1437226_x_at	Marcks1	MARCKS-like 1	10.32	-1.36	-1.18
1419045_at	Slc25a23	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23	9.60	-1.40	-1.40
1424472_at	Nol6	nucleolar protein family 6 (RNA-associated)	8.67	-1.33	-1.26
1460262_a_at	1700037H04Rik	RIKEN cDNA 1700037H04 gene	8.57	-1.32	-1.18
1437210_a_at	Brd2	bromodomain containing 2	9.70	-1.42	-1.24
1423603_at	Zfpm1	zinc finger protein, multitype 1	6.25	-1.41	-1.31
1452812_at	Lphn1	latrophilin 1	10.50	-1.43	-1.43

Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1434381_at	Atmin	ATM interactor	7.47	-1.35	-1.18
1434610_at	Plec1	plectin 1	8.41	-1.37	-1.20
1418570_at	Ncstn	nicastrin	7.93	-1.49	-1.28
1452082_at	6430548Mo8Rik	RIKEN cDNA 6430548Mo8 gene	7.70	-1.40	-1.27
1429719_at	Foxp4	forkhead box P4	7.23	-1.43	-1.30
1452379_at	Auts2	autism susceptibility candidate 2	7.50	-1.44	-1.36
1434095_at	Unc5a	unc-5 homolog A (C. elegans)	9.11	-1.52	-1.31
1449961_at	Rph3a	rabphilin 3A	7.49	-1.37	-1.39
1451071_a_at	Atp1a1	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide	11.04	-1.41	-1.39
1416588_at	Ptpn	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	10.40	-1.41	-1.25
1451864_at	Cacng8	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8	7.69	-1.64	-1.88
1433712_at	AW555464	expressed sequence AW555464	10.21	-1.30	-1.20
1424764_at	Sez6l	seizure related 6 homolog like	9.47	-1.30	-1.24
1416279_at	Ap1b1	adaptor protein complex AP-1, beta 1 subunit	9.80	-1.30	-1.18
1417423_at	Grina	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 (glutamate binding)	11.30	-1.36	-1.21
1428910_at	2310022Bo5Rik	RIKEN cDNA 2310022Bo5 gene	9.58	-1.45	-1.21
1418053_at	Sncb	synuclein, beta	10.33	-1.33	-1.27
1449173_at	Mpp2	membrane protein, palmitoylated 2 (MAGUK p55 subfamily member 2)	8.71	-1.52	-1.46
1418785_at	Mapk8ip2	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	9.83	-1.37	-1.25
1424956_at	Ahdc1	AT hook, DNA binding motif, containing 1	7.69	-1.41	-1.45
1417709_at	Cyp46a1	cytochrome P450, family 46, subfamily a, polypeptide 1	10.19	-1.35	-1.32
1424203_at	Ncln	nicalin homolog (zebrafish)	8.19	-1.33	-1.21
1426738_at	Dgkz	diacylglycerol kinase zeta	9.83	-1.36	-1.31
1460343_at	Neurl	neuralized-like homolog (Drosophila)	9.79	-1.31	-1.20
1415922_s_at	Marcks1	MARCKS-like 1	9.76	-1.38	-1.28
1460210_at	Pkd1	polycystic kidney disease 1 homolog	8.34	-1.49	-1.29
1423221_at	Tubb4	tubulin, beta 4	11.48	-1.43	-1.45
1424666_at	Gpatch8	G patch domain containing 8	8.44	-1.56	-1.45
1450027_at	Sdc3	syndecan 3	9.66	-1.31	-1.16
1429204_at	Camk2n2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2	10.04	-1.48	-1.28
1437724_x_at	Pitpm1	phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 1	10.92	-1.34	-1.22
1438688_at	Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2	10.55	-1.45	-1.24
1434825_at	Tnrc18	trinucleotide repeat containing 18	9.29	-1.40	-1.36
1426617_a_at	Ttyh1	tweety homolog 1 (Drosophila)	9.59	-1.40	-1.26
1436077_a_at	Fcho1	FCH domain only 1	7.79	-1.43	-1.20
1452292_at	Ap2b1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	10.87	-1.50	-1.58
1423967_at	Palm	paralemmin	9.54	-1.45	-1.38
1424757_at	BC018242	cDNA sequence BC018242	10.58	-1.42	-1.28
1436306_at	Saps1	SAPS domain family, member 1	9.05	-1.34	-1.32
1428819_at	Mapre1	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1	7.66	-1.37	-1.18
1421312_a_at	Kifc2	kinesin family member C2	11.13	-1.35	-1.27
1445805_x_at	Kcnh3	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 3	8.33	-1.33	-1.21
1442066_at	C530028O21Rik	RIKEN cDNA C530028O21 gene	7.74	-1.58	-1.41
1438686_at	Eif4g1	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1	6.88	-1.67	-1.68
1448807_at	Hrh3	histamine receptor H3	8.40	-1.42	-1.25
1452515_a_at	Xylt2	xylosyltransferase II	5.94	-1.34	-1.17
1452789_at	Snn	stannin	10.31	-1.32	-1.20
1456492_at	9130404Do8Rik	RIKEN cDNA 9130404Do8 gene	7.71	-1.38	-1.19
1450183_a_at	Sh2b3	SH2B adaptor protein 3	6.64	-1.34	-1.30
1428723_at	2310047M10Rik	RIKEN cDNA 2310047M10 gene	7.90	-1.32	-1.31
1434920_a_at	Evl	Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein	9.78	-1.36	-1.31
1419640_at	Purb	purine rich element binding protein B	11.34	-1.36	-1.20
1420964_at	Enc1	ectodermal-neural cortex 1	7.51	-1.65	-1.75
1449273_at	Cyfp2	cytoplasmic FMR1 interacting protein 2	10.49	-1.34	-1.20
1449117_at	Jund	Jun proto-oncogene related gene d	9.59	-1.33	-1.20
1436014_a_at	Rusc1	RUN and SH3 domain containing 1	9.96	-1.29	-1.29
1426493_a_at	Kifc2	kinesin family member C2	9.95	-1.32	-1.21
1450147_at	Nptxr	neuronal pentraxin receptor	8.86	-1.68	-1.57
1427754_a_at	Dnm1	dynamitin 1	10.87	-1.47	-1.34



Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1437183_at	Lrrc4b	leucine rich repeat containing 4B	9.39	-1.48	-1.38
1420841_at	Ptpnf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	7.91	-1.35	-1.25
1418865_at	Zfp385a	zinc finger protein 385A	8.36	-1.32	-1.37
1437400_at	Nedd4l	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4-like	9.59	-1.40	-1.25
1416792_at	Ppm1g	protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform	9.44	-1.33	-1.21
1434476_at	Crtc1	CREB regulated transcription coactivator 1	9.61	-1.31	-1.17
1423502_at	Brd2	bromodomain containing 2	9.28	-1.30	-1.18
1429113_at	Prrt2	proline-rich transmembrane protein 2	10.17	-1.27	-1.15
1448825_at	Pdk2	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	9.28	-1.33	-1.21
1424640_at	Arl8a	ADP-ribosylation factor-like 8A	9.43	-1.41	-1.34
1460650_at	Atp6v0a1	ATPase, H+ transporting, lysosomal Vo subunit A1	9.12	-1.59	-1.48
1422799_at	Bat2	HLA-B associated transcript 2	10.26	-1.38	-1.38
1457311_at	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	12.55	-1.35	-1.35
1425690_at	B3gat1	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P)	6.82	-1.38	-1.30
1451992_at	Adrbk1	adrenergic receptor kinase, beta 1	8.71	-1.38	-1.29
1450151_at	Zfp316	zinc finger protein 316	7.24	-1.35	-1.32
1433802_at	Tmem151a	transmembrane protein 151A	9.91	-1.36	-1.36
1420575_at	Mt3	metallothionein 3	11.74	-1.64	-1.49
1451841_a_at	Ncor2	nuclear receptor co-repressor 2	7.46	-1.32	-1.29
1455140_at	Pitpnm3	PITPNM family member 3	7.98	-1.41	-1.39
1418881_at	Necab2	N-terminal EF-hand calcium binding protein 2	10.07	-1.39	-1.25
1455143_at	Nlgn2	neuroligin 2	9.88	-1.33	-1.25
1453527_a_at	Neurl	neuralized-like homolog (Drosophila)	7.17	-1.51	-1.34
1450040_at	Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	9.74	-1.34	-1.27
1440128_s_at	Sez6l	seizure related 6 homolog like	7.57	-1.42	-1.23
1428708_x_at	Ptms	parathymosin	11.30	-1.41	-1.31
1423995_at	Kif1b	kinesin family member 1B	9.49	-1.41	-1.33
1417542_at	Rps6ka2	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 2	9.77	-1.31	-1.17
1428707_at	Ptms	parathymosin	10.81	-1.41	-1.31
1427079_at	Mapre3	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 3	9.40	-1.35	-1.27
1423087_a_at	Prickle4	prickle homolog 4 (Drosophila)	10.68	-1.42	-1.36
1452149_at	Ube3b	ubiquitin protein ligase E3B	9.21	-1.27	-1.18
1454051_at	2600011E07Rik	RIKEN cDNA 2600011E07 gene	8.31	-1.31	-1.39
1435784_at	Atg9a	autophagy-related 9A (yeast)	9.07	-1.39	-1.31
1418181_at	Ptp4a3	protein tyrosine phosphatase 4a3	7.93	-1.29	-1.26
1435256_at	Clp3	CAP-GLY domain containing linker protein 3	11.17	-1.28	-1.24
1460566_at	Mtap1a	microtubule-associated protein 1 A	11.13	-1.29	-1.30
1425369_a_at	Sox10	SRY-box containing gene 10	6.06	-1.32	-1.64
1416113_at	Fkbp8	FK506 binding protein 8	10.75	-1.33	-1.21
1438241_at	Rgma	RGM domain family, member A	7.33	-1.38	-1.33
1455363_at	Bai1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1	8.71	-1.35	-1.27
1434902_at	Rnf157	ring finger protein 157	8.35	-1.39	-1.33
1418794_at	Cds2	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 2	8.33	-1.35	-1.36
1428095_a_at	C2cd2l	C2 calcium-dependent domain containing 2-like	9.71	-1.32	-1.23
1454821_at	B3gat1	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P)	10.78	-1.28	-1.19
1434930_at	Tpcn1	two pore channel 1	8.17	-1.29	-1.19
1452235_at	Man1b1	mannosidase, alpha, class 1B, member 1	7.09	-1.34	-1.26
1420619_a_at	Aes	amino-terminal enhancer of split	11.07	-1.44	-1.30
1435780_at	Psd	pleckstrin and Sec7 domain containing	10.51	-1.35	-1.27
1420720_at	Nptx2	neuronal pentraxin 2	6.51	-1.63	-1.58
1449554_at	Tle3	transducin-like enhancer of split 3, homolog of Drosophila E(spl)	6.08	-1.46	-1.30
1422044_at	Ndst1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	5.88	-1.63	-1.63
1458443_at	Crtc1	CREB regulated transcription coactivator 1	7.32	-1.62	-1.47
1440437_at	Herc1	hect (homologous to the E6-AP (UBE3A) carboxyl terminus) domain and RCC1 (CHC1)-like domain (RLD) 1	6.16	-1.46	-1.36
1439748_at	Dpp6	dipeptidylpeptidase 6	8.65	-1.41	-1.38

Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con -Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1427110_at	Raver1	ribonucleoprotein, PTB-binding 1	6.81	-1.38	-1.28
1427379_at	Pnpla6	patatin-like phospholipase domain containing 6	5.99	-1.35	-1.30
1460675_at	Igsf8	immunoglobulin superfamily, member 8	10.31	-1.30	-1.26
1453569_s_at	Mark4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	8.51	-1.32	-1.27
1435196_at	Ntrk2	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	10.18	-1.30	-1.22
1418535_at	Rgl1	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1	7.22	-1.39	-1.34
1423365_at	Cacna1g	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit	7.59	-1.28	-1.25
1450202_at	Grin1	glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1)	8.65	-1.44	-1.32
1439148_a_at	Pfkl	phosphofructokinase, liver, B-type	10.58	-1.30	-1.20
1431213_a_at	LOC67527	murine leukemia retrovirus	10.65	-1.54	-1.47
1431214_at	LOC67527	murine leukemia retrovirus	9.84	-1.45	-1.45
1450382_at	Nf2	neurofibromatosis 2	7.68	-1.32	-1.34
1460365_a_at	Dnm1	dynamitin 1	12.73	-1.28	-1.23
1451465_at	Ubl7	ubiquitin-like 7 (bone marrow stromal cell-derived)	9.37	-1.32	-1.29
1452742_at	Trak1	trafficking protein, kinesin binding 1	8.70	-1.34	-1.33
1450228_a_at	Pip5k1c	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 gamma	7.58	-1.53	-1.55
1425711_a_at	Akt1	thymoma viral proto-oncogene 1	8.92	-1.46	-1.30
1428852_at	Dock3	dedicator of cyto-kinesis 3	9.41	-1.26	-1.18
1426828_at	130001817Rik	RIKEN cDNA 130001817 gene	8.64	-1.28	-1.23
1426791_at	Rusc2	RUN and SH3 domain containing 2	8.74	-1.34	-1.23
1429269_at	BCO68157	cDNA sequence BCO68157	8.18	-1.34	-1.31
1452663_at	Svop	SV2 related protein	9.20	-1.28	-1.16
1436305_at	Rnf217	ring finger protein 217	6.93	-1.32	-1.26
1448320_at	Stim1	stromal interaction molecule 1	7.69	-1.26	-1.15
1448790_at	Sema6b	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B	7.68	-1.31	-1.23
1434417_at	Sohl	small optic lobes homolog (Drosophila)	8.36	-1.26	-1.22
1425659_at	Tom1l2	target of myb1-like 2 (chicken)	7.10	-1.50	-1.57
1437861_s_at	Prkce	protein kinase C, epsilon	11.36	-1.25	-1.17
1451422_at	Myo18a	myosin XVIIIa	9.91	-1.26	-1.20
1450576_a_at	Sf3a2	splicing factor 3a, subunit 2	7.20	-1.30	-1.24
1450471_at	Smad3	MAD homolog 3 (Drosophila)	6.70	-1.50	-1.46
1415899_at	Junb	Jun-B oncogene	7.65	-1.44	-1.27
1451110_at	Egln1	EGL nine homolog 1 (C. elegans)	8.10	-1.29	-1.24
1435942_at	Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2	7.34	-1.30	-1.29
1435105_at	Rnf208	ring finger protein 208	9.07	-1.41	-1.29
1426446_at	6430548Mo8Rik	RIKEN cDNA 6430548Mo8 gene	8.19	-1.31	-1.24
1433460_at	Ttc7b	tetratricopeptide repeat domain 7B	10.28	-1.26	-1.26
1436383_at	Cplx2	complexin 2	10.36	-1.31	-1.22
1422564_at	Actl6b	actin-like 6B	9.09	-1.40	-1.34
1451834_at	Cacnb1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	6.59	-1.46	-1.35
1455622_at	Podxl2	podocalyxin-like 2	9.61	-1.44	-1.26
1434643_at	Tb1x	transducin (beta)-like 1 X-linked	7.42	-1.34	-1.21
1439051_a_at	Mark4	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4	7.50	-1.33	-1.22
1426227_s_at	Vps37c	vacuolar protein sorting 37C (yeast)	7.75	-1.32	-1.25
1450108_at	Kif1a	kinesin family member 1A	10.07	-1.35	-1.27
1449888_at	Epas1	endothelial PAS domain protein 1	7.71	-1.39	-1.30
1422521_at	Dctn1	dynactin 1	9.91	-1.34	-1.21
1430543_at	Clip3	CAP-GLY domain containing linker protein 3	10.12	-1.33	-1.30
1422647_at	Ring1	ring finger protein 1	7.89	-1.41	-1.29
1434635_at	Rph3a	rabphilin 3A	9.98	-1.23	-1.38
1420505_a_at	Stxbp1	syntaxin binding protein 1	12.09	-1.27	-1.24
1421789_s_at	Arf3	ADP-ribosylation factor 3	9.52	-1.49	-1.48
1428174_x_at	Khsrp	KH-type splicing regulatory protein	8.60	-1.24	-1.25
1420669_at	Arnt2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	6.92	-1.37	-1.45
1448019_at	2900006Ao8Rik	RIKEN cDNA 2900006Ao8 gene	7.94	-1.32	-1.33
1439031_at	Jph4	junctophilin 4	10.62	-1.26	-1.28
1427037_at	Eif4g1	eukaryotic translation initiation factor 4, gamma 1	6.97	-1.47	-1.54
1421149_a_at	Atn1	atrophin 1	7.63	-1.48	-1.45
1452357_at	Sept5	septin 5	11.48	-1.29	-1.23
1450733_at	Bicd2	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)	7.02	-1.29	-1.29
1439042_at	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1	7.48	-1.38	-1.39

Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1418921_at	Cadm3	cell adhesion molecule 3	9.03	-1.24	-1.28
1421339_at	Extl3	exostoses (multiple)-like 3	6.24	-1.65	-1.71
1450249_s_at	Kif5a	kinesin family member 5A	10.25	-1.58	-1.63
1422972_s_at	Kat2a	K(lysine) acetyltransferase 2A	8.36	-1.25	-1.19
1429518_at	Faim2	Fas apoptotic inhibitory molecule 2	10.35	-1.31	-1.25
1445241_at	Rab11fip4	RAB11 family interacting protein 4 (class II)	6.53	-1.44	-1.52
1420901_a_at	Hk1	hexokinase 1	10.44	-1.38	-1.25
1460436_at	Ndst1	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1	10.15	-1.22	-1.16
1454700_at	Lrfn4	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 4	7.06	-1.27	-1.24
1427734_a_at	Dscam1	Down syndrome cell adhesion molecule-like 1	6.13	-1.25	-1.34
1450799_at	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1	7.43	-1.28	-1.26
1436621_at	RP23-157O10.7	P140 gene	10.00	-1.24	-1.24
1450833_at	Chrm1	cholinergic receptor, muscarinic 1, CNS	8.50	-1.30	-1.33
1446265_at	Dnm3	dynamins 3	7.80	-1.54	-1.49
1456476_at	Atxn2l	ataxin 2-like	7.75	-1.38	-1.28
1421146_at	Rapgef1	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	7.09	-1.39	-1.31
1436845_at	Axin2	axin2	7.37	-1.26	-1.31
1448121_at	Wbp2	WW domain binding protein 2	10.78	-1.32	-1.22
1435965_at	Cnot3	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	8.88	-1.30	-1.24
1418323_at	Fem1b	feminization 1 homolog b (C. elegans)	7.03	-1.40	-1.30
1457456_at	Map3k10	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10	7.93	-1.31	-1.54
1415702_a_at	Ctbp1	C-terminal binding protein 1	11.05	-1.26	-1.19
1420833_at	Vamp2	vesicle-associated membrane protein 2	10.46	-1.52	-1.62
1444669_at	Lrfn1	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 1	7.79	-1.29	-1.30
1436513_at	Tanc2	tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2	9.49	-1.28	-1.22
1421090_at	Epb4.1l1	erythrocyte protein band 4.1-like 1	8.53	-1.28	-1.25
1435124_at	EG328644	predicted gene, EG328644	6.39	-1.46	-1.39
1437167_at	Tmod2	tropomodulin 2	7.45	-1.34	-1.35
1454930_at	Tbcel	tubulin folding cofactor E-like	8.43	-1.31	-1.31
1434170_at	Wdr40b	WD repeat domain 40B	9.96	-1.26	-1.28
1426989_at	Clstn3	calsyntenin 3	9.59	-1.34	-1.35
1448280_at	Syp	synaptophysin	11.73	-1.30	-1.30
1427688_a_at	Ptprs	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S	8.52	-1.68	-1.54
1454848_at	Ppp1r12c	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12C	8.18	-1.29	-1.29
1423992_at	Gatad2a	GATA zinc finger domain containing 2A	8.56	-1.31	-1.20
1450451_at	Spock2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	7.56	-1.38	-1.31
1435083_at	Ctxn1	cortexin 1	11.55	-1.32	-1.32
1454891_at	Cds2	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidyltransferase) 2	7.33	-1.43	-1.42
1455609_at	Cit	citron	9.12	-1.29	-1.28
1450854_at	Pa2g4	proliferation-associated 2G4	7.16	-1.28	-1.32
1455672_s_at	Cplx2	complexin 2	11.49	-1.26	-1.17
1433625_at	5830434P21Rik	RIKEN cDNA 5830434P21 gene	9.15	-1.25	-1.22
1428150_at	Coro7	coronin 7	7.44	-1.37	-1.30
1416437_a_at	Mapk8ip3	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	9.43	-1.44	-1.31
1449552_at	Zfr	zinc finger RNA binding protein	9.51	-1.38	-1.37
1449054_a_at	Pcbp4	poly(rC) binding protein 4	8.87	-1.36	-1.26
1421255_a_at	Cabp1	calcium binding protein 1	7.82	-1.37	-1.25
1435148_at	Atp1b2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 2 polypeptide	11.33	-1.24	-1.25
1422522_at	Fxr2	fragile X mental retardation, autosomal homolog 2	8.61	-1.29	-1.27
1426888_at	Ehmt2	euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2	8.37	-1.43	-1.35
1423231_at	Nrgn	neurogranin	11.88	-1.27	-1.24
1424040_at	Mtap7d1	microtubule-associated protein 7 domain containing 1	10.24	-1.23	-1.23
1425227_a_at	Atp6voa1	ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal Vo subunit A1	8.74	-1.49	-1.50
1440031_at	Dact3	dapper homolog 3, antagonist of beta-catenin (xenopus)	7.55	-1.44	-1.37
1449055_x_at	Pcbp4	poly(rC) binding protein 4	8.54	-1.32	-1.27
1437733_at	Eif4ebp2	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	7.23	-1.25	-1.20
1433658_x_at	Pcbp4	poly(rC) binding protein 4	10.43	-1.27	-1.19

Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con -Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1435561_at	Erf	Ets2 repressor factor	7.49	-1.27	-1.19
1425836_a_at	Limk1	LIM-domain containing, protein kinase	7.22	-1.23	-1.32
1431469_a_at	Cxxc5	CXXC finger 5	9.24	-1.29	-1.39
1422493_at	Cpox	coproporphyrinogen oxidase	7.93	-1.26	-1.26
1449956_at	Prkce	protein kinase C, epsilon	11.09	-1.27	-1.22
1421574_at	Rap2a	RAS related protein 2a	6.06	-1.27	-1.30
1425116_a_at	Spnb4	spectrin beta 4	9.46	-1.25	-1.24
1418518_at	Furin	furin (paired basic amino acid cleaving enzyme)	7.16	-1.37	-1.25
1427286_at	D11Bwg0517e	DNA segment, Chr 11, Brigham & Women's Genetics 0517 expressed	8.40	-1.31	-1.24
1422984_at	Clip2	CAP-GLY domain containing linker protein 2	7.00	-1.44	-1.47
1429190_at	Arsb	arylsulfatase B	6.47	-1.31	-1.32
1417708_at	Syt3	synaptotagmin III	8.15	-1.40	-1.27
1421154_at	Hcn2	hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated K+ 2	8.10	-1.25	-1.25
1435199_at	Apc2	adenomatosis polyposis coli 2	6.12	-1.55	-1.48
1431253_s_at	Tbc1d9	TBC1 domain family, member 9	7.74	-1.37	-1.41
1417330_at	Slc23a2	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 2	7.04	-1.39	-1.39
1455548_at	Dlgap4	discs, large homolog-associated protein 4 (Drosophila)	9.77	-1.24	-1.23
1427409_at	March9	membrane-associated ring finger (C3HC4) 9	6.31	-1.29	-1.33
1435087_at	Zfp362	zinc finger protein 362	8.53	-1.28	-1.19
1431254_at	Kbtbd11	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11	7.80	-1.41	-1.45
1454655_at	Dgkd	diacylglycerol kinase, delta	6.66	-1.41	-1.43
1435949_at	Zc3h3	zinc finger CCCH type containing 3	7.05	-1.25	-1.27
1437759_at	Pfkip	phosphofructokinase, platelet	6.74	-1.41	-1.29
1436665_a_at	Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	7.69	-1.31	-1.40
1422949_at	Nos1	nitric oxide synthase 1, neuronal	6.81	-1.42	-1.48
1438164_x_at	Flot2	flotillin 2	9.69	-1.28	-1.22
1425735_at	Madd	MAP-kinase activating death domain	6.47	-1.23	-1.34
1460568_at	Trim46	tripartite motif-containing 46	8.67	-1.25	-1.27
1454769_at	Tatdn2	TatD DNase domain containing 2	7.35	-1.34	-1.47
1425061_at	Wasf3	WAS protein family, member 3	6.85	-1.25	-1.31
1448656_at	Cacnb3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit	9.72	-1.27	-1.27
1425097_a_at	Zfp106	zinc finger protein 106	7.25	-1.33	-1.53
1428221_at	Klhdc8b	kelch domain containing 8B	7.10	-1.29	-1.27
1435790_at	Olfm2	olfactomedin 2	7.67	-1.42	-1.42
1432478_a_at	Rnf19b	ring finger protein 19B	7.86	-1.26	-1.19
1438730_at	BCo28801	cDNA sequence BCo28801	8.64	-1.42	-1.34
1438262_at	Slc8a2	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 2	7.17	-1.25	-1.28
1449510_at	Zfp467	zinc finger protein 467	6.77	-1.33	-1.35
1426263_at	Cadm4	cell adhesion molecule 4	10.52	-1.24	-1.22
1455289_at	Ankrd13b	ankyrin repeat domain 13b	8.41	-1.20	-1.22
1455369_at	Apba1	amyloid beta (A4) precursor protein binding, family A, member 1	9.10	-1.26	-1.37
1423363_at	Sort1	sortilin 1	8.24	-1.32	-1.38
1434531_at	Mgat5b	mannoside acetylglucosaminyltransferase 5, isoenzyme B	7.43	-1.39	-1.30
1452690_at	Khsrp	KH-type splicing regulatory protein	6.79	-1.28	-1.25
1426805_at	Smarca4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	7.93	-1.47	-1.38
1451734_a_at	Dbn1	drebrin 1	8.56	-1.35	-1.36
1434155_a_at	2310061104Rik	RIKEN cDNA 2310061104 gene	10.08	-1.22	-1.32
1438017_at	Rusc1	RUN and SH3 domain containing 1	8.39	-1.27	-1.32
1452370_s_at	B230208H17Rik	RIKEN cDNA B230208H17 gene	8.01	-1.34	-1.29
1427373_at	Amigo1	adhesion molecule with Ig like domain 1	7.63	-1.21	-1.25
1456682_at	Lonrf2	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2	6.43	-1.31	-1.40
1420924_at	Timp2	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	9.22	-1.36	-1.33
1421616_at	Grin2a	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1)	6.14	-1.30	-1.22
1420891_at	Wnt7b	wingless-related MMTV integration site 7B	7.16	-1.26	-1.38
1418738_at	Scn1b	sodium channel, voltage-gated, type I, beta	10.66	-1.27	-1.20
1419155_a_at	Sox4	SRY-box containing gene 4	7.45	-1.22	-1.21
1451020_at	Gsk3b	glycogen synthase kinase 3 beta	8.95	-1.22	-1.20
1425337_at	Slc12a5	solute carrier family 12, member 5	8.73	-1.52	-1.41

Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1451250_at	Gprin1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	7.79	-1.35	-1.32
1417963_at	Pltp	phospholipid transfer protein	9.13	-1.44	-1.56
1429290_at	Nptxr	neuronal pentraxin receptor	10.62	-1.21	-1.25
1425963_at	Cabp7	calcium binding protein 7	8.30	-1.46	-1.35
1428462_at	Ppp2r5e	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform	7.51	-1.26	-1.37
1452406_x_at	Erd1	erythroid differentiation regulator 1	11.47	-1.70	-1.69
1424871_s_at	1500031H01Rik	RIKEN cDNA 1500031H01 gene	8.81	-1.26	-1.21
1450212_at	Fmn1	formin-like 1	6.51	-1.21	-1.25
1425983_x_at	Hipk2	homeodomain interacting protein kinase 2	8.64	-1.24	-1.30
1439767_at	Dlgap2	discs, large (Drosophila) homolog-associated protein 2	6.93	-1.32	-1.39
1421961_a_at	Dnajb5	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 5	8.53	-1.26	-1.30
1417658_at	Tbrg4	transforming growth factor beta regulated gene 4	5.98	-1.33	-1.38
1458202_at	6330500Do4Rik	RIKEN cDNA 6330500Do4 gene	6.56	-1.28	-1.37
1419650_at	Zfr	zinc finger RNA binding protein	11.62	-1.20	-1.24
1459909_at	Nfix	nuclear factor I/X	7.40	-1.29	-1.30
1435527_at	Nfic	nuclear factor I/C	9.41	-1.22	-1.22
1460237_at	Trim8	tripartite motif protein 8	6.86	-1.31	-1.27
1448692_at	Ubqln4	ubiquilin 4	8.08	-1.23	-1.31
1418544_at	Kcnp3	Kv channel interacting protein 3, calsellenin	9.24	-1.19	-1.20
1424050_s_at	Fgfr1	fibroblast growth factor receptor 1	9.04	-1.21	-1.20
1426403_at	Actr1b	ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin beta (yeast)	8.53	-1.21	-1.25
1425679_a_at	Mapk8ip1	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1	10.08	-1.26	-1.26
1436095_at	Chd5	chromodomain helicase DNA binding protein 5	9.54	-1.21	-1.21
1435852_at	Spred3	sprouty-related, EVH1 domain containing 3	7.59	-1.24	-1.31
1433468_at	6430527G18Rik	RIKEN cDNA 6430527G18 gene	8.31	-1.24	-1.25
1434222_at	Sipa1h	signal-induced proliferation-associated 1 like 1	8.92	-1.26	-1.21
1428123_at	2610528K11Rik	RIKEN cDNA 2610528K11 gene	6.35	-1.37	-1.55
1427077_a_at	Ap2b1	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	8.82	-1.23	-1.36
1428564_at	Zfp579	zinc finger protein 579	7.45	-1.25	-1.29
1416568_a_at	Acin1	apoptotic chromatin condensation inducer 1	8.08	-1.30	-1.26
1437491_at	Bicd2	bicaudal D homolog 2 (Drosophila)	7.97	-1.24	-1.24
1420744_at	Chrn2	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal)	5.77	-1.27	-1.29
1445359_at	Adcy1	adenylate cyclase 1	8.61	-1.21	-1.28
1422733_at	Fjx1	four jointed box 1 (Drosophila)	7.67	-1.32	-1.31
1420397_a_at	Spen	SPEN homolog, transcriptional regulator (Drosophila)	7.66	-1.26	-1.24
1426108_s_at	Cacnb1	calcium channel, voltage-dependent, beta 1 subunit	7.25	-1.31	-1.27
1425360_at	Mllt6	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 6	6.91	-1.28	-1.28
1435550_at	C430014K11Rik	RIKEN cDNA C430014K11 gene	9.30	-1.26	-1.24
1430552_a_at	Sbf1	SET binding factor 1	7.99	-1.27	-1.27
1437291_at	2700081O15Rik	RIKEN cDNA 2700081O15 gene	8.02	-1.19	-1.25
1456424_s_at	Pltp	phospholipid transfer protein	10.40	-1.30	-1.47
1422009_at	Atp1b2	ATPase, Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> transporting, beta 2 polypeptide	9.92	-1.28	-1.31
1421060_at	Mllt1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 1	6.31	-1.53	-1.48
1434374_at	B930006Lo2Rik	RIKEN cDNA B930006Lo2 gene	9.26	-1.29	-1.31
1451689_a_at	Sox10	SRY-box containing gene 10	8.77	-1.24	-1.37
1425885_a_at	Kcnab2	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 2	9.99	-1.41	-1.33
1423501_at	Max	Max protein	8.17	-1.51	-1.62
1433989_at	Slc6a11	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 11	8.38	-1.24	-1.36
1452669_at	2810012Go3Rik	RIKEN cDNA 2810012Go3 gene	9.36	-1.18	-1.20
1449188_at	Midn	midnolin	7.57	-1.35	-1.32
1428319_at	Pdlim7	PDZ and LIM domain 7	6.27	-1.30	-1.25
1423334_at	Ergic1	endoplasmic reticulum-golgi intermediate compartment (ERGIC) 1	8.45	-1.20	-1.22
1456024_at	Gtf3c1	general transcription factor III C 1	5.78	-1.30	-1.36
1454978_at	Ttyh3	tweety homolog 3 (Drosophila)	9.28	-1.22	-1.20
1417229_at	Capn1	calpain 1	6.58	-1.35	-1.34

Table S6: (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1455753_at	C630035No8Rik	RIKEN cDNA C630035No8 gene	8.47	-1.34	-1.31
1419031_at	Fads2	fatty acid desaturase 2	9.33	-1.20	-1.25
1435664_at	Zfp397	zinc finger protein 397	6.65	-1.27	-1.42
1454950_at	B930006Lo2Rik	RIKEN cDNA B930006Lo2 gene	7.60	-1.26	-1.30
1446543_at	Gcn1l1	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)	5.91	-1.30	-1.45
1426692_at	Ccdc97	coiled-coil domain containing 97	7.64	-1.22	-1.30
1436897_at	Mfhas1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1	8.55	-1.28	-1.28
1458685_at	Garnl1	GTPase activating RANGAP domain-like 1	6.36	-1.28	-1.43
1451795_at	Tom1l2	target of myb1-like 2 (chicken)	7.46	-1.44	-1.44
1448941_at	B4galt2	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 2	7.38	-1.27	-1.25
1431137_at	Rusc1	RUN and SH3 domain containing 1	8.34	-1.23	-1.26
1450247_a_at	Scamp5	secretory carrier membrane protein 5	9.59	-1.30	-1.33
1451592_at	P42pop	Myb protein P42POP	7.77	-1.21	-1.35
1453103_at	Ablim1	actin-binding LIM protein 1	7.44	-1.25	-1.29
1449290_at	Dpysl5	dihydropyrimidinase-like 5	7.16	-1.23	-1.20
1448960_at	Cxxc5	CXXC finger 5	9.65	-1.19	-1.42
1417228_at	Capn1	calpain 1	7.14	-1.21	-1.26
1420953_at	Add1	adducin 1 (alpha)	10.85	-1.21	-1.23
1452921_at	Evi5l	ecotropic viral integration site 5 like	8.41	-1.26	-1.25
1439740_s_at	Uck2	uridine-cytidine kinase 2	7.55	-1.23	-1.32
1422223_at	Grin2b	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2)	7.65	-1.23	-1.35
1419157_at	Sox4	SRY-box containing gene 4	6.68	-1.26	-1.35
1443296_at	Pctk1	PCTAIRE-motif protein kinase 1	5.83	-1.21	-1.25
1426849_at	Sec24b	Sec24 related gene family, member B (S. cerevisiae)	7.20	-1.29	-1.28
1421933_at	Cbx5	chromobox homolog 5 (Drosophila HP1a)	6.70	-1.25	-1.47
1435495_at	Adora1	adenosine A1 receptor	9.59	-1.19	-1.25
1450041_a_at	Tub	tubby candidate gene	7.11	-1.41	-1.54
1450955_s_at	Sort1	sortilin 1	8.35	-1.26	-1.32
1417153_at	Btbd14a	BTB (POZ) domain containing 14A	6.93	-1.35	-1.44
1419398_a_at	Reep5	receptor accessory protein 5	10.89	-1.22	-1.21
1416845_at	Tmem132a	transmembrane protein 132A	9.86	-1.18	-1.21
1426744_at	Srebf2	sterol regulatory element binding factor 2	8.70	-1.27	-1.43
1424658_at	Taok1	TAO kinase 1	6.01	-1.22	-1.27
1451912_a_at	Fgfr1	fibroblast growth factor receptor-like 1	7.29	-1.24	-1.44
1422145_at	Mgat3	mannoside acetylglucosaminyltransferase 3	6.58	-1.38	-1.58
1450439_at	Hcfc1	host cell factor C1	7.05	-1.23	-1.26
1421124_at	Cdk5r1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	8.30	-1.32	-1.39
1421298_a_at	Hipk1	homeodomain interacting protein kinase 1	6.54	-1.27	-1.30
1437626_at	Zfp36l2	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	9.36	-1.26	-1.27
1429449_at	Samd4	sterile alpha motif domain containing 4	6.20	-1.20	-1.29
1435359_at	BC060632	cDNA sequence BC060632	6.70	-1.21	-1.35
1434255_at	Pacs2	phosphofurin acidic cluster sorting protein 2	5.59	-1.35	-1.58
1449325_at	Fads2	fatty acid desaturase 2	9.86	-1.22	-1.24

Ave Expr: average log<sub>2</sub>-expression for the gene probe over all arrays and channels.

Con - sal: contingent-MDMA vs yoked-saline comparison; Non con - Sal: yoked-MDMA vs yoked-saline comparison.

**Table S7:** Significant biological categories related to neurological processes after functional clustering of genes showing differential expression in hippocampus both in contingent-MDMA vs yoked-MDMA and contingent-MDMA vs yoked-saline comparisons.

Term	Term ID	Genes	Fraction	P-value
synapse	GO:0045202	24	4.91%	1.45E-08
synapse		17	3.48%	1.32E-06
transmission of nerve impulse	GO:0019226	20	4.09%	4.56E-06
synaptic transmission	GO:0007268	18	3.68%	5.44E-06
synaptosome	GO:0019717	9	1.84%	4.29E-05
regulation of neurotransmitter levels	GO:0001505	11	2.25%	6.15E-05
synaptic vesicle	GO:0008021	9	1.84%	7.19E-05
neuron projection	GO:0043005	13	2.66%	7.23E-05
nervous system development	GO:0007399	32	6.54%	1.18E-04
synapse part	GO:0044456	12	2.45%	1.79E-04
cell morphogenesis	GO:0000902	26	5.32%	3.85E-04
cellular structure morphogenesis	GO:0032989	26	5.32%	3.85E-04
glutamate receptor binding	GO:0035254	4	0.82%	6.32E-04
response to ethanol	GO:0045471	4	0.82%	8.43E-04
cell projection organization and biogenesis	GO:0030030	17	3.48%	1.09E-03
cell part morphogenesis	GO:0032990	17	3.48%	1.09E-03
cell projection morphogenesis	GO:0048858	17	3.48%	1.09E-03
regulated secretory pathway	GO:0045055	8	1.64%	1.11E-03
Postsynaptic cell membrane		9	1.84%	1.25E-03
postsynaptic membrane	GO:0045211	10	2.04%	1.30E-03
visual learning	GO:0008542	5	1.02%	1.31E-03
ionotropic glutamate receptor complex	GO:0008328	4	0.82%	1.41E-03
visual behavior	GO:0007632	5	1.02%	1.56E-03
cell projection	GO:0042995	21	4.29%	1.81E-03
neurotransmitter secretion	GO:0007269	7	1.43%	1.99E-03
cellular morphogenesis during differentiation	GO:0000904	13	2.66%	2.18E-03
neuron morphogenesis during differentiation	GO:0048667	12	2.45%	2.56E-03
neurite morphogenesis	GO:0048812	12	2.45%	2.56E-03
cell projection part	GO:0044463	8	1.64%	2.68E-03
neurite development	GO:0031175	13	2.66%	3.11E-03
neurogenesis	GO:0022008	18	3.68%	4.51E-03
presynaptic membrane	GO:0042734	4	0.82%	4.88E-03
axonogenesis	GO:0007409	11	2.25%	4.97E-03
learning	GO:0007612	6	1.23%	5.05E-03
N-methyl-D-aspartate selective glutamate receptor complex	GO:0017146	3	0.61%	5.36E-03
learning and/or memory	GO:0007611	7	1.43%	5.42E-03
extracellular-glutamate-gated ion channel activity	GO:0005234	4	0.82%	6.57E-03
memory	GO:0007613	4	0.82%	7.05E-03
Glutamate receptor-related	IPR015683	4	0.82%	7.18E-03
ionotropic glutamate receptor activity	GO:0004970	4	0.82%	7.75E-03
neuron development	GO:0048666	13	2.66%	7.93E-03
membrane depolarization	GO:0051899	4	0.82%	8.24E-03
postsynaptic density	GO:0014069	3	0.61%	0.01
regulation of excitatory postsynaptic membrane potential	GO:0060079	3	0.61%	0.02
neuron differentiation	GO:0030182	14	2.86%	0.02
sensory perception of pain	GO:0019233	4	0.82%	0.02
generation of neurons	GO:0048699	15	3.07%	0.02
synaptic vesicle transport	GO:0048489	4	0.82%	0.03
axon	GO:0030424	6	1.23%	0.03
dendritic spine	GO:0043197	3	0.61%	0.03
synapse organization and biogenesis	GO:0050808	5	1.02%	0.03
response to light stimulus	GO:0009416	6	1.23%	0.03
regulation of membrane potential	GO:0042391	5	1.02%	0.03
regulation of postsynaptic membrane potential	GO:0060078	3	0.61%	0.03
dendrite	GO:0030425	5	1.02%	0.04
glutamate signaling pathway	GO:0007215	3	0.61%	0.04
synaptic vesicle exocytosis	GO:0016079	3	0.61%	0.04
axon guidance	GO:0007411	6	1.23%	0.05
response to organic substance	GO:0010033	4	0.82%	0.05
neurotransmitter metabolic process	GO:0042133	4	0.82%	0.05

**Table S8:** Genes differentially expressed in dorsal raphe nucleus identified both in the contingent-MDMA vs yoked-MDMA and contingent-MDMA vs yoked-saline comparisons after applying a 15% FDR.

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con - Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
<b>Upregulated</b>					
1436329_at	Egr3	early growth response 3	5.44	4.03	3.26
1424852_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	7.84	2.82	2.78
1447222_at	Hspa12a	heat shock protein 12A	7.04	1.43	1.29
1436998_at	Ankrd43	ankyrin repeat domain 43	7.02	1.66	1.49
1421189_at	Gabrb3	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor. subunit beta 3	7.65	1.37	1.35
1421027_a_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	7.72	2.48	2.44
1428948_at	5730414M22Rik	RIKEN cDNA 5730414M22 gene	5.63	1.66	1.79
1421471_at	Npy1r	neuropeptide Y receptor Y1	6.76	1.38	1.41
1419699_at	Scgb3a1	secretoglobin. family 3A. member 1	7.17	1.83	3.52
1436066_at	Kalrn	kalirin. RhoGEF kinase	7.80	2.95	3.23
1451507_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	6.32	2.27	2.62
1421028_a_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	7.04	1.85	2.03
1426937_at	633040615Rik	RIKEN cDNA 633040615 gene	6.19	1.54	1.42
1436387_at	C330006P03Rik	RIKEN cDNA C330006P03 gene	5.31	2.06	1.97
1419406_a_at	Bcl11a	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	7.83	1.43	1.32
1426519_at	P4ha1	procollagen-proline. 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase). alpha 1 polypeptide	7.60	1.36	1.23
1438565_at	A830010M20Rik	RIKEN cDNA A830010M20 gene	7.43	1.25	1.23
1451506_at	Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	7.87	2.05	2.49
1432813_at	2900064F13Rik	RIKEN cDNA 2900064F13 gene	6.80	1.41	1.38
1425162_at	Rorb	RAR-related orphan receptor beta	6.97	1.70	1.44
1427679_at	Lats1	large tumor suppressor	5.73	1.35	1.30
1419028_at	Arpp21	cyclic AMP-regulated phosphoprotein. 21	8.68	1.38	1.30
1453365_at	Rabgap1l	RAB GTPase activating protein 1-like	7.06	1.40	1.28
1451280_at	Arpp21	cyclic AMP-regulated phosphoprotein. 21	7.06	1.50	1.77
1436268_at	Ddn	dendrin	7.12	3.53	3.28
1419592_at	Unc5c	unc-5 homolog C (C. elegans)	6.52	1.33	1.35
1459971_at	Kcnt2	potassium channel. subfamily T. member 2	6.07	1.36	1.69
1422107_at	2410066E13Rik	RIKEN cDNA 2410066E13 gene	6.41	1.24	1.19
1432646_a_at	2900097C17Rik	RIKEN cDNA 2900097C17 gene	11.25	1.31	1.33
1420965_a_at	Enc1	ectodermal-neural cortex 1	10.71	1.47	1.56
1441477_at	Calu	calumenin	6.81	1.31	1.25
1431164_at	Rragd	Ras-related GTP binding D	6.23	1.24	1.25
1452244_at	633040615Rik	RIKEN cDNA 633040615 gene	6.62	1.41	1.54
1438051_at	Ttc14	tetratricopeptide repeat domain 14	7.04	1.44	1.40
1416846_a_at	Pdzrn3	PDZ domain containing RING finger 3	6.10	1.35	1.38
1456637_at	Lrrtm2	leucine rich repeat transmembrane neuronal 2	8.13	1.28	1.36
1457311_at	Camk2a	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha	9.06	2.09	1.94
1431229_at	Ipw	imprinted gene in the Prader-Willi syndrome region	7.61	1.35	1.27
1437101_at	Lats2	large tumor suppressor 2	6.51	1.28	1.34
1424248_at	Arpp21	cyclic AMP-regulated phosphoprotein. 21	8.28	1.62	1.66
1438213_at	A830018L16Rik	RIKEN cDNA A830018L16 gene	6.71	1.31	1.26
1425339_at	Plcb4	phospholipase C. beta 4	8.53	1.26	1.25
1425338_at	Plcb4	phospholipase C. beta 4	8.79	1.24	1.21
1427950_at	Zfp294	zinc finger protein 294	6.58	1.28	1.27
1427359_at	Jhdm1d	jumonji C domain-containing histone demethylase 1 homolog D (S. cerevisiae)	7.31	1.34	1.29
1427408_a_at	Thrap3	thyroid hormone receptor associated protein 3	8.10	1.23	1.19
1452030_a_at	HnrmpR	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	8.74	1.21	1.21
1425213_at	6430514L14Rik	RIKEN cDNA 6430514L14 gene	8.53	1.86	1.82
1442312_at	Tbl1xr1	transducin (beta)-like 1X-linked receptor 1	6.34	1.38	1.33
1450143_at	Rasgrp1	RAS guanyl releasing protein 1	6.14	2.68	2.59
1448891_at	Fcrls	Fc receptor-like S. scavenger receptor	7.97	1.29	1.31
<b>Downregulated</b>					
1447592_at	Dbh	dopamine beta hydroxylase	6.87	-1.61	-1.67
1455520_at	LOC100040799	hypothetical protein LOC100040799	8.08	-1.49	-1.26
1433435_at	AW551984	expressed sequence AW551984	6.29	-1.46	-1.42



**Table S8:** (Continued)

Probe	Gene symbol	Gene Name	Ave Expr	Con -Non con Fold Change	Con - Sal Fold Change
1423869_s_at	Txnrd3	thioredoxin reductase 3	7.05	-1.38	-1.23
1455716_at	BB187676	expressed sequence BB187676	6.57	-1.33	-1.22
1444637_at	E230016M11Rik	RIKEN cDNA E230016M11 gene	6.47	-1.31	-1.24
1450670_at	Dbh	dopamine beta hydroxylase	7.41	-2.26	-1.98
1437880_at	Lbxcor1	ladybird homeobox 1 homolog (Drosophila) corepressor 1	5.73	-1.76	-1.57
1460129_at	Slc6a2	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	8.05	-2.65	-2.28
1440240_at	Npb	neuropeptide B	6.31	-1.24	-1.24

Ave Expr: average log<sub>2</sub>-expression for the gene probe over all arrays and channels.

Con - sal: contingent-MDMA vs yoked-saline comparison; Non con - Sal: yoked-MDMA vs yoked-saline comparison.



# DISCUSSIÓ

“El soma no gastaba tales jugarretas. Las vacaciones que proporcionaba eran perfectas, y si la mañana siguiente resultaba desagradable, sólo era por comparación con el gozo de la víspera. La solución era fácil: perpetuar aquellas vacaciones. Glotonamente, Linda exigía cada vez dosis más elevadas y más frecuentes.”

*Un mundo feliz, Aldous Huxley*



En aquest treball s'han estudiat a nivell genètic dues drogues psicoestimulants (cocaïna i èxtasi) mitjançant dues aproximacions ben diferenciades. Com s'ha comentat a la Introducció, el consum de drogues provoca alteracions en l'expressió gènica que condueixen a canvis estables al SNC. Aquestes alteracions, juntament amb factors genètics de predisposició i altres factors ambientals, donen lloc al comportament de consum compulsiu i abús de la droga, i en alguns casos a processos addictius. Així doncs, en el cas de l'estudi de la dependència de cocaïna s'han avaluat un nombre considerable de gens candidats, que podrien participar en la susceptibilitat a la dependència, mitjançant estudis d'associació de tipus cas-control en una mostra clínica. En el cas de l'estudi sobre el consum reiterat d'èxtasi s'han avaluat els canvis d'expressió gènica induïts tant pel consum actiu com passiu d'aquesta droga a diferents regions del SNC fent servir estudis de *microarrays* en un model murí. Ambdues aproximacions, malgrat tenir avantatges, també presenten limitacions que es discutiran a continuació juntament amb els resultats obtinguts.

## 1. VARIANTS DE SUSCEPTIBILITAT A LA DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA

### 1.1. CONSIDERACIONS SOBRE ELS ESTUDIS D'ASSOCIACIÓ I LA METODOLOGIA EMPRADA

Els estudis d'associació de tipus cas-control són una bona eina per avaluar la susceptibilitat genètica a les patologies complexes. D'entre els estudis d'associació, els poblacionals són els més emprats, i es basen en la comparació de les freqüències genotípiques o al·lèliques de variants gèniques polimòrfiques entre una mostra de casos i una de controls per tal d'identificar diferències estadísticament significatives que determinen un determinat risc de patir la malaltia. En aquesta Tesi Doctoral hem optat per aquesta estratègia. És important tenir en compte una sèrie de consideracions per a la realització d'un bon disseny de l'estudi que permeti identificar aquestes variants.

#### *Determinació del fenotip en una malaltia complexa*

El grup de pacients que s'inclouen en un estudi d'associació ha de ser el més homogeni possible per tal de facilitar la identificació dels factors genètics de predisposició. La inclusió de fenotips diferents en l'estudi pot incrementar l'heterogeneïtat genètica subjacent, tot complicant o impeding la detecció de les associacions (Van Der Sluis

et al., 2010). En el cas de la dependència d'una droga (com la cocaïna) un factor d'heterogeneïtat difícil de controlar és la comorbiditat amb l'abús o dependència d'altres drogues i amb d'altres trastorns psiquiàtrics. La mostra emprada en els nostres estudis inclou casos que han estat diagnosticats per la dependència de cocaïna seguint els criteris del DSM-IV i seguint una entrevista estandarditzada (*Structural Clinical Interview, SCID*). No obstant, és important tenir en compte que la mostra de casos presenta una certa comorbiditat amb d'altres dependències de drogues (alcohol, 23%; cannabis, 26%; opiàtics, 14%; benzodiacepines, 5%; amfetamina i metamfetamina, 2%) essent la mostra d'individus només dependent de cocaïna (purs) relativament reduïda. A més, la dependència de cocaïna també presenta comorbiditat amb d'altres trastorns psiquiàtrics com el trastorn afectiu, depressiu, de personalitat, d'ansietat i de dèficit d'atenció amb hiperactivitat (TDAH) (Ford et al., 2009). S'ha de considerar que en dos dels tres estudis inclosos en aquest treball (articles 2 i 3 dels capítols 1 i 2, respectivament) la mostra de casos incloïa un nombre considerable (aproximadament un 15%) de pacients diagnosticats amb TDAH. Els pacients amb TDAH tenen una prevalença més elevada de consum de psicoestimulants que la població general perquè aquest tipus de substàncies són utilitzades amb finalitats terapèutiques en aquesta patologia, i de fet el fàrmac més emprat en el seu tractament (metilfenidat), bloqueja, com la cocaïna, l'activitat del transportador de dopamina (Fowler et al., 2001; Volkow et al., 2002; Volkow & Swanson, 2003; Levin et al., 2009).

#### *Selecció de la mostra control*

En els estudis d'associació de tipus cas-control és important emprar una mostra control en què s'hagi exclòs el fenotip patològic, ja que això pot emmascarar els resultats i impedir la detecció d'associacions, sobretot si el trastorn és molt prevalent a la població general. En el nostre estudi no fou possible utilitzar una mostra control cribrada perquè l'exclusió es basa en la resposta del subjecte a una entrevista oral, molt poc fiable per la naturalesa del fenotip que es vol descartar (consum o dependència de cocaïna). No obstant, sí que es va poder descartar el consum de drogues injectables en aquests subjectes control, ja que es van reclutar com a donants de sang al Banc de Sang de l'Hospital Vall d'Hebron (la injecció de drogues és motiu d'exclusió en la donació de sang). En el primer estudi realitzat (capítol 1, article 1) la mostra control consistia en individus no fumadors per tal de minimitzar de forma indirecta l'entrada d'individus consumidors de cocaïna, però aquesta estratègia pot donar lloc a l'aparició de falsos positius en què l'associació detectada ho sigui al tabaquisme (la mostra de pacients presentava dependència de tabac majoritàriament, i la mostra de controls

era no fumadora). En els estudis posteriors no es va considerar aquesta variable en la selecció de controls. En qualsevol cas, la possible contaminació de la mostra control amb individus amb dependència de cocaïna és molt baixa (tenint en compte que la prevalença del consum de cocaïna a la població espanyola és de 3,9% i que només un 16% d'aquests individus desenvolupen dependència (Wagner & Anthony, 2002), estimem que hi podria haver un 0.62% de dependents a la mostra control). Un altre punt important a controlar en la selecció de la mostra control és l'aparellament per sexe entre casos i controls, especialment en malalties en què la relació de sexes està esbiaixada. En el cas de la dependència de cocaïna, la mostra control emprada en els nostres estudis té una proporció de sexes (4,8 : 1, homes : dones) similar a la proporció entre homes y dones en tractament per la cocaïna a Europa 5,1 : 1 (2009 Annual report on the state of the drugs problem in Europe, *European monitoring Centre for drugs and drug addiction*, EMCDDA).

#### *Estratificació poblacional*

Quan dues o més poblacions han estat separades geogràficament o culturalment durant generacions, les freqüències al·lèliques i genotípiques poden divergir de forma significativa. En un grup d'individus concret hi ha estratificació poblacional quan la mostra està constituïda per una barreja d'individus de poblacions diferenciades, generalment per raons ètniques. Aquest fenomen pot donar lloc a l'aparició de falsos positius en els estudis d'associació a causa de diferències en les freqüències al·lèliques no relacionades amb el fenotip d'estudi (Cardon & Bell, 2001; Colhoun et al., 2003; Abou-Sleiman et al., 2006). És important, doncs, que la mostra de casos i controls sigui genèticament homogènia, constituïda per individus procedents d'una mateixa regió i de la mateixa ètnia. En els estudis presentats en aquest treball es va tenir en compte aquest problema, i és per això que la mostra de casos i controls està integrada exclusivament per individus d'ètnia caucàsica, nacionalitat espanyola i fills de progenitors també espanyols. A més es va descartar la possible presència d'estratificació poblacional mitjançant la genotipació de 48 SNPs intergènics situats a una distància mínima de 100 kb de qualsevol gen conegut (Sanchez et al., 2006) a la mostra de casos i de controls. Els resultats es van analitzar utilitzant tres metodologies estadístiques diferents per tal de descartar l'existència de subpoblacions (Goudet, 1995; Pritchard & Rosenberg, 1999; Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003).

#### *Poder estadístic*

En els estudis d'associació és molt important tenir en compte la mida de la mostra, perquè en depèn el poder estadístic (la probabilitat de detectar una associació si

aquesta existeix realment) (Zondervan & Cardon, 2004). 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 funcionalment rellevant per la malaltia i la del marcador analitzat, el grau de desequilibri de lligament entre ambdós marcadors i el risc que confereix la variant causal (Abou-Sleiman *et al.*, 2006). La mida mostral dels tres estudis inclosos en aquest treball ha anat creixent successivament, però tot i això el poder estadístic és sempre limitat, oscil·lant entre el 49% del primer estudi (article 1) i el 62,7% del darrer (article 2).

### *Selecció de gens*

Inicialment, en els estudis d'associació se seleccionaven gens candidats relacionats amb el fenotip a estudiar a partir d'evidències que sorgien d'estudis clínics, farmacològics, genètics, fisiològics, bioquímics o de models múrids. Posteriorment, i amb l'avenç de les tecnologies de genotipació massiva, es van començar a estudiar sistemes gènics candidats que codificaven per un conjunt de proteïnes funcionalment relacionades. Actualment els estudis d'associació estan deixant enrere els gens candidats per donar pas a un abordatge a escala genòmica (*Genome-Wide Association Studies, GWAS*), que analitzen sistemàticament milers o milions de SNPs distribuïts al llarg de tot el genoma humà sense una hipòtesi específica de partida sobre la possible identitat de les variants de susceptibilitat. Aquest abordatge és especialment interessant per a aquelles patologies en què no es coneixen amb certesa les bases fisiopatològiques. En general els GWAS han identificat de forma més freqüent gens prèviament insospitats, demostrant el potencial dels cribratges genètics a l'hora de descobrir nous processos biològics (McCarthy & Hirschhorn, 2008). Aquests estudis, però, requereixen una mostra molt àmplia de casos i controls perquè l'elevat nombre de variants polimòrfiques que es tenen en compte penalitza de forma molt important la probabilitat de detectar associacions significatives quan es fan correccions per tests múltiples. S'han realitzat diversos estudis a escala genòmica amb abús o dependència de drogues (Uhl *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008; Drgon *et al.*, 2010).

En els nostres estudis hem optat principalment per l'estratègia de sistemes de gens candidats amb l'objectiu de cobrir exhaustivament grups funcionals sencers potencialment implicats en la susceptibilitat dels individus a la dependència.

### *Selecció de polimorfismes*

Els estudis d'associació parteixen de la premissa que hi ha un conjunt de variants polimòrfiques al genoma que tenen efectes funcionals sobre determinats gens tot incrementant la vulnerabilitat a patologies concretes, com la dependència de cocaïna.



Sovint és difícil determinar a priori quines variants poden estar potencialment relacionades amb el fenotip en estudi, perquè encara sabem poques coses sobre la seva funcionalitat. Podem predir possibles efectes funcionals mitjançant eines bioinformàtiques, utilitzant aplicacions com POLYPHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) en el cas de les substitucions aminoacídiques o ESEfinder 3.0 (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE>) i MATINSPECTOR ([http://www.genomatix.de/online\\_help/help\\_matinspector/matinspector\\_help.html](http://www.genomatix.de/online_help/help_matinspector/matinspector_help.html)) en el cas de variants amb possibles efectes sobre la regulació gènica, però els estudis experimentals estan encara lluny de cobrir la totalitat dels polimorfismes coneguts. És per això que la major part dels estudis d'associació que es duen a terme actualment, tant a nivell de gens candidats com a escala genòmica, utilitzen criteris de cobertura genètica en la selecció dels polimorfismes. Així, els anomenats estudis d'associació indirecta parteixen dels patrons de desequilibri de lligament (*Linkage Disequilibrium*, LD) de la regió genòmica diana en una població concreta per seleccionar variants que capturin bona part de la variabilitat genètica existent. Aquesta estratègia sol conduir a variants associades al fenotip que no hi tenen una relació causal però que estan en LD amb canvis funcionalment rellevants que sí que estan relacionats directament amb la patologia. En els nostres treballs hem optat en general pel criteri de cobertura genètica utilitzant SNPs, però hem inclòs també algunes variants descrites prèviament com a funcionals que no són necessàriament canvis d'un únic nucleòtid: número variable de repeticions en tàndem (VNTR) o inserció/deleció. En fer la selecció de marcadors cal tenir en compte la freqüència de l'al·lel minoritari (*Minor Allele Frequency*, MAF), ja que si la MAF és molt baixa, cal una mida mostral molt gran per detectar l'efecte fenotípic. En tots els estudis inclosos en aquest treball hem considerat valors de MAF sempre superiors a 0,1, ja que el poder estadístic de la nostra mostra és limitat. És possible, per tant, que certs polimorfismes amb freqüències al·lèliques inferiors a 0,1 i realment associats a la malaltia no hagin estat considerats en l'estudi. En els nostres estudis ens hem basat, doncs, en la hipòtesi malaltia comuna – variant comuna (CDCV). La hipòtesi malaltia comuna – variant rara (CDRV) requereix una mida mostral molt gran per detectar associacions amb variants amb baixa freqüència, i de fet el percentatge de variants de tipus SNP amb una freqüència inferior al 10% que s'han trobat associats a fenotips concrets en estudis GWAS és molt baix.

### *Errors de genotipació*

Comparat amb els estudis d'associació familiars, els estudis d'associació poblacionals són més vulnerables a errors de genotipació, ja que no és possible la detecció d'errors tècnics mitjançant l'anàlisi de segregació (Abou-Sleiman *et al.*, 2006). Aquests darrers

anys, en general els estudis d'associació comporten la genotipació d'un elevat nombre de polimorfismes (generalment SNPs) en una gran quantitat de mostres. Es poden donar errors en l'assignació de genotips a petita escala que són independents del fenotip i que en conseqüència no solen afavorir l'aparició de falsos positius (Gordon & Finch, 2005; Pompanon *et al.*, 2005; Abou-Sleiman *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2008). Per tal de controlar la fiabilitat dels resultats obtinguts en processos de genotipació automatitzada és habitual la inclusió de mostres duplicades entre plaques, la utilització de controls interns amb genotips coneguts (individus genotipats al Centre d'Étude du Polymorphisme Humain, CEPH), la utilització de controls negatius i la seqüenciació d'alguns individus per tal de comprovar l'assignació correcta dels al·lels (Abou-Sleiman *et al.*, 2006), totes elles emprades en els nostres estudis. A més, per tal de detectar possibles errors de genotipació sistemàtics s'ha mesurat l'equilibri Hardy-Weinberg (HWE) a la mostra control, sota l'assumpció que una elevada taxa d'error genera desequilibri (Pompanon *et al.*, 2005), i hem eliminat dels nostres estudis aquells polimorfismes que no estan en equilibri.

L'exclusió de SNPs a causa de problemes tècnics durant la genotipació implica necessàriament que la cobertura genètica d'alguns dels gens candidats estudiats no és total, situació que pot conduir a falsos negatius. En els nostres estudis, la cobertura mitjana dels gens estudiats ha estat d'un 82,5% (82,2% article 2 i 82,9% a l'article 3). Alguns gens s'han cobert totalment (100%) i a la majoria dels restants s'han assolit cobertures genètiques bastant elevades. En només alguns casos la cobertura ha estat molt baixa (<25%), però ha arribat a suposar un problema greu en la cobertura de dos gens (*DRD4* i *NAPA*), que han hagut de ser exclosos dels estudis (0%).

### *Estimació d'haplotips*

Els estudis d'associació que hem dut a terme entre la dependència de cocaïna i diversos gens candidats inclouen l'anàlisi de polimorfismes genètics aïllats i l'anàlisi d'haplotips o combinacions de diverses variants en el mateix gen. Donat que l'enfoc triat és poblacional, amb individus no emparentats, no s'han genotipat els progenitors dels individus, i per tant no és possible establir la fase durant el procés de construcció dels haplotips. Per tal d'estimar les fases és necessari recórrer a mètodes estadístics, tot assumint un determinat nivell d'incertesa. En aquest treball hem emprat els programes UNPHASED (Dudbridge, 2003) per a la identificació dels haplotips de risc per a la malaltia i PHASE (Stephens *et al.*, 2001) per a l'assignació d'haplotips específics a cada individu. L'assignació d'haplotips específics es realitza per tal de poder avaluar diferències en la freqüència d'individus portadors de l'haplotip de risc identificat (una o dues còpies) en casos i controls, i també per emprar d'altres dades individuals a

les anàlisis (edat, subgrups fenotípics, etc). Aquesta darrera estimació es pot realitzar mitjançant dues estratègies: 1) Estimar simultàniament els haplotips en casos i controls, opció que dona una millor estimació sota la hipòtesi de no associació però comporta l'aparició de falsos negatius o 2) estimar els haplotips en casos i controls per separat, assumint un major nombre de falsos positius (Balding, 2006). En els nostres estudis ens hem decantat per l'estimació simultània en casos i controls per tal d'evitar falsos positius. A més, un cop identificat l'haplotip de risc (mitjançant UNPHASED) i estimats els haplotips específics per a cada individu (mitjançant PHASE), hem avaluat el risc de patir el fenotip de dependència dels portadors de l'haplotip, hem corregit per l'efecte de l'edat i, finalment, hem avaluat també un fenotip dicotòmic relacionat (absència i presència de símptomes psicòtics) i un fenotip continu (temps en desenvolupar dependència).

#### *Correccions per múltiples comparacions*

Els estudis d'associació cada cop inclouen més variants polimòrfiques i això comporta que el número de comparacions que es realitzen també augmenti, i amb aquest la probabilitat de detectar associacions per l'efecte de l'atzar (falsos positius). Cal, per tant, establir llimars de significació més rigorosos que tinguin en compte el número de tests realitzats, però no hi ha un mètode universal per establir aquests nous límits. Correccions molt rigoroses limiten molt l'aparició de falsos positius però alhora afavoreixen l'aparició de falsos negatius, i amb les correccions molt dèbils s'esdevé justament el contrari. En els nostres estudis hem utilitzat les següents metodologies:

- Correcció de Bonferroni: És un mètode simple però conservador que requereix la independència dels tests. S'estableix un nou llimar de significació ( $\alpha$ ) segons el nombre de tests independents realitzats ( $n$ ) seguint la relació  $\alpha' = \alpha/n$ , amb  $\alpha = 0.05$ . És un mètode de correcció molt astringent i que assegura una probabilitat de falsos positius no superior al 5% en cadascuna de les comparacions. No obstant, en la majoria d'estudis s'analitzen variants dins d'un mateix gen amb un cert grau de LD entre elles, i llavors els tests no són totalment independents. En conseqüència s'està aplicant un excés de rigor i s'afavoreix l'aparició de falsos negatius (Curran-Everett, 2000; Colhoun *et al.*, 2003; Abou-Sleiman *et al.*, 2006). En aquest treball hem aplicat en alguns casos la correcció de Bonferroni, però també s'han aplicat altres mètodes de correcció per tal de no rebutjar associacions potencialment significatives.

- *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 (valors de

P) i discrimina entre la distribució uniforme (hipòtesi nul·la) i aquells valors que se'n desvien (hipòtesi alternativa), ajustant el nivell de significació.

- Correccions per permutacions: Assigna el fenotip de manera aleatòria mantenint les dades genotípiques per generar grups de dades que mantenen l'estructura de desequilibri de lligament però que compleixen la hipòtesi nul·la de no associació amb el fenotip. Aquest procés es realitza múltiples vegades (de l'ordre de milers) i s'obtenen nous valors ajustats de significació que es comparen amb el valor  $\alpha$ . L'avantatge és que aquest tipus de correcció es pot aplicar quan les comparacions són independents o quan estan relacionades.

En els nostres estudis (articles 2 i 3 dels capítols 1 i 2, respectivament), hem aplicat en general les correccions estadístiques de la següent manera: 1) correccions per FDR en l'anàlisi d'un sol marcador; 2) correccions per permutacions en els polimorfismes que passaven les correccions per FDR en l'anàlisi d'un sol marcador; 3) correccions per permutacions en l'anàlisi de marcadors múltiples; 4) correcció de Bonferroni en les anàlisis amb portadors de l'haplotip de risc en els diferents subgrups estudiats.

En el cas de l'estudi de l'article 1 (capítol 1), el número limitat de polimorfismes analitzat no permetia aplicar la correcció FDR, i per tant es va aplicar la correcció de Bonferroni.

#### *Variables de confusió*

En els estudis d'associació cal tenir en compte certes variables no relacionades amb el fenotip que poden donar lloc a l'aparició de falsos positius quan estan distribuïdes diferencialment en casos i controls. En els nostres estudis vam considerar com a variable de confusió l'edat, ja que diferia significativament en casos i controls. Les mitjanes d'edat del grup control eren considerablement diferents en cadascun dels estudis, ja que les mostres controls emprades no van ser exactament les mateixes. Així, en el cas dels estudis que es presenten al capítol 1 la mitjana d'edat dels controls era molt similar a la dels casos, però tot i així diferien significativament. En el cas de l'estudi presentat al capítol 2 la mitjana d'edat dels casos era significativament molt superior a la dels controls. No obstant, en tots els estudis es va considerar l'edat com a covariable i els valors P significatius obtinguts continuaven sent-ho després de fer l'ajust corresponent.

#### *Interaccions gen-gen*

De forma general, els gens no actuen de forma aïllada, sinó a través de xarxes d'interacció complexes que impliquen interaccions gen-gen i gen-ambient, de tal manera que s'ha argumentat que els estudis d'associació, tal com estan plantejats en l'actualitat són simplistes i reduccionistes (Colhoun *et al.*, 2003). L'epistasi és l'efecte emmascarant pel qual una variant o al·lel en un locus modifica l'efecte d'una altra variant en un altre locus. A nivell estadístic es refereix a una desviació de l'efecte additiu de dos al·lels de diferents *loci* respecte a la seva contribució al fenotip. Tot i que el descobriment d'efectes epistàtics en estudis d'associació pot tenir un valor limitat en el coneixement dels mecanismes biològics subjacents a la patologia, acceptar diferents tipus d'interacció entre *loci* potencialment implicats en la malaltia podria augmentar les probabilitats de detectar efectes genètics (Cordell, 2002). Actualment s'utilitzen diferents mètodes estadístics per detectar interaccions gen-gen que presenten avantatges i inconvenients (Musani *et al.*, 2007). La regressió logística és una aproximació molt emprada per avaluar interaccions gen-gen en variables discretes, i permet el modelatge directe de la relació matemàtica entre el fenotip i els diversos factors genètics (i també ambientals) de risc. En aquest treball no s'han analitzat possibles fenòmens epistàtics, ja que l'estratègia que considerem idònia és la d'avaluar aquests efectes quan diversos gens/variacions presenten associacions significatives amb el fenotip després d'aplicar correccions per múltiples comparacions, i en els nostres estudis només s'ha identificat un sol gen en cadascun dels estudis.

### *Mecanismes epigenètics*

Els mecanismes genètics expliquen els estats heretables que són conseqüència de canvis en la seqüència de DNA, mentre que els mecanismes epigenètics descriuen estats heretables que no depenen de la seqüència de DNA. A nivell molecular, els mecanismes epigenètics són canvis en el DNA i les proteïnes reguladores de l'expressió gènica que no modifiquen la seqüència de nucleòtids però que poden comportar el silenciament o l'activació de gens. S'han descrit quatre processos epigenètics principals: metilació i acetilació de DNA, remodelació de la cromatina, RNAs no codificants i edició de DNA i RNA (Strachan & Read, 2005; Mehler, 2008). En aquest sentit cal tenir en compte que la dependència de cocaïna és el resultat de la predisposició genètica a la dependència (i l'exposició a factors ambientals), però també en gran mesura als canvis a llarg termini que provoca la cocaïna sobre el cervell, entre els quals hi ha alteracions en l'expressió gènica. Un estudi molt interessant (Renthal *et al.*, 2009) analitzava els canvis a la cromatina a nivell genòmic en el NAc induïts per l'exposició perllongada de ratolins a la cocaïna, tot identificant molts canvis en la metilació i acetilació de certs gens altament implicats en l'efecte de potenciació a llarg termini o LTP (entre els quals trobem



l'efecte en com a mínim una segona població. En molts casos els estudis de rèplica no aconsegueixen reproduir els resultats inicials, ja sigui per la diferent composició ètnica de les poblacions estudiades, pels problemes derivats de la mida mostral o d'altres factors. Aquestes troballes són essencials per establir la credibilitat d'una associació genotip-fenotip (Chanock *et al.*, 2007), ja que permeten distingir els falsos positius dels senyals realment positius que han de continuar essent estudiades per identificar la variant responsable (Abou-Sleiman *et al.*, 2006; Chanock *et al.*, 2007). Actualment la inclusió d'una rèplica en els estudis d'associació està esdevenint un requisit necessari per a moltes revistes científiques per tal de donar força als resultats obtinguts. No obstant, en els nostres treballs no hem realitzat encara aquests estudis per la dificultat de reclutar en poc temps una mostra suficientment gran d'individus dependents de cocaïna. Tampoc s'ha publicat fins al moment cap estudi d'associació amb la dependència de cocaïna amb una rèplica. En qualsevol cas, el número encara reduït de publicacions que hi ha sobre la base genètica de la dependència de cocaïna dóna valor als estudis que presentem i justifica la seva ràpida divulgació a la comunitat científica. Finalment, hem observat en els nostres treballs el problema de les comparacions amb estudis anteriors centrats en els mateixos gens, a causa de la selecció diferent de polimorfismes que s'ha fet en molts casos.

## 1.2. SISTEMA DOPAMINÈRGIC I DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA

El sistema dopaminèrgic juga un paper molt important en la dependència de cocaïna, ja que està àmpliament descrit com a principal mediador de l'efecte de recompensa i reforç d'aquesta droga. L'alliberació de dopamina al sistema mesolímbic implica l'activació de la sensació de plaer i recompensa en resposta a estímuls naturals, així com als induïts per les drogues. Donat que no tots els individus esdevenen addictes a les drogues o a certs comportaments, es creu que hi ha d'haver certs condicionants biològics variables (especialment en l'activitat de les vies dopaminèrgiques), que actuarien com a factors de risc. D'acord amb la hipòtesi hipodopaminèrgica o "la síndrome de deficiència de recompensa" (Comings & Blum, 2000), una baixa activitat basal de la neurotransmissió dopaminèrgica (ja sigui deguda a una elevada recaptació de dopamina per les neurones presinàptiques, a la degradació del neurotransmissor, o a una baixa densitat de receptors dopaminèrgics a les neurones postsinàptiques), podria predisposar a la dependència de cocaïna.

En aquest treball s'han analitzat exhaustivament els gens relacionats amb el sistema dopaminèrgic mitjançant estudis d'associació de tipus cas-control entre la patologia i polimorfismes situats en gens candidats.

Per això vam seguir dues estratègies: 1) Inicialment es van considerar polimorfismes, en alguns casos amb efectes funcionals, estudiats prèviament en d'altres poblacions que es trobaven en els gens que codificaven el transportador de dopamina (DAT), el receptor D2 de dopamina (DRD2) i l'enzim dopamina-beta-hidroxilasa (DBH), implicat en la síntesi d'aquest neurotransmissor. Aquests polimorfismes es van genotipar utilitzant metodologies experimentals manuals, ja que en alguns casos no era possible la genotipació automatitzada (com és el cas de les VNTRs i les insercions i delecions). 2) Es van seleccionar polimorfismes de tipus SNP en aquests tres gens així com en la resta de receptors dopaminèrgics i els enzims implicats en la degradació i síntesi de la DA. En aquest cas es van seguir criteris de cobertura genètica i es va genotipar de forma automatitzada utilitzant la plataforma SNPlex (Tobler *et al.*, 2005).

Cal esmentar que els estudis realitzats prèviament en gens del sistema dopaminèrgic tenen sovint limitacions importants i són difícilment comparables amb els nostres: molts d'ells s'han realitzat en poblacions d'origen no caucàsic, i en alguns casos amb individus d'orígens diversos i amb possible estratificació poblacional (Gelernter *et al.*, 1999a; Guindalini *et al.*, 2005; Messas *et al.*, 2005; Guindalini *et al.*, 2006; Guindalini *et al.*, 2007; Guindalini *et al.*, 2008). En el nostre cas la població és caucàsica i de nacionalitat espanyola, i es va descartar la presència d'estratificació poblacional. D'altra banda, el nombre de gen candidats i polimorfismes estudiats en aquests treballs previs és molt limitat. En el segon estudi del nostre treball es va seguir una estratègia exhaustiva en la selecció de gens i de polimorfismes, tot cobrint la pràctica totalitat de la via dopaminèrgica (transportador de DA, receptors i enzims implicats en la síntesi i degradació). També cal esmentar que a excepció dels estudis de Guindalini i col. (2006 i 2008) i Messas i col. (2005), que inclouen aproximadament 700 casos i 800 controls cadascun, la grandària mostral de les poblacions analitzades, inclosa la considerada en aquest treball (432 casos i 482 controls en el treball més ampli que hem realitzat), és limitada.

A continuació es discuteixen els resultats obtinguts per nosaltres i per altres autors en diversos gens del sistema de neurotransmissió dopaminèrgica:

*Transportador de Dopamina (DAT o SLC6A3)*

El transportador de dopamina (DAT) recapta la DA de l'espai sinàptic a la neurona



presinàptica, i és la principal diana de la cocaïna. En altres estudis d'associació amb dependència de cocaïna s'han analitzat quatre polimorfismes: una inserció/deleció a l'intró 14 del gen i tres VNTRs situats a l'intró 8 (Int8 VNTR), a 3'UTR (3'UTR VNTR) i fora dels límits del gen, a 10 kb del 3'UTR VNTR (37-bp VNTR). Tots, a excepció del polimorfisme Int8 VNTR, han donat resultats negatius en l'associació a dependència de cocaïna (Gelernter *et al.*, 1994; Guindalini *et al.*, 2006; Ballon *et al.*, 2007; Lohoff *et al.*, 2010), en concordança amb els resultats obtinguts a la nostra mostra pel polimorfisme 3'UTR VNTR.

En el cas del polimorfisme Int8 VNTR, es van detectar associacions nominals tant en l'estudi de Guindalini i col. (2006) com en el presentat en aquest treball. No obstant, l'associació descrita prèviament detectava una sobrerepresentació en casos de l'al·lel 6R (sis repeticions) i del genotip 6R/6R, mentre que a la nostra mostra era el genotip 5R/5R el que es va identificar com a sobrerepresentat en els pacients. Aquest estudi previ també descrivia aquest polimorfisme com a funcional, ja que identificaven diferències en els nivells de transcripció entre les dues variants mitjançant estudis de gen reporter, essent la variant 6R la que presentava nivells més baixos d'expressió que disminuïen encara més després d'un tractament amb cocaïna. Aquests resultats feien pensar que els individus portadors de 6R/6R tenien una resposta diferencial a través d'una alteració de l'expressió de DAT quan s'exposaven a cocaïna. El fet que els nostres resultats apuntin en una altra direcció fa pensar que aquesta podria no ser l'única variant funcional en aquest gen relacionada amb la dependència de cocaïna, o bé podrien tenir influència altres factors genètics en altres gens que no serien iguals a les dues poblacions (població brasilera d'origen divers que inclou nadius americans, africans i caucàsics vs població espanyola d'ètnia caucàsica).

Pel que fa als estudis d'associació que es presenten al segon article del capítol 1, en què vam avaluar 12 gens relacionats amb la neurotransmissió dopaminèrgica amb criteris de cobertura genètica mitjançant tagSNPs, els resultats no van permetre detectar cap variant associada a la dependència de cocaïna. Cal dir, però, que la cobertura assolida (78%) no és total després de descartar uns quants SNPs per raons tècniques, o perquè eren monomòrfics, no superaven una MAF del 10% o no estaven en equilibri Hardy-Weinberg a la població control.

### *Receptor de dopamina D2 (DRD2)*

El receptor de dopamina D2 s'expressa, entre d'altres regions cerebrals, al nucli estriat, NAC, VTA, amígdala i escorça. És el més abundant després dels receptors D1 i, contràriament a aquests, provoquen la disminució dels nivells d'AMPc. S'ha observat que els nivells de receptors D2 disminueixen en abusadors de cocaïna i persisteixen

entre 3 i 4 mesos després de la detoxificació (Volkow *et al.*, 1990; Volkow *et al.*, 1993; Volkow *et al.*, 1997). Els polimorfismes intrònics de tipus SNP *TaqIA* i *TaqIB* (detectables mitjançant l'enzim de restricció *TaqI*) analitzats en aquest treball, així com en d'altres estudis previs d'associació amb dependència de cocaïna (Noble *et al.*, 1993; Gelernter *et al.*, 1999b; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Lohoff *et al.*, 2010), s'han estudiat àmpliament en altres dependències de drogues, sobretot l'alcohol (Noble, 2000). A més, en el cas del polimorfisme *TaqIA* s'ha determinat una associació amb la densitat del receptor de DA, possiblement perquè està en desequilibri de lligament amb un polimorfisme funcional. L'al·lel minoritari A1 s'ha trobat associat amb un nombre reduït de llocs d'unió de la DA (Jönsson *et al.*, 1999) i s'ha descrit diverses vegades que està associat a un major risc d'abús i dependència de drogues (Persico *et al.*, 1996; Noble, 2000; Bowirrat & Oscar-Berman, 2005). És per això que s'ha relacionat aquest al·lel A1 amb la denominada "síndrome de deficiència de recompensa" (Blum *et al.*, 2000; Bowirrat & Oscar-Berman, 2005).

Tot i que aquestes variants s'han associat a la dependència d'altres drogues, els resultats negatius obtinguts pels dos polimorfismes en el nostre estudi concorden amb tots els estudis realitzats en dependència de cocaïna (Gelernter *et al.*, 1999b; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Lohoff *et al.*, 2010) a excepció del realitzat per Noble i col. (1993).

En l'estudi posterior inclòs en el capítol 1 (article 2) d'aquest treball en què s'estudia el gen segons criteris de cobertura genètica amb tagSNPs tampoc es van identificar variants associades a la dependència de cocaïna (cobertura assolida: 100%). En aquest estudi, dut a terme amb una mostra més extensa, els polimorfismes *TaqIA* i *TaqIB* no estaven inclosos, però *TaqIB* (rs1079597) presenta un desequilibri de lligament elevat amb un altre SNP que sí que s'ha genotipat (rs2283265,  $r^2=0,92$ ), i per tant es pot concloure que molt probablement *TaqIB* tampoc està associat a la dependència de cocaïna a la nova mostra. En canvi, el polimorfisme *TaqIA* (rs1800497), presenta un grau de desequilibri de lligament només moderat també amb aquesta variant (rs2283265,  $r^2=0,62$ ) i amb *TaqIB* ( $r^2=0,67$ ), de manera que no podem descartar que estigués associat al fenotip a la mostra ampliada.

#### *Receptors de dopamina D3 i D4 (DRD3 i DRD4)*

Els receptors de dopamina D3 i D4 estan inclosos en el grup denominat D2-like, són menys abundants que el D2 però actuen també disminuint els nivells de cAMP (al contrari que els receptors D1 i D5). Ambdós s'expressen en àrees del cervell com l'hipocamp i l'escorça, però D3 s'expressa també a NAc i nucli estriat dorsal, mentre que el D4 s'expressa a amígdala i hipotàlem.

Els estudis previs d'associació amb el gen *DRD3* s'han centrat en el polimorfisme de tipus SNP *Ball* (detectable mitjançant l'enzim de restricció *Ball*), amb resultats negatius (Freimer *et al.*, 1996; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Bloch *et al.*, 2009) a excepció de l'estudi realitzat per Comings i col. (1999). Aquest polimorfisme és el SNP exònic rs6280, inclòs en el segon treball d'aquesta Tesi i, de la mateixa manera que a l'estudi publicat prèviament, tampoc es va detectar associació amb el fenotip. L'estudi de Bloch i col. (2009) també analitzava, obtenint resultats negatius, 8 SNPs en aquest gen, dels quals 3 també han estat inclosos en el nostre treball (rs9825563, rs167770 i rs7625282) sense detectar tampoc associació. Per tant el nostre estudi no ha estat capaç de detectar variants en aquest gen associades amb la dependència de cocaïna (cobertura: 82%).

Pel que fa al gen *DRD4*, un altre estudi va analitzar un VNTR a l'exó 3 tot obtenint resultats negatius (Ballon *et al.*, 2007). En el nostre estudi, però, aquest gen no es va poder estudiar perquè els dos únics SNPs que es van genotipar no van funcionar per motius tècnics.

#### *Dopamina-beta-hidroxilasa (DβH)*

La dopamina-beta-hidroxilasa és un enzim implicat en la degradació de la DA ja que catalitza la seva conversió a noradrenalina (NE). Un estudi previ centrat en dos polimorfismes (Cubells *et al.*, 2000): inserció/deleció de 19 nucleòtids a la regió 5' no traduïda (*untranslated region, UTR*) del gen i un SNP sinònim a l'exó 2 (c.444 G>A, rs1108580) va detectar associació amb l'haplotip del-A en paranoia induïda per cocaïna. Aquest haplotip s'associava a més a baixos nivells plasmàtics de l'activitat de la dopamina-beta-hidroxilasa (Cubells *et al.*, 2000). No obstant, en el nostre estudi no es van detectar associacions significatives ni en considerar els dos polimorfismes per separat ni amb l'haplotip del-A.

Un altre polimorfisme de tipus SNP (-1021T>C, rs1611115) situat a la regió 5'UTR del gen, mostrava associació amb un increment de la propensió a paranoia al llarg del temps durant l'autoadministració de cocaïna (Kalayasiri *et al.*, 2007), es va analitzar amb resultats negatius en un altre estudi (Guindalini *et al.*, 2008), però no es va considerar en el nostre treball.

A l'estudi realitzat mitjançant cobertura genètica es va detectar associació nominal entre la dependència de cocaïna i el SNP rs6479643, situat a l'intró 6 del gen (cobertura: 86%). Aquest SNP no està en desequilibri de lligament amb cap dels dos SNPs estudiats prèviament (rs1611115 i rs1108580, valors de  $r^2$  de 0,02 i 0,12 respectivament). D'aquests dos SNPs, el rs1108580 (c.444G>A) és l'únic que presenta un elevat desequilibri de lligament amb algun polimorfisme genotipat en el nostre estudi (rs1548364,  $r^2=0,96$ ),

de manera que es podria predir el seu genotip a partir d'aquest i continuaria sense estar associat al fenotip en aquesta mostra més amplia.

#### *Tirosina hidroxilasa (TH)*

La tirosina hidroxilasa és l'enzim que catalitza la síntesi de L-DOPA (precursor de la DA) a partir de l'aminoàcid tirosina. Cap altre estudi previ ha considerat aquest gen com a candidat per a la dependència de cocaïna. En el nostre estudi es va detectar una associació nominal entre aquest fenotip i el SNP rs2070762, situat a l'intró 13 del gen (cobertura: 67%).

A la resta de gens analitzats en aquest treball relacionats amb la neurotransmissió dopaminèrgica (*DRD1*, *DRD5*, *COMT*, *DDC*, *MAOA*, *MAOB* i *TPH1*) no es va detectar associació entre les variants estudiades i la dependència de cocaïna.

### **1.3. SISTEMA SEROTONINÈRGIC I DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA**

El sistema serotoninèrgic també juga un paper molt important en els efectes de la cocaïna, i també en la recompensa i el reforç, tal i com demostren diversos estudis farmacològics i amb models animals. En aquest treball hem analitzat el transportador i receptors de 5-HT, així com enzims implicats en la seva síntesi i degradació, per determinar la seva possible contribució en el desenvolupament i manteniment de la dependència de cocaïna.

Estudis anteriors han analitzat alguns gens del sistema serotoninèrgic, principalment el transportador de serotonina (*SLC6A4*) i alguns receptors (*5-HT1B*, *5-HT3A* i *5-HT3B*) (Cigler *et al.*, 2001; Patkar *et al.*, 2001; Patkar *et al.*, 2002; Patkar *et al.*, 2004; Mannelli *et al.*, 2005; Enoch *et al.*, 2010) sense detectar associacions estadísticament significatives o obtenint resultats inconsistents entre diferents estudis (en el cas del polimorfisme LPR del *SLC6A4*). Cap d'aquests polimorfismes s'han inclòs en el nostre estudi, però tots aquests gens s'han analitzat en base a criteris de cobertura genètica sense detectar tampoc cap associació.

En el nostre estudi es va detectar associació amb el gen *5-HT1E* i la dependència de cocaïna, tant en l'anàlisi d'un marcador com en l'anàlisi de múltiples marcadors, identificant un haplotip de risc per a la malaltia. Tot i que en l'anàlisi d'un marcador el nivell de significació obtingut superava un llindar lax de FDR (20%), la correcció per

permutacions tant en aquesta anàlisi com en la de marcadors múltiples apunten a l'autenticitat de l'associació. A més, caldria esmentar que l'haplotip de risc d'aquest gen presentava associació amb un fenotip de dependència sense símptomes psicòtics induïts per la cocaïna, però no, en canvi amb la dependència en presència de psicosi. No obstant, donat que no hi ha diferències estadísticament significatives entre ambdós grups, és possible que la no detecció d'associació en el subgrup amb presència de símptomes psicòtics tingui relació amb la manca de poder estadístic. Els receptors postsinàptics 5-HT<sub>1E</sub> no s'han estudiat en relació a la cocaïna i se sap molt poc sobre les seves funcions específiques.

També es van identificar dues associacions nominals al gen 5-HT<sub>2A</sub>, que codifica un altre receptor de 5-HT. Els receptors 5-HT<sub>2A</sub> sí que s'han estudiat en relació a la cocaïna: els antagonistes d'aquest receptor inhibeixen la locomoció induïda per cocaïna, mentre que els agonistes l'augmenten (Davidson *et al.*, 2002; Filip *et al.*, 2004); d'altra banda, el tractament amb un antagonista de 5-HT<sub>2A</sub> bloqueja la restitució de la cerca de cocaïna en rates, sense modificar els seus efectes reforçants (Fantegrossi *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 2002; Filip *et al.*, 2006; Nic Dhonnchadha *et al.*, 2009).

S'ha de tenir en compte que tant els SNPs de l'haplotip de risc del gen 5-HT<sub>1E</sub> com els dos SNPs del gen 5-HT<sub>2A</sub>, en què s'ha identificat associació, estan situats en introns i probablement no tenen conseqüències funcionals, tot i que podrien estar en LD amb una variant desconeguda directament implicada en la predisposició genètica a la cocaïna.

No es van identificar associacions estadísticament significatives entre la dependència de cocaïna i cap dels altres gens estudiats, encara que cal tenir en compte que la cobertura en alguns d'aquest gens no és completa.

#### **1.4. FACTORS NEUROTRÒFICS I DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA**

S'ha descrit que els factors neurotròfics, i en especial les neurotrofines, juguen un paper important en les neuroadaptacions i plasticitat sinàptica induïda a llarg termini per la cocaïna, base del procés que va des del primer consum fins al consum regular, la compulsivitat i pèrdua de control i finalment la dependència. Així doncs, en el nostre treball s'ha estudiat variacions a les neurotrofines i els seus receptors i també en un altre factor neurotròfic (CNTF) i el seu receptor com a possibles factors de risc a la

predisposició a la dependència de cocaïna.

No obstant, no s'han detectat associacions que superin les correccions per tests múltiples. Si que s'han detectat, però, associacions nominals amb els gens que codifiquen les neurotrofines NGFR i NTF3, i els receptors NTRK2, NTRK3 i CNTFR. Un altre estudi previ avaluava la possible implicació d'un nou factor neurotròfic, el factor neurotròfic conservat de DA (CDNF), no estudiat en el nostre treball, en la dependència de cocaïna, però no observaven associació significativa amb cap dels marcadors analitzats (Lohoff *et al.*, 2009).

## 1.5. CONTROL DE LA NEUROSECRECIÓ SINÀPTICA I DEPENDÈNCIA DE COCAÏNA

La cocaïna té efectes directes o indirectes sobre diversos sistemes de neurotransmissió. Hi ha evidències farmacològiques, estudis de neuroimatge, estudis en models animals i estudis genètics que demostren la seva relació amb alteracions a llarg termini en el SNC relacionades amb l'abús i la dependència d'aquesta droga. És el cas dels sistemes dopaminèrgic, serotoninèrgic, noradrenèrgic, glutamatèrgic, gabaèrgic, colinèrgic i endocannabinoide. A més, la cocaïna té efectes sobre l'expressió de diversos gens implicats en la neurosecreció sinàptica. Per tot això, els gens implicats en la formació de les vesícules sinàptiques i la seva fusió amb la membrana neuronal es van considerar en el nostre estudi com a bons candidats a participar en la susceptibilitat a la dependència de cocaïna.

A l'estudi que es presenta al capítol 2 (article 3) s'ha identificat associació entre el gen que codifica el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF) i la dependència de cocaïna, tant en l'estudi d'un marcador com amb múltiples marcadors. A més es va observar que l'haplotip de risc d'aquest gen estava restringit al grup de pacients que desenvolupaven ràpidament la dependència de cocaïna (aparició de la dependència en 2 anys o menys des del consum inicial). Aquests resultats passaven un llindar més restrictiu de FDR (10%), i també seguien sent significatius després d'aplicar correccions per tests múltiples.

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) i

assegura la disponibilitat de quantitats suficients de SNARE pel manteniment del tràfic de membrana intracel·lular (Barszczewski *et al.*, 2008). NSF és essencial pel recanvi de les vesícules sinàptiques i modula la cinètica de l'alliberament de neurotransmissors a les sinapsis (Schweizer *et al.*, 1998; Littleton *et al.*, 2001; Malsam *et al.*, 2008), així com el tràfic entre la membrana plasmàtica i els endosomes i la unió de diversos receptors de membrana (entre els quals hi ha receptors dopaminèrgics, adrenèrgics i gabaèrgics (Nishimune *et al.*, 1998; Osten *et al.*, 1998; Song *et al.*, 1998; Cong *et al.*, 2001; Heydorn *et al.*, 2004; Bomberger *et al.*, 2005; Pontier *et al.*, 2006). L'alteració de la funció de NSF podria modular l'activitat dels sistemes de neurotransmissió implicats en l'efecte de la cocaïna i la dependència. A més, d'acord amb la hipòtesi de la síndrome de deficiència de recompensa (Comings & Blum, 2000), un mal funcionament podria comportar un efecte en el recanvi i disponibilitat de les vesícules sinàptiques de DA, alterant l'alliberament d'aquest neurotransmissor i donant lloc a una disminució de l'activitat dopaminèrgica.

També es van identificar associacions nominals amb els gens que codifiquen les sinaptotagmines (SYT1 i SYT2) i algunes complexines (CPLX1, CPLX2 i CPLX4). No es va identificar cap associació entre els altres gens estudiats i la dependència de cocaïna, amb l'excepció del gen *NAPA* que no es va poder estudiar perquè els dos únics SNPs que es van genotipar no van funcionar per motius tècnics.

## 1.6. ALTRES GENS ESTUDIATS PRÈVIAMENT

Diversos treballs previs han optat per gens candidats no considerats en els nostres estudis, com ara gens del sistema colinèrgic, opioide, endocannainoide, neuropèptids, enzims implicats en la síntesi i degradació de neurotransmissors, moduladors de l'activitat sinàptica, enzims detoxificants i ritmes circadians (veure taula 9 de la introducció). D'entre aquests estudis cal destacar les associacions positives identificades a diversos gens: subunitat  $\alpha 5$  del receptor d'acetilcolina nicotínic (*CHRNA5*; Grucza *et al.*, 2008), receptor delta opioide (*OPRD1*; Zhang *et al.*, 2008), receptor cannainoide 1 (*CNR1*; Ballon *et al.*, 2006; Zuo *et al.*, 2009)), prodinorfina (*PDYN*; Chen *et al.*, 2002; Dahl *et al.*, 2005b; Yuferov *et al.*, 2009), receptor de tipus 2 del neuropèptid Y (*NPY2R*; Wetherill *et al.*, 2008), receptor 3 de la tachiquinina (*TACR3*; Foroud *et al.*, 2008), homòleg 1 de homer de drosòfila (*HOMER1*; Dahl *et al.*, 2005a), glutatíon S-transferasa pi 1 (*GSTP1*; Guindalini *et al.*, 2005) i l'alcohol deshidrogenasa 4 (*ADH4*; Luo *et al.*, 2005).

## 2. EFECTE DE LA COCAÏNA I DEL L'ÈXTASI (3,4-METILENDIOXI-METAMFETAMINA, MDMA) SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA

### 2.1. CONSIDERACIONS SOBRE ELS ESTUDIS D'EXPRESSIÓ AMB MICROARRAYS I LA METODOLOGIA EMPRADA

Els estudis d'expressió gènica amb *microarrays* han estat durant anys una eina molt important per examinar l'expressió de milers de gens simultàniament i identificar grups de gens diferencialment expressat en diverses situacions. No obstant, és probable que en poc temps siguin desplaçats per metodologies més acurades com la seqüenciació a gran escala (*deep sequencing* o *next-generation sequencing*). Tot i que els *microarrays* són una bona eina de treball, hi ha nombrosos problemes tècnics i estadístics que sorgeixen durant els experiments i en l'anàlisi posterior dels resultats, i s'han desenvolupat diferents estratègies per corregir-los. Així, és important controlar la variabilitat entre les mostres, escollir tant la plataforma com els mètodes estadístics (entre els disponibles) que més s'adeqüin al nostre estudi i finalment validar els resultats obtinguts utilitzant un altre enfoc experimental.

#### *Tipus d'arrays d'expressió: un o dos colors*

En els xips (*arrays*) de dos colors les dues mostres de RNA que es comparen es marquen amb fluorocroms diferents i s'hibriden sobre el mateix xip tot competint per la sonda, per tal d'obtenir valors relatius de diferències d'expressió gènica en la comparació de les dues mostres. En els xips d'un color s'hibrida una sola mostra al xip i la comparació es realitza entre diferents xips, la qual cosa permet comparar dades d'expressió entre qualsevol nombre de condicions experimentals, no necessàriament dues. En aquest treball hem emprat xips d'un sol color per tal de comparar els tres grups experimentals inclosos en el nostre estudi. La plataforma escollida va ser *Affymetrix*, ja que els seus xips tenen l'avantatge d'una àmplia cobertura a nivell genòmic, a més d'utilitzar diversos parells de sondes per a cada transcrit, tot proporcionant diverses mesures independents per a cadascun d'ells.

#### *Variabilitat de les mostres*

Un aspecte molt important a controlar en els estudis d'expressió gènica és la variabilitat que pot sorgir deguda a les mostres, ja que d'aquesta en dependrà la fiabilitat i replicabilitat dels resultats obtinguts. En aquest sentit és important tenir en compte:



1) Control de la variabilitat deguda a les condicions metodològiques en el tractament i obtenció de les mostres; 2) Utilització de més d'una mostra per hibridar cada xip per evitar biaixos (*pools* de mostres); 3) Utilització de diverses rèpliques per a cada condició experimental; 4) Homogeneïtzació dels grups de manera que els diferents *pools* siguin similar entre ells.

En el dos estudis presentats en aquest treball s'ha procurat controlar aquestes variables:

En el primer estudi (capítol 3, article 4): 1) els diferents experiments en cultius cel·lulars es van realitzar sempre amb el mateix número de passades cel·lulars i les mateixes condicions metodològiques; 2) Es van emprar *pools* de tres plaques de cultiu cel·lular per hibridar cada xip; 3) Es van utilitzar tres rèpliques per a cada condició experimental, tot i que un nombre més elevat de rèpliques hagués estat recomanable

En el segon estudi (capítol 4, article 5): 1) Els ratolins es van sotmetre a les mateixes condicions experimentals i es van sacrificar en el mateix moment. La cirurgia i obtenció dels diferents tipus de teixit va ser realitzada per una única persona; 2) Es van emprar *pools* de 3 ratolins per hibridar cada xip, tot i que un nombre més elevat de mostres hagués estat també recomanable, però el tipus d'experiment feia difícil treballar amb una mida mostral més elevada; 3) Es van utilitzar tres rèpliques per condició (tres *pools* de tres animals cadascun). Un nombre més elevat de rèpliques hagués estat recomanable, però aquest es veu limitat en els experiments amb *microarrays* per l'elevat cost econòmic; 4) La mitjana d'adquisició de MDMA dels ratolins de cada *pool* era similar entre els tres *pools*, tot i que cal dir que en un dels *pools* la mitjana era lleugerament superior als altres dos.

#### *Control de qualitat dels xips*

La qualitat de la hibridació de les mostres de RNA amb els xips pot topar amb diversos problemes: degradació de la mostra, una hibridació no homogènia al llarg del xip o massa senyal. Hi ha diverses metodologies que permeten avaluar la qualitat dels xips (Konradi, 2005) i que s'han emprat en aquest estudi: 1) l'anàlisi de la imatge del xip ha de ser homogènia; 2) els valors del *background* o soroll de fons han de ser similars entre xips; 3) la proporció entre els nivells d'extrems 3' i 5' de les molècules de mRNA per valorar el grau de degradació; 4) la mitjana d'intensitat de senyal ha de ser similar entre xips; 5) menys d'un 5% d'*outliers* (valors d'intensitat d'hibridació molt allunyats de la resta) en els xips. En aplicar aquests filtres de qualitat als 27 xips del nostre segon experiment (capítol 4, article 5), un d'ells no superava el llindar establert i fou exclòs

de l'estudi. Vam repetir l'experiment d'hibridació utilitzant la mateixa mostra de RNA i aquest cop el nivell de qualitat va ser bo.

#### *Correcció del soroll de fons*

En l'ajust del soroll de fons es va considerar el soroll global, que consisteix a restar el soroll de fons, que correspondria a l'àrea que envolta cada punt d'expressió, de manera global. En els xips d'Affymetrix cada gen o transcrit està representat per un total de 22 sondes, la meitat de les quals són totalment homòlogues a la diana (sondes PM), mentre que l'altra meitat (sondes MM) tenen dos desaparellaments respecte a les sondes PM i en teoria no presenten hibridació amb el transcrit diana. En el cas que l'anàlisi es dugui a terme tenint en compte només les sondes PM de cada grup de sondes tot restant el valor d'intensitat degut a les sondes PM, l'ajust del soroll de fons no és necessari. En els nostres estudis, però, no es va considerar aquest tipus de correcció perquè pot induir a errors, ja que en ocasions les sondes MM poden presentar un cert nivell d'hibridació amb la mostra.

#### *Normalització de les dades*

Per tal de fer comparables les dades obtingudes dels diferents xips, aquestes s'han de normalitzar tot homogeneïtzant les inevitables diferències d'intensitat de senyal que sorgeixen per raons tècniques, com ara les variacions en la preparació de les mostres i l'escanejat dels xips, les diferències entre els xips (prèvies a la hibridació) i la interacció entre la sonda i la mostra. Per a la normalització, que evita l'aparició de falsos positius, es poden emprar diferents algorismes (Konradi, 2005).

La normalització es pot dur a terme prenent un xip com a referència, o bé utilitzant-los tots a la vegada: 1) GCOS (*GeneChip Operating Software*) escala els valors d'expressió de tots els gens de manera que la mitjana tingui el mateix valor entre els xips; 2) RMA (*Robust Multichip Average*) utilitza la normalització per quantils de tots els xips emprant un mètode no-paramètric (Bolstad *et al.*, 2003); 3) dChip (*DNA-Chip Analyzer*) utilitza uns grups de sondes que reconeixen gens d'expressió constant (com p.ex. les dels gens *housekeeping*) per determinar una corba de normalització, emprant un xip com a referència (Li & Hung Wong, 2001). Aquest últim mètode presenta alguns problemes ja que els gens *housekeeping* o d'altres que es puguin creure *a priori* invariables en realitat poden estar diferencialment expressats en les diferents condicions experimentals que es consideren. Per tant, és preferible la normalització en què es considera el conjunt dels xips abans que la utilització de grups de sondes suposadament invariants. A els estudis inclosos en aquest treball vam emprar el mètode RMA per a normalitzar les dades procedents dels diferents xips. A la figura 18 podem veure l'efecte de la

normalització de les dades en els 9 xips de les mostres corresponents al nucli dorsal de rafe abans (1) i després (2) de normalitzar, on s'observa que els quartils i les medianes queden anivellades.

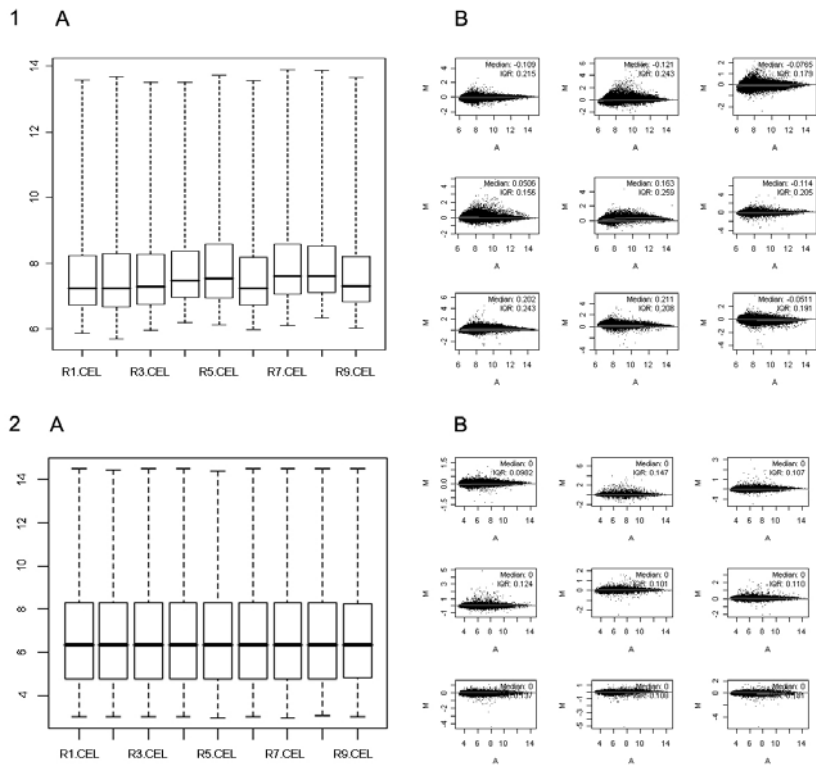
#### *Càlcul dels valors d'expressió de mRNA*

En el cas dels xips d'*Affymetrix*, hi ha 11 parells de sondes (11 PM i 11 MM) per a cada gen. S'ha descrit que la subtracció del senyal d'hibridació degut a les sondes MM no és una bona estratègia i dona lloc a una estimació de l'expressió amb una variància exagerada, raó per la qual alguns algoritmes ignoren els valors de les sondes MM (Irizarry *et al.*, 2003b; Wu *et al.*, 2004). Un cop obtingut el valor d'expressió de cada sonda (PM) o parella de sondes (PM-MM), tots els valors d'expressió per a cada mRNA es computen per obtenir el nivell d'expressió de cada gen. Hi ha diferents mètodes per calcular els valors d'expressió: 1) GCOS calcula els valors P dels senyals i de detecció per cada gen utilitzant les dades de PM i MM; 2) RMA utilitza valors naturals o log-transformats de PM (Irizarry *et al.*, 2003a); 3) GC-RMA utilitza valors log-transformats considerant les sondes PM i MM i 4) dChip calcula els valors d'expressió tant emprant només les sondes PM com les dades [PM-MM] (Li & Hung Wong, 2001; Li & Wong, 2001). En els nostres estudis vam considerar el mètode RMA perquè no té en compte els valors de MM.

#### *Filtració dels gens*

En els estudis d'expressió amb *microarrays* es realitzen un elevat nombre de tests estadístics (milers) i és necessària la correcció per tests múltiples per tal d'evitar l'aparició de falsos positius deguts a l'atzar. Quan el nombre de tests és molt gran i el nombre de gens diferencialment expressats és molt baix, aplicar mètodes de correcció per tests múltiples pot conduir a una disminució del poder estadístic per identificar-los. Els mètodes de filtració es poden emprar per tal de reduir el nombre de tests i així incrementar les probabilitats de detectar les diferències reals. Un mètode de filtració ideal exclouria els tests que són realment nuls (gens que es troben expressats de forma equivalent en les diferents condicions experimentals) i inclouria aquells que corresponen a gens que realment es troben diferencialment expressats (de forma significativa o no). És important, però, tenir en compte que aquesta filtració s'ha de realitzar a cegues respecte a les assignacions de condicions experimentals (Hackstadt & Hess, 2009). Hi ha diversos mètodes per tal de realitzar la filtració de gens:

- Filtració per senyal: es filtren gens que tenen un senyal similar al nivell del soroll de fons (o bé no s'expressen o s'expressen a nivells molt baixos).



**Figura 18.** Efecte de la normalització de les dades: comparació de les dades dels 9 xips de nucli dorsal de rafe 1) abans de normalitzar i 2) després de normalitzar pel mètode RMA. A) *Box plots*: gràfics en què s'observa la distribució dels valors d'expressió (escala logarítmica) de les dades a cada xip. La línia a cada caixa mostra el valor mig (o mediana) de distribució dels valors d'expressió de cada xip, la caixa correspon a la desviació estàndard i els límits de les línies de punts representen els valors extrems de la distribució. B) *MA plots*: gràfics en què la M és el quocient d'intensitat d'expressió i A la mitjana d'expressió per cada punt; s'obté un núvol de punts.

- Filtració per variabilitat o variància: s'exclouen els gens que presenten una baixa variància entre els xips (ignorant les assignacions experimentals a comparar). La raó és que l'expressió dels gens amb expressió equivalent no difereix en gran mesura entre els grups, encara que hi pot haver una petita variància general. Aquesta filtració normalment exclou de l'estudi un gran nombre de gens (de l'ordre del 50% o més) partint de la premissa que la majoria de gens no estaran diferencialment expressats.

- Filtració per detecció per MAS (Present/Absent): fa servir la informació de les parells de sondes PM i MM per determinar si l'expressió d'un gen és present o absent (o marginal). La idea de filtrar per detecció és que si un transcrit no està present en cap mostra no es pot trobar diferencialment expressat.

Els mètodes de filtració esmentats augmenten notablement el poder estadístic de la detecció de diferències d'expressió (Hackstadt & Hess, 2009). En els nostres estudis no vam considerar la filtració per detecció per MAS ja que, com s'ha esmentat anteriorment, podria induir erròniament a l'exclusió de gens que sí que s'expressen i es catalogarien com a absents degut a que les sondes MM poden presentar una certa hibridació específica amb la diana. En el cas de la filtració per variabilitat és important tenir en compte que la seva efectivitat depèn dels mètodes de pre-processament de

les dades i de la posterior correcció per tests múltiples (Hackstadt & Hess, 2009). Així, doncs, només és recomanable aplicar-la quan les dades es normalitzen mitjançant RMA i s'aplica el mètode de correcció de FDR, com és el cas dels nostres estudis. A més també es van descartar les sondes que corresponien a ESTs (seqüències expressades però no assignades a un gen concret) i gens no descrits, ja que es pretenia identificar candidats funcionals.

#### *Correcció per tests múltiples*

Quan es realitzen comparacions múltiples (en el cas dels *microarrays*, de l'ordre de milers) poden aparèixer nombrosos falsos positius que no estan realment associats als trets objecte d'estudi, i per tant és necessari aplicar algun mètode de correcció. També s'ha de tenir en compte que quan s'estableix un llindar per evitar els falsos positius (errors de tipus I) aquest afecta al nombre de falsos negatius (errors de tipus II). Com més astringent és aquest llindar menor és el nombre de falsos positius, però incrementa el de falsos negatius, per tant és important que hi hagi un equilibri. Hi ha diversos mètodes de correcció per tests múltiples però el més acceptat a la literatura per aplicar als estudis de *microarrays* és el *False Discovery Rate* o FDR (Pounds, 2006; Gusnanto *et al.*, 2007). En els estudis realitzats en aquest treball s'han aplicat diferents llindars de FDR. En el primer estudi realitzat cronològicament (capítol 4, article 5) vam establir un llindar força astringent de FDR del 5% (s'accepta un 5% dels positius com a falsos positius) que, tot i que *a priori* ens va semblar adient, vam comprovar després que dona lloc a l'aparició de falsos negatius (com és el cas dels gens diferencialment expressats i validats per qRT-PCR entre el consum actiu i passiu d'MDMA al nucli dorsal de rafe i identificats sota un llindar més lax de FDR del 15%). En el segon estudi, realitzat posteriorment (capítol 3, article 4), es va emprar un llindar intermedi entre els dos emprats en l'anterior estudi (FDR del 10%).

#### *Anàlisi bioinformàtica dels resultats*

Com a resultat de l'anàlisi dels estudis d'expressió amb *microarrays* s'obtenen habitualment llistats de centenars de gens diferencialment expressats que són difícils d'interpretar per extreure'n informació biològica. Hi ha moltes eines bioinformàtiques a l'abast que ajuden a manipular aquestes dades. En els nostres estudis vam emprar 3 anàlisis diferents:

- Agrupament dels gens en categories funcionals sobrerepresentades: per tal d'identificar categories funcionals en les quals s'englobaven aquests gens vam utilitzar el *software* DAVID (Huang Da *et al.*, 2008). Aquest *software* fa servir, entre d'altres, la base de dades *Gene Ontology*, molt utilitzada per aquests estudis, i permet identificar

les categories funcionals que estan significativament sobrerrepresentades (els gens d'una determinada categoria funcional estan diferencialment expressats amb més freqüència del que esperaríem per la seva abundància en el genoma) i ordenar-les segons el nivell de significació.

- Xarxes gèniques: per tal d'obtenir xarxes gèniques que relacionen gens positius en el nostre estudi i que permeten una visualització de la interacció entre ells i de la seva funció vam emprar el *software Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*.

- Llocs d'unió a factors de transcripció comuns: amb aquesta anàlisi s'obtenen prediccions de llocs d'unió a factors de transcripció que estan presents i sobrerrepresentats significativament als promotors dels gens positius de l'estudi.

#### *Tria de gens i validació dels resultats per qRT-PCR*

Per tal d'escollir gens candidats d'entre les categories funcionals i xarxes gèniques identificades per poder validar posteriorment l'expressió diferencial detectada en els xips, s'ha de tenir en compte la magnitud del canvi d'expressió mesurat a través del *Log Fold Change (LFC)*. Els gens candidats a ser validats han de presentar un canvi considerable en el nivell d'expressió ja que per una banda podria tenir més rellevància i per l'altra garanteix la validació. La PCR quantitativa a temps real (qRT-PCR), la metodologia més emprada actualment per validar experiments d'expressió en *microarrays*, és una tècnica fiable però té una sensibilitat relativament limitada quan les diferències d'expressió són petites, de manera que si el canvi que volem detectar és inferior o similar a la variabilitat de la tècnica, no serà possible validar els resultats. És per aquest motiu que un bon llindar per seleccionar gens per a la validació podria ser l'emprat en el nostre segon estudi (capítol 4, article 5), on el LFC era superior a 1,5, que equival a  $2^{1.5} = 2,8$  vegades de canvi real. Intentar validar resultats obtinguts per sota d'un canvi de doble o meitat pot ser difícil mitjançant qRT-PCR tenint en compte el número de rèpliques dels nostres estudis (3), com és el cas de la manca de validació obtinguda en el primer estudi (capítol 3, article 4).

## **2.2. EFECTE D'UN TRACTAMENT AGUT AMB COCAÏNA SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN CÈL·LULES SH-SY5Y DIFERENCIADES**

L'avaluació de l'efecte de la cocaïna sobre l'expressió gènica en cultius cel·lulars (*in vitro*) d'aquest treball té com a objectiu detectar alteracions en l'expressió gènica induïda per un tractament agut de cocaïna en un model de neurones dopaminèrgiques (SH-

SY5Y diferenciades). El model cel·lular emprat consisteix en una línia de neuroblastoma derivada de SK-N-SH, molt emprada en estudis de diferenciació neuronal i de la malaltia de Parkinson (Cheung *et al.*, 2009). Es pot induir la diferenciació d'aquestes cèl·lules amb àcid retinoic, donant lloc a una morfologia neuronal i a l'expressió de diferents marcadors neuronals i dopaminèrgics.

Es van realitzar assajos de citotoxicitat deguda a la cocaïna en aquestes cèl·lules (un cop diferenciades) però no es van observar efectes clars. A més, només es van identificar canvis en l'expressió gènica quan es mesurava l'expressió 6 hores després del tractament a 5µM de cocaïna, i no sota cap altra condició estudiada. S'han de tenir en compte algunes consideracions sobre la utilització d'aquesta línia cel·lular en assajos de toxicitat: les cèl·lules SH-SY5Y diferenciades amb àcid retinoic semblen ser menys susceptibles a la neurotoxicitat que les cèl·lules no diferenciades, i l'àcid retinoic podria afavorir la neuroprotecció, donant lloc a una elevada tolerància a la toxicitat en aquesta línia cel·lular (Cheung *et al.*, 2009). Per tal d'evitar aquest fenomen, un cop les cèl·lules s'havien diferenciat, el medi es va substituir per medi fresc sense àcid retinoic durant 24 hores abans del tractament amb cocaïna. No obstant, la neuroprotecció induïda per àcid retinoic podria haver influït en els resultats obtinguts en els nostres experiments, impedit la detecció de neurotoxicitat i de canvis en l'expressió gènica.

Un estudi realitzat *in vitro* per altres autors en cèl·lules progenitores neuronals humanes (Crawford *et al.*, 2006) avaluava les mateixes condicions experimentals considerades al nostre treball tot obtenint resultats molt diferents. En el nostre estudi no s'observaven diferències en l'expressió gènica 24 hores després del tractament amb cocaïna. En l'estudi esmentat identificaven canvis no només després de 24 hores, sinó també després de 48 hores. A més, al contrari que el nostre estudi, Crawford i col. (2006) identificaven com a categories funcionals principals la resposta immunològica i la resposta inflamatòria. En el nostre estudi, les principals categories funcionals identificades corresponien a processos com la regulació de la transcripció i l'expressió gènica, senyalització per MAPK i transport vesicular, en concordança amb diversos estudis realitzats en mostres *post-mortem* humanes i en models animals (Yuferov *et al.*, 2005; Lull *et al.*, 2008).

Les quatre xarxes gèniques millor puntuades en el nostre treball inclouen 10 dels 13 gens que es van seleccionar per validar, i que estan implicats en adaptacions neuronals i plasticitat sinàptica. No obstant, les diferències en el canvi d'expressió eren massa subtils al *microarray* (al voltant de  $\pm 1,6$  canvi real o *fold change*) i no van poder ser

validades per qRT-PCR. S'ha descrit una baixa correlació entre els *microarrays* i qRT-PCR en els gens amb canvis petits en l'expressió (Dallas *et al.*, 2005). Els canvis en l'expressió d'aquests gens s'haurien d'avaluar a diferents punts de temps després del tractament amb cocaïna i emprant més rèpliques, per tal de corroborar o descartar els canvis d'expressió induïts per la droga.

### **2.3. EFECTE DEL CONSUM ACTIU I PASSIU D'MDMA SOBRE L'EXPRESSIÓ GÈNICA EN UN MODEL ANIMAL**

L'avaluació de l'efecte de l'MDMA sobre l'expressió gènica en ratolins en el nostre estudi, tan en el consum actiu com en el passiu, té per objectiu detectar les alteracions degudes a l'efecte farmacològic de l'administració d'MDMA i també els canvis neuroadaptatius implicats en els processos d'aprenentatge de l'autoadministració d'aquesta droga. El model emprat consisteix en un paradigma en què el ratolí màster s'entrena per adquirir un comportament estable d'autoadministració d'MDMA, i està connectat a un ratolí que rep la mateixa dosi de droga de manera passiva i a un altre que rep infusions salines (paradigma d'autoadministració operant acoblat a control o *yoked-control operant paradigm*; veure caixa 6 de la Introducció). Aquest paradigma permet, a igualtat de dosis i condicions experimentals, avaluar l'efecte de l'administració activa i passiva de l'MDMA. La tria de les estructures cerebrals per a l'avaluació dels canvis d'expressió es va fer en funció de la seva implicació en els mecanismes de recompensa i control del consum i aprenentatge, i inclouen les principals vies dopaminèrgiques i serotoninèrgiques i les dianes farmacològiques de l'MDMA (nucli estriat, nucli dorsal de rafe, escorça prefrontal i hipocamp).

#### *Efecte directe de l'èxtasi sobre l'expressió gènica*

Els canvis observats en el nostre estudi induïts per l'efecte directe de la droga (comuns entre el consum actiu i passiu) demostren clarament l'alteració de gens implicats en la resposta immune i inflamatòria en totes les estructures analitzades. L'anàlisi de sobrerrepresentació de grups funcionals (en les tres estructures que pel nombre de gens positius obtinguts ho permetien) evidencia la participació de gens emmarcats en categories biològiques comunes a totes les estructures. Alguns d'aquests gens amb grans canvis d'expressió (amb canvis per sobre de 1,5 en el LFC, o bé 2,8 de canvi real) es van validar mitjançant qRT-PCR. Cal destacar la sorprenent sobreexpressió d'un gen, *Lcn2*, en totes quatre regions cerebrals (canvis d'entre 30 i 60 vegades en el nivell d'expressió, segons el teixit). Aquest gen codifica la lipocalina 2, que regula



l'astrocitosi en condicions inflammatòries i s'indueix després d'estrès crònic i tèrmic en regions implicades en recompensa (Krishnan *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009; Roudkenar *et al.*, 2009). A més, aquest gen es troba a totes les xarxes gèniques millor puntuades de les quatre estructures. També es va validar la sobreexpressió d'altres gens implicats en processos immunològics i inflamatoris tant en escorça prefrontal com hipocamp: *Ctla2a*, antígen 2- $\alpha$  del limfòcit T citotòxic; *Gbp2*, proteïna d'unió a guanilat 2; *Igtp*, GTPasa induïda per interferó gamma; *ligp1* i *ligp2*, GTPases 1 i 2 induïbles per interferó; *Tgtp*, GTPasa 1 específica de cèl·lula T. Tots aquests gens, a excepció de *Ctla2a*, codifiquen per GTPases induïdes per interferó gamma (INF- $\gamma$ ) i estan implicats en els processos cel·lulars mediat pel control de l'interferó sobre les respostes immunitàries i inflammatòries (Carlow *et al.*, 1998; Vestal *et al.*, 1998; Zerrahn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Miyairi *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2009). El gen *Ctla2a* codifica una proteïna inhibidora de proteïnases que a més s'ha descrit que té localització dendrítica i axonal i un possible paper en la funció neuronal (Denizot *et al.*, 1989; Luziga *et al.*, 2008).

Aquest efecte sobre la resposta immunitària i inflammatòria concorda amb altres estudis que demostren que l'MDMA provoca efectes neurotòxics, tot alterant el sistema immunitari (Connor, 2004; Torres *et al.*, 2010). El nostre estudi, que avalua l'efecte a llarg termini de la droga, dona resultats que difereixen dels obtinguts després d'una exposició aguda a MDMA en àrees corticals i nucli estriat, en què majoritàriament es trobaven alteracions en l'expressió de receptors serotoninèrgics, factors de transcripció i gens implicats en el citoesquelet i metabolisme (Thiriet *et al.*, 2002).

Una altra conseqüència directa de l'exposició a MDMA observada en el nostre estudi és la sobreexpressió de gens implicats en neuroadaptacions i plasticitat sinàptica, com *Slc17a7*, *Sgk1* i *Sgk3*. Es va validar la sobreexpressió en el nucli estriat ventral del gen *Slc17a7*, que codifica el transportador de glutamat vesicular 1 (Vglut1), implicat en el transport de glutamat i relacionat amb la plasticitat sinàptica i la transmissió excitatòria (Fremeau *et al.*, 2004). Aquesta troballa és consistent amb un estudi recent que mostra canvis en diversos transportadors glutamatèrgics i receptors després de l'administració repetida d'MDMA (Kindlundh-Hogberg *et al.*, 2008). Encara que el nucli estriat ventral està principalment format per neurones gabaèrgiques, també conté aferències glutamatèrgiques, i la presència incrementada de Vglut1 podria ser deguda als axons glutamatèrgics de cossos neuronals situats fora d'aquesta estructura cerebral. Els transcrits, un cop produïts al nucli de les neurones glutamatèrgiques, serien transportats cap als axons que innerven el nucli estriat ventral on es traduirien *in situ*, fenomen que s'ha descrit prèviament (Donnelly *et al.*, 2010; Wei, 2011). Dos gens també

implicats en neuroadaptacions i plasticitat sinàptica i validats en el nostre estudi en el nucli dorsal de rafe són *Sgk1* i *Sgk3*, que codifiquen les cinases regulades per sèrum/glucocorticoide 1 i 3, respectivament. Tots dos estan implicats en la consolidació de la memòria a l'hipocamp i en la regulació de la neurotransmissió glutamatèrgica (Boehmer *et al.*, 2003a; Boehmer *et al.*, 2003b; Boehmer *et al.*, 2005; Strutz-Seebohm *et al.*, 2005a; Strutz-Seebohm *et al.*, 2005b; Boehmer *et al.*, 2006). Això concorda amb evidències prèvies obtingudes en humans i en animals que mostren que l'MDMA indueix dèficits cognitius i relacionats amb la memòria (Reneman *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2001; Trigo *et al.*, 2008).

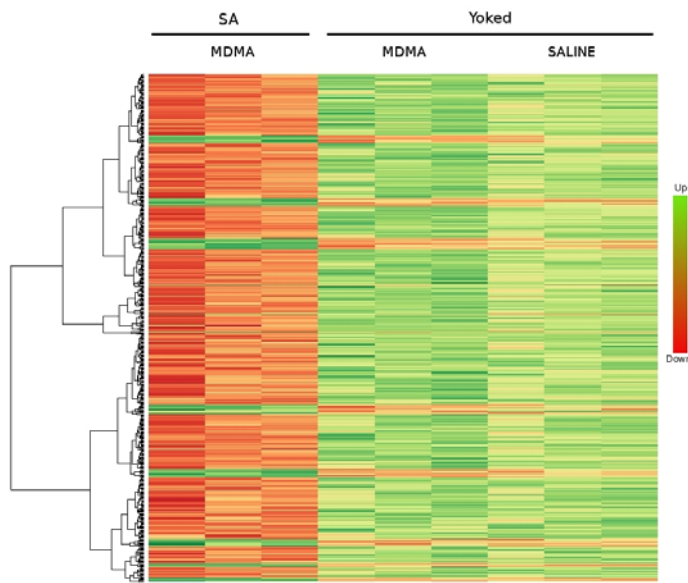
#### *Canvis d'expressió implicats en el consum actiu*

Un altre propòsit important del nostre estudi és la comparació dels canvis d'expressió entre el consum actiu i passiu relacionats amb els processos d'aprenentatge i memòria del consum actiu. Sota condicions restrictives de correccions per múltiples tests (FDR 5%) l'hipocamp va ser la única estructura en què es va observar un gran nombre de diferències significatives en els nivells d'expressió, fet que remarca el paper d'aquesta estructura en l'associació contextualitzada que es forma durant l'autoadministració activa d'MDMA. A més, aquests resultats concorden amb estudis previs que mostren que la preferència de lloc condicionada de la cocaïna (CPP) depèn de canvis moleculars que tenen lloc a l'hipocamp de rates entrenades, on també es posa de manifest el paper d'aquesta estructura en l'associació del context en què la droga és administrada (Tzschentke, 1998; Krasnova *et al.*, 2008). Sorprenentment, no es van observar canvis a l'escorça prefrontal, fet inesperat ja que està implicada en els processos complexos associats a l'aprenentatge requerits pel procés d'autoadministració.

Els gens diferencialment expressats en hipocamp en els ratolins que s'autoadministraven MDMA mostraven majoritàriament un patró de subexpressió comparat amb els ratolins que rebien la droga passivament i els ratolins que rebien una solució salina (Fig. 19). A més, el fet d'identificar gran part d'aquests gens en dues comparacions independents (actiu - passiu, i actiu - salí) i tots ells en la mateixa direcció reforça el seu paper. L'anàlisi de grups funcionals va permetre identificar categories biològicament significatives relacionades amb processos neuronals com sinapsi, neurotransmissió, regulació dels nivells de neurotransmissors, projecció axonal, plasticitat sinàptica, etc. No obstant, aquestes diferències eren subtils, i tot i que són difícils de validar mitjançant qRT-PCR per la poca magnitud del canvi d'expressió i la limitació de la tècnica, aquestes diferències podrien tenir un efecte funcional i biològic més important que grans canvis de determinats gens. Entre aquests gens hi ha diversos receptors de glutamat i altres

neurotransmissors, en què la seva expressió disminueix en un 30-40% en els ratolins que s'autoadministren MDMA. Aquesta disminució, tot i ser subtil, pot tenir un efecte considerable sobre la neurotransmissió. També es van identificar gens implicats en processos d'aprenentatge i memòria com *Ntrk2* (receptor neurotròfic tirosina cinasa, tipus 2), *Camk2a* (proteïna cinasa II alpha dependent de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina), *Gsk3* (cinasa glicogen sintasa) i *Akt1* (proto-oncogen 1 timoma viral), entre d'altres.

Per tal d'avaluar i validar canvis d'expressió relatius als processos d'aprenentatge de l'autoadministració ens vam centrar en gens que mostressin grans diferències d'expressió (LFC per sobre de 1,5 o per sota de -1,5). Com que només s'identificaven canvis d'expressió significatius després d'aplicar correccions per tests múltiples en hipocamp (amb excepció d'un gen al nucli dorsal de rafe) i no complien aquest requisit, es va canviar el llindar de FDR a un de menys restrictiu (del 5% al 15%). Aquest canvi de llindar va permetre identificar un número considerable de canvis en l'expressió gènica (61 gens positius) en el nucli dorsal de rafe comuns en les comparacions del consum actiu vs. consum passiu d'MDMA i consum actiu d'MDMA vs. solució salina. També va augmentar el nombre de canvis en hipocamp (645 gens positius) comuns en ambdues comparacions. No es va identificar cap gen a l'escorça prefrontal ni al nucli estriat ventral sota aquestes condicions. Curiosament, les xarxes gèniques millor puntuades en hipocamp i nucli dorsal de rafe contenen gens amb les mateixes categories funcionals: interacció i senyalització cèl·lula a cèl·lula i desenvolupament i funció del sistema nerviós. Hi ha evidències recents que indiquen que aquesta estructura (nucli dorsal de rafe) està implicada en la codificació de processos relacionats amb la recompensa (Nakamura *et al.*, 2008; Bromberg-Martin *et al.*, 2010). L'anàlisi de sobrerrepresentació de llocs d'unió a factors de transcripció, en canvi, no va permetre identificar mecanismes comuns que regulen la transcripció en l'administració activa de MDMA en ambdues regions. D'entre aquests gens positius, a l'hipocamp altra vegada cap gen presentava grans diferències d'expressió (LFC per sobre de 1,5 o per sota de -1,5), però al nucli dorsal de rafe es van identificar quatre gens funcionalment interessants: *Camk2a*, proteïna cinasa II alpha dependent de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina; *Kalrn*, Kalirina; *Ddn*, dendrina; *Egr3*, resposta a creixement primerenc 3 (*early growth response 3*). Tots ells tenen funcions relacionades amb neuroadaptacions i plasticitat sinàptica i es van validar per qRT-PCR. Curiosament, les xarxes gèniques millor puntuades en hipocamp i nucli dorsal de rafe contenen gens amb les mateixes categories funcionals: interacció i senyalització cèl·lula-cèl·lula i desenvolupament i funció del sistema nerviós. Hi ha evidències recents que indiquen que aquesta estructura (nucli dorsal de rafe) està implicada en la codificació de processos relacionats amb la recompensa



**Fig 19. Heat Map: administració activa vs passiva d'MDMA.** Canvis en l'expressió gènica en hipocamp després de l'administració activa i passiva d'MDMA i solució salina. Gens comuns entre les comparacions contingent-no contingent i contingent-salí. Els transcrits diferencialment expressats es troben majoritàriament subexpressats (vermell) en l'administració activa, en comparació amb els altres grups (verd). Imatge no publicada de l'article 5 (capítol 4).

(Nakamura *et al.*, 2008; Bromberg-Martin *et al.*, 2010). Aquests quatre gens codifiquen proteïnes implicades en la plasticitat sinàptica, canvis en la morfologia de les espines dendrítiques, i processos neuronals relacionats amb la memòria i l'aprenentatge (Guzowski, 2002; Li *et al.*, 2005; Kremerskothen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2007; Penzes & Jones, 2008; Yamagata *et al.*, 2009). Dos d'aquests gens (*Camk2a* i *Kalrn*) codifiquen proteïnes que estan implicades en la mateixa via de senyalització, que controla la plasticitat funcional i estructural de les espines dendrítiques (Chakrabarti *et al.*, 2005). A més tots dos gens apareixen a la xarxa gènica millor puntuada del nucli dorsal de rafe, en què la proteïna cinasa dependent de ras (ERK) és un node central i s'ha relacionat prèviament amb les propietats addictives de l'MDMA (Salzmann *et al.*, 2003). La Kalirina està també implicada en el creixement de les neurites a través de la senyalització del factor neurotròfic NGF (factor de creixement nerviós) (Chakrabarti *et al.*, 2005). A més, un altre membre de la família Egr (*Egr1*) se sobreexpressa a conseqüència de l'acció de l'MDMA a l'escorça prefrontal, el nucli estriat i l'hipocamp de rates (Shirayama *et al.*, 2000).

És particularment interessant la sobreexpressió del gen *Camk2a* que codifica per CaMKIIalpha, una proteïna cinasa dependent de  $Ca^{2+}$ /calmodulina. Aquesta proteïna intervé en la plasticitat sinàptica dependent d'activitat i és important per a la persistència del LTP i altres formes de plasticitat neural (Nestler, 2001). Estudis amb altres psicoestimulants, com la cocaïna mostren canvis diferencials en el LTP al sistema dopaminèrgic mesolímbic, segons si la droga va ser administrada activament o passiva. A més, l'autoadministració de cocaïna, però no infusions passives, produeixen LTP persistent al VTA, que es manté després de tres mesos d'abstinència, i a més,

aquesta alteració era resistent a entrenaments d'extinció de tres setmanes (Chen et al., 2008). Aquests resultats suggereixen que el consum voluntari de la droga induïx neuroadaptacions a llarg termini en el sistema dopaminèrgic que podrien estar darrera del comportament de cerca de droga i recaiguda després de llargs períodes d'abstinència que caracteritzen l'estat addictiu.

Els resultats del nostre estudi podrien indicar que el nucli dorsal de rafe té un paper en els processos d'aprenentatge i motivació necessaris per a l'autoadministració activa d'MDMA.

### 3. COCAÏNA I ÈXTASI: SUSCEPTIBILITAT GENÈTICA I CANVIS D'EXPRESSIÓ GÈNICA

Tant la cocaïna com l'MDMA, ambdues drogues psicoestimulants, comparteixen vies a través de les quals tenen els seus efectes (principalment l'activació dels sistemes dopaminèrgic i serotoninèrgic). Tot i que s'han utilitzat enfocaments experimentals molt diferents per avaluar a nivell genètic les bases de la dependència de cocaïna i el consum d'èxtasi, hem comparat els resultats obtinguts per una droga amb els obtinguts per a l'altra droga psicoestimulant (en aquest treball i en altres estudis previs), per tal d'avaluar la possible presència de mecanismes comuns i diferencials entre les dues substàncies.

Pel que fa a l'avaluació de gens de susceptibilitat a la dependència de cocaïna mitjançant estudis d'associació, difícilment es pot realitzar aquest tipus d'aproximació en el cas de l'èxtasi. Principalment perquè la dependència d'èxtasi encara és objecte de discussió (Degenhardt *et al.*, 2010). Hi ha estudis amb models animals que suggereixen que l'MDMA seria un reforçador menys potent que altres drogues, però no obstant té potencial addictiu. Tot i que la tolerància és present en consumidors d'èxtasi, i s'ha descrit que hi ha síndrome d'abstinència, no està clar si aquesta no seria en realitat el resultat dels efectes sub-aguts de l'èxtasi més que una síndrome d'abstinència real. Sí que s'ha identificat un ús compulsiu i escalat d'èxtasi, però molt pocs consumidors busquen tractament (Degenhardt *et al.*, 2010), fet que també dificulta l'obtenció de mostres d'individus que consumeixen èxtasi per tal de realitzar un estudi d'associació. D'altra banda, no hi ha estudis que demostrin que el consum d'èxtasi tingui un component heretable, tot i que ja s'han realitzat alguns estudis d'associació en consumidors d'èxtasi avaluant la possible contribució genètica a diversos aspectes cognitius i comportamentals relacionats amb el consum d'aquesta droga (Reneman *et al.*, 2006; Roiser *et al.*, 2006; Schilt *et al.*, 2009; Fagundo *et al.*, 2010; Scott *et al.*, 2010). Aquests estudis s'han centrat en els gens *5-HTT* (SERT) i *COMT*, i s'han observat en alguns casos correlacions entre genotips i alguns trets fenotípics (Roiser *et al.*, 2006; Schilt *et al.*, 2009; Fagundo *et al.*, 2010), resultats difícilment comparables als obtinguts en els nostres estudis. No obstant, és interessant que el receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub>, associat nominalment al nostre treball amb la dependència de cocaïna, s'ha estudiat en models animals tant en cocaïna com en MDMA. En ratolins sense receptors 5-HT<sub>2A</sub> se suprimeix l'auto-administració d'MDMA (Orejarena *et al.*, 2010), i l'administració d'antagonistes selectius per 5-HT<sub>2A</sub> atenua o elimina completament l'administració

en primats no humans (Liechti *et al.*, 2000; Fantegrossi *et al.*, 2002). Aquests resultats suggereixen que aquests receptors són crítics pel reforç induït per MDMA, però en canvi no afecta al reforç induït per cocaïna (Fantegrossi *et al.*, 2002; Fletcher *et al.*, 2002; Filip *et al.*, 2006). També s'ha demostrat que 5-HT<sub>2A</sub> juga un paper molt important en la recaiguda de la cerca d'MDMA i de cocaïna. El bloqueig selectiu dels receptors 5-HT<sub>2A</sub> eviten efectivament la recaiguda de la cerca d'MDMA en ratolins (Orejarena *et al.*, 2010), i atenuen la recaiguda de la cerca de cocaïna (Nic Dhonnchadha *et al.*, 2009). A més, també s'han observat canvis en la sensibilitat del receptor 5-HT<sub>2A</sub> després de l'abstinència de cocaïna (Carrasco & Battaglia, 2007; Carrasco *et al.*, 2007) i MDMA (Reneman *et al.*, 2002).

En el cas dels canvis d'expressió gènica induïts per MDMA i cocaïna cal tenir en compte que els dos estudis presentats en aquest treball (articles 4 i 5) són difícilment comparables, no només per les diferències en els models (*in vitro* / *in vivo*), sinó també perquè en el primer cas es tracta d'una administració aguda i en el segon cas d'una administració reiterada durant dies. No obstant, hi ha diferències clares entre les dues drogues quant a l'extensiva alteració de l'expressió de gens implicats en resposta immunitària i inflamatòria, que observem en el nostre segon estudi amb un model animal quan valorem l'efecte directe de l'MDMA sobre el cervell (capítol 4, article 5). Aquests resultats difereixen dels resultats obtinguts en el nostre estudi de la cocaïna en un model cel·lular neuronal (capítol 3, article 4) i en molts altres estudis realitzats en models animals i mostres humanes *post-mortem* (Yuferov *et al.*, 2005; Lull *et al.*, 2008). En canvi, en l'estudi de Crawford i col. (2006) sobre l'efecte de la cocaïna, també en cultius cel·lulars, sí que s'observaven canvis en l'expressió de gens implicats en la resposta immunitària i inflamatòria.

Curiosament, en el nostre estudi sobre la cocaïna (capítol 3, article 4), tot i que no validats, i en concordança amb d'altres estudis previs s'identifiquen canvis d'expressió en gens implicats en la via de senyalització de les MAPK (Yuferov *et al.*, 2005; Lull *et al.*, 2008), canvis que també s'observen a conseqüència de l'exposició a MDMA (Eun *et al.*, 2009).

En el cas de l'administració activa vs passiva en què en el nostre segon estudi en MDMA (capítol 4, article 5) s'observaven nombrosos canvis a l'hipocamp, hi ha una concordança amb altres estudis de cocaïna amb CPP (Krasnova *et al.*, 2008), en què també s'identificaven canvis a l'escorça prefrontal, tot i que el model emprat no era ratolí sinó rata. S'ha observat que en les dues drogues psicoestimulants es donen

canvis d'expressió gènica en gens implicats en LTP, canvis que estan en la base dels processos que condueixen al consum compulsiu i crònic. En el cas del gen *Camk2a*, un estudi recent descriu que canvis crònics induïts per l'autoadministració crònica de cocaïna provoquen l'activació d'aquest gen i això es correlaciona amb la motivació per la cocaïna i juga un paper essencial en el manteniment de la motivació per l'autoadministració (Wang *et al.*, 2010). A més, la kalirina-7 (codificada pel gen *Kalrn* i sobreexpressada en el nostre treball en el consum actiu d'MDMA) també sembla ser un determinant essencial per la formació d'espines dendrítiques després d'un tractament crònic de cocaïna (Ma, 2010). En el cas de la família *Egr*, en el nostre estudi en MDMA vam observar sobreexpressió de *Egr-3* i en un altre estudi sobreexpressió de *Egr-1* (Shirayama *et al.*, 2000). Aquests dos gens també se sobreexpressen en resposta a l'administració aguda i crònica a cocaïna (Jouvert *et al.*, 2002). Aquests resultats podrien apuntar a canvis comuns entre dues drogues que determinen la LTP.

A més, en el cas dels canvis observats a l'hipocamp en l'article 5 (capítol 4), tot i que no validats, la xarxa gènica millor puntuada inclou gens implicats en la neurosecreció sinàptica (*Cplx2*, *Stxbp1*, *Syp*), com també s'ha observat en cocaïna (Yuferov *et al.*, 2005; Lull *et al.*, 2008).



## 4. PERSPECTIVES FUTURES EN L'ESTUDI DE LES DROGUES

L'estudi de l'addicció a drogues es va centrar inicialment en l'efecte agut de les drogues d'abús. No obstant, cada cop hi ha més interès a identificar els canvis neuroadaptatius induïts per les drogues a llarg termini i que estan a la base, juntament amb la predisposició genètica, del pas del consum inicial al consum compulsiu, dependència i recaiguda. En aquest sentit és important d'una banda avaluar variants que predisposen a la dependència, i de l'altra la utilització de models animals adequats (com és el cas dels models animals d'auto-administració) que siguin més propers al consum actiu en humans per tal d'identificar aquests canvis neuroadaptatius. Ens centrarem en comentar les dues metodologies emprades en aquest treball: els estudis d'associació i els estudis d'expressió a nivell genòmic.

Per a l'anàlisi de variants de susceptibilitat en malalties complexes, com és el cas de la dependència de cocaïna, inicialment es consideraven algunes variants de gens candidats concrets que podrien tenir un efecte funcional. Posteriorment es van emprar criteris de cobertura genètica basats en LD, que implica l'anàlisi de variants no necessàriament funcionals. Actualment l'estudi de gens concrets ha obert pas a l'estudi de sistemes gènics que cobreixen vies funcionals completes, i des de fa uns anys s'ha ampliat a l'estudi de variants polimòrfiques que cobreixen tot el genoma (*Genomewide Association Studies*, GWAS) i que permeten l'anàlisi de la major part de la variabilitat existent. Aquesta darrera aproximació s'ha utilitzat ja en alguns estudis en dependència de drogues, en què s'han identificat gens interessants que participen en la susceptibilitat a la dependència, com ara *BDNF*, receptors de glutamat, *OPRD1*, *SEMA6D* i *NRXN2* (Uhl *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2008; Drgon *et al.*, 2010). D'altra banda, l'anàlisi de CNVs (variants de número de còpia), que contribueixen significativament a la diversitat genètica a les poblacions humanes i ja s'han relacionat amb alguns trastorns genètics, seria una aproximació interessant a incloure en aquests estudis. Podria ser útil també emprar la seqüenciació massiva d'exomes o de genomes per tal de detectar variants rares i treballar amb la hipòtesi CDRV, ja que fins ara només s'ha considerat la hipòtesi CDCV en els estudis d'associació. Per tal d'avançar en aquest tipus d'estudis és necessari l'obtenció de mostres més grans de casos i controls, que proporcionin un poder estadístic adequat.

Pel que fa als estudis transcriptòmics en dependència de drogues, la utilització dels *microarrays* serà substituïda molt aviat per altres tècniques més sensibles i fiables com

la ultraseqüenciació (*Deep Sequencing* o *Next-generation Sequencing*). Aquestes noves tecnologies, que s'han utilitzat fins ara principalment per seqüenciar exomes i genomes, comencen a fer-se servir per obtenir la seqüència de transcriptomes, tot aportant dades qualitatives (p.ex. informació sobre transcrits alternatius) i quantitatives (nivell d'expressió). Aquestes metodologies permeten detectar canvis més subtils, però que poden tenir efectes biològics rellevants, i que no són fàcilment detectables i validables mitjançant *microarrays* i qRT-PCR.

Finalment, la identificació de gens que contribueixen al desenvolupament del consum crònic o a la dependència, mitjançant qualsevol aproximació genètica, pot permetre identificar dianes terapèutiques per al seu tractament. En el cas dels psicoestimulants, a diferència d'altres drogues com l'heroïna, encara no hi ha tractaments farmacològics realment efectius, tot i que hi ha alguns fàrmacs prometedors encara en fase experimental. A més, la constatació que les drogues produeixen efectes importants sobre l'expressió gènica que poden tenir conseqüències fenotípiques concretes a curt i llarg termini, és important perquè la societat i els consumidors en particular prenguin consciència dels efectes altament nocius d'aquestes substàncies.

# CONCLUSIONS

“Linda consiguió el soma que deseaba. A partir de entonces permaneció en su cuartito de la planta treinta y siete de la casa de apartamentos de Bernard, en cama, con la radio y la televisión constantemente en marcha, el grifo de pachulí goteando, y las tabletas de soma al alcance de la mano; allá permaneció, y, sin embargo, no estaba allá, en absoluto (...)”

*Un mundo feliz, Aldous Huxley*



---

S'ha avaluat la participació en la susceptibilitat a la dependència de cocaïna de 52 gens candidats mitjançant estudis d'associació cas-control de 446 variants polimòrfiques, seleccionades principalment en base a criteris de cobertura gènica:

1. L'estudi de rèplica de sis polimorfismes situats als gens del sistema dopaminèrgic *SCL6A3*, *DRD2* i *DBH* ha permès identificar associació nominal entre la variació Int8 VNTR a *SLC6A3*, que codifica el transportador de dopamina, i la dependència de cocaïna.
2. L'estudi de 55 variants polimòrfiques de vuit gens relacionats amb el sistema dopaminèrgic ha mostrat associació nominal entre les variants rs6479643 i rs2070762 dels gens *DBH* i *TH*, respectivament, i la dependència de cocaïna .
3. L'estudi de 108 variants polimòrfiques a 19 gens relacionats amb el sistema serotoninèrgic ha permès identificar un haplotip de risc al gen *5HT1E* associat a la dependència de cocaïna, que inclou els SNPs rs1408449 i rs9344666.
4. L'anàlisi de 156 variants polimòrfiques a 10 gens que codifiquen factors neurotròfics i els seus receptors ha permès identificar associació nominal entre els polimorfismes rs4073543, rs1147193, rs12595249, rs744994, rs998636, rs534561 i rs7036351 dels gens *NTF3*, *NTRK2*, *NTRK3*, *NGFR* i *CNTFR* i la dependència de cocaïna.
5. L'estudi de 121 variants polimòrfiques a 15 gens candidats que codifiquen proteïnes implicades en la regulació de la neurosecreció ha permès identificar un haplotip de risc al gen *NSF* format pels polimorfismes rsrs183211 i rs17698176 associat a la dependència de cocaïna i a l'aparició ràpida d'aquesta dependència (2 anys o menys des del primer consum).

S'ha avaluat l'efecte del tractament agut amb cocaïna sobre el transcriptoma de cèl·lules SH-SY5Y diferenciades a neurones dopaminèrgiques:

6. L'estudi de l'efecte agut de la cocaïna sobre l'expressió gènica mitjançant la comparació de cèl·lules no tractades i cèl·lules tractades amb la droga mostra alteracions en la transcripció de gens implicats en la regulació de la transcripció i expressió gènica, moviment cel·lular i adaptacions neuronals. Aquests resultats són encara preliminars, ja que tot i ser estadísticament significatius en els experiments de *microarrays*, no han pogut ésser validats mitjançant qRT-PCR.

S'ha avaluat l'efecte del consum actiu i passiu de MDMA en ratolins sobre el transcriptoma de quatre estructures del SNC: nucli estriat ventral, escorça frontal, nuclis dorsals del rafe i hipocamp:

7. L'estudi de l'efecte directe del MDMA sobre l'expressió gènica mitjançant la comparació de ratolins que reben una solució salina de forma passiva i ratolins que reben MDMA de forma passiva o activa, mostra alteracions en la transcripció de gens implicats principalment en la funció immunitària i en processos inflamatoris a les quatre estructures cerebrals estudiades:
  - El gen *Lcn2*, que codifica la lipocalina 2, una proteïna que regula l'astrocitosi en condicions inflamatòries, està sobreexpressat a les quatre estructures cerebrals en ratolins que reben MDMA de forma activa o passiva.
  - Els gens *Ctla2a*, *Gbp2*, *Igtp*, *ligp1* i *Tgtp*, que codifiquen proteïnes implicades en la resposta immunitària i en processos inflamatoris, se sobreexpressen a l'escorça prefrontal i a l'hipocamp com a conseqüència de l'administració activa o passiva de MDMA. El gen *ligp2*, amb una funció similar als anteriors, se sobreexpressa en les mateixes circumstàncies experimentals només a l'escorça prefrontal.
  - Els gens *Slc17a7* (transportador 1 de glutamat vesicular) i *Sgk1* (cinasa 1 regulada per sèrum i glucocorticoides) estan relacionats amb la plasticitat sinàptica i la neurotransmissió excitatòria, i se sobreexpressen després de l'administració activa o passiva de MDMA en el nucli estriat ventral o en els nuclis dorsals del rafe, respectivament.
8. La comparació entre el consum actiu i passiu d'MDMA ha permès identificar quatre gens que se sobreexpressen als nuclis dorsals del rafe com a conseqüència del consum actiu d'MDMA, tots ells implicats en la plasticitat sinàptica, els canvis en la morfologia de les espines dendrítiques i processos neuronals relacionats amb la memòria i l'aprenentatge: *Camk2a*, *Kalrn*, *Ddn* i *Egr3*. Aquesta troballa reforçaria la idea que aquesta estructura cerebral podria estar involucrada en el comportament de cerca activa d'MDMA, tot recolzant el potencial addictiu d'aquesta droga.

# BIBLIOGRAFIA

“Tal es el fin de todo el condicionamiento: hacer que cada uno ame el destino social del que no podrá librarse”

*Un mundo feliz, Aldous Huxley*





- About-Sleiman, P.M., Hanna, M.G. & Wood, N.W. (2006) Genetic association studies of complex neurological diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **77**, 1302-1304
- Acquas, E., Marrocu, P., Pisanu, A., Cadoni, C., Zernig, G., Saria, A. & Di Chiara, G. (2001) Intravenous administration of ecstasy (3,4-methylenedioxymethamphetamine) enhances cortical and striatal acetylcholine release in vivo. *Eur J Pharmacol* **418**, 207-211
- Akbarian, S., Rios, M., Liu, R.J., Gold, S.J., Fong, H.F., Zeiler, S., Coppola, V., Tessarollo, L., Jones, K.R., Nestler, E.J., Aghajanian, G.K. & Jaenisch, R. (2002) Brain-derived neurotrophic factor is essential for opiate-induced plasticity of noradrenergic neurons. *J Neurosci* **22**, 4153-4162
- Al-Sahli, W., Ahmad, H., Kheradmand, F., Connolly, C. & Docherty, J.R. (2001) Effects of methylenedioxymethamphetamine on noradrenaline-evoked contractions of rat right ventricle and small mesenteric artery. *Eur J Pharmacol* **422**, 169-174
- Albertson, D.N., Pruetz, B., Schmidt, C.J., Kuhn, D.M., Kapatos, G. & Bannon, M.J. (2004) Gene expression profile of the nucleus accumbens of human cocaine abusers: evidence for dysregulation of myelin. *J Neurochem* **88**, 1211-1219
- Albertson, D.N., Schmidt, C.J., Kapatos, G. & Bannon, M.J. (2006) Distinctive profiles of gene expression in the human nucleus accumbens associated with cocaine and heroin abuse. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2304-2312
- Alderson, R.F., Alterman, A.L., Barde, Y.A. & Lindsay, R.M. (1990) Brain-derived neurotrophic factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture. *Neuron* **5**, 297-306
- Altar, C.A., Boylan, C.B., Jackson, C., Hershenson, S., Miller, J., Wiegand, S.J., Lindsay, R.M. & Hyman, C. (1992) Brain-derived neurotrophic factor augments rotational behavior and nigrostriatal dopamine turnover in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11347-11351
- Altar, C.A., Boylan, C.B., Fritsche, M., Jackson, C., Hyman, C. & Lindsay, R.M. (1994) The neurotrophins NT-4/5 and BDNF augment serotonin, dopamine, and GABAergic systems during behaviorally effective infusions to the substantia nigra. *Exp Neurol* **130**, 31-40
- Altar, C.A., Cai, N., Bliven, T., Juhasz, M., Conner, J.M., Acheson, A.L., Lindsay, R.M. & Wiegand, S.J. (1997) Anterograde transport of brain-derived neurotrophic factor and its role in the brain. *Nature* **389**, 856-860
- Allan, A.M., Galindo, R., Chynoweth, J., Engel, S.R. & Savage, D.D. (2001) Conditioned place preference for cocaine is attenuated in mice over-expressing the 5-HT(3) receptor. *Psychopharmacology (Berl)* **158**, 18-27
- American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition. Washington, DC: American Psychiatric Association, 221-229
- Arenas, E. & Persson, H. (1994) Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo. *Nature* **367**, 368-371
- Backes, E. & Hemby, S.E. (2003) Discrete cell gene profiling of ventral tegmental dopamine neurons after acute and chronic cocaine self-administration. *J Pharmacol Exp Ther* **307**, 450-459
- Balding, D.J. (2006) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* **7**, 781-791
- Ballon, N., Leroy, S., Roy, C., Bourdel, M.C., Charles-Nicolas, A., Krebs, M.O. & Poirier, M.F. (2006) (AAT)

n repeat in the cannabinoid receptor gene (CNR1): association with cocaine addiction in an African-Caribbean population. *Pharmacogenomics J* **6**, 126-130

Ballon, N., Leroy, S., Roy, C., Bourdel, M.C., Olie, J.P., Charles-Nicolas, A., Krebs, M.O. & Poirier, M.F. (2007) 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* **144B**, 1034-1041

Bannon, M., Kapatos, G. & Albertson, D. (2005) Gene expression profiling in the brains of human cocaine abusers. *Addict Biol* **10**, 119-126

Bannon, M.J., Pruetz, B., Manning-Bog, A.B., Whitty, C.J., Michelhaugh, S.K., Sacchetti, P., Granneman, J.G., Mash, D.C. & Schmidt, C.J. (2002) Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine abusers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6382-6385

Bannon, M.J., Pruetz, B., Barfield, E. & Schmidt, C.J. (2004) Transcription factors specifying dopamine phenotype are decreased in cocaine users. *Neuroreport* **15**, 401-404

Barbacid, M., Lamballe, F., Pulido, D. & Klein, R. (1991) The trk family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochim Biophys Acta* **1072**, 115-127

Barbacid, M. (1995) Neurotrophic factors and their receptors. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 148-155

Barnes, N.M. & Sharp, T. (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **38**, 1083-1152

Barszczewski, M., Chua, J.J., Stein, A., Winter, U., Heintzmann, R., Zilly, F.E., Fasshauer, D., Lang, T. & Jahn, R. (2008) A novel site of action for alpha-SNAP in the SNARE conformational cycle controlling membrane fusion. *Mol Biol Cell* **19**, 776-784

Bartrup, J.T., Moorman, J.M. & Newberry, N.R. (1997) BDNF enhances neuronal growth and synaptic activity in hippocampal cell cultures. *Neuroreport* **8**, 3791-3794

Battaglia, G. & De Souza, E.B. (1989) Pharmacologic profile of amphetamine derivatives at various brain recognition sites: selective effects on serotonergic systems. *NIDA Res Monogr* **94**, 240-258

Baumann, M.H., Wang, X. & Rothman, R.B. (2007) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) neurotoxicity in rats: a reappraisal of past and present findings. *Psychopharmacology (Berl)* **189**, 407-424

Baylen, C.A. & Rosenberg, H. (2006) A review of the acute subjective effects of MDMA/ecstasy. *Addiction* **101**, 933-947

Belzung, C., Scarce-Levie, K., Barreau, S. & Hen, R. (2000) Absence of cocaine-induced place conditioning in serotonin 1B receptor knock-out mice. *Pharmacol Biochem Behav* **66**, 221-225

Bengel, D., Murphy, D.L., Andrews, A.M., Wichems, C.H., Feltner, D., Heils, A., Mossner, R., Westphal, H. & Lesch, K.P. (1998) Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* **53**, 649-655

Bergman, J., Madras, B.K., Johnson, S.E. & Spealman, R.D. (1989) Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **251**, 150-155

Berke, J.D., Paletzki, R.F., Aronson, G.J., Hyman, S.E. & Gerfen, C.R. (1998) A complex program of striatal gene expression induced by dopaminergic stimulation. *J Neurosci* **18**, 5301-5310

- Berkemeier, L.R., Winslow, J.W., Kaplan, D.R., Nikolics, K., Goeddel, D.V. & Rosenthal, A. (1991) Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron* **7**, 857-866
- Beveridge, T.J., Smith, H.R., Daunais, J.B., Nader, M.A. & Porrino, L.J. (2006) Chronic cocaine self-administration is associated with altered functional activity in the temporal lobes of non human primates. *Eur J Neurosci* **23**, 3109-3118
- Bjorklund, A. & Dunnett, S.B. (2007) Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci* **30**, 185-187
- Blakely, R.D., Berson, H.E., Fremeau, R.T., Jr., Caron, M.G., Peek, M.M., Prince, H.K. & Bradley, C.C. (1991) Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* **354**, 66-70
- Blesch, A., Grill, R.J. & Tuszynski, M.H. (1998) Neurotrophin gene therapy in CNS models of trauma and degeneration. *Prog Brain Res* **117**, 473-484
- Bloch, P.J., Nall, A.H., Weller, A.E., Ferraro, T.N., Berrettini, W.H., Kampman, K.M., Pettinati, H.M., Dackis, C.A., O'Brien, C.P., Oslin, D.W. & Lohoff, F.W. (2009) Association analysis between polymorphisms in the dopamine D<sub>3</sub> receptor (DRD<sub>3</sub>) gene and cocaine dependence. *Psychiatr Genet* **19**, 275-276
- Blum, K., Braverman, E.R., Holder, J.M., Lubar, J.F., Monastra, V.J., Miller, D., Lubar, J.O., Chen, T.J. & Comings, D.E. (2000) Reward deficiency syndrome: a biogenetic model for the diagnosis and treatment of impulsive, addictive, and compulsive behaviors. *J Psychoactive Drugs* **32 Suppl**, i-iv, 1-112
- Blundell, J.E. (1992) Serotonin and the biology of feeding. *Am J Clin Nutr* **55**, 155S-159S
- Blundell, J.E., Lawton, C.L. & Halford, J.C. (1995) Serotonin, eating behavior, and fat intake. *Obes Res* **3 Suppl 4**, 471S-476S
- Boehm, S.L., 2nd, Ponomarev, I., Jennings, A.W., Whiting, P.J., Rosahl, T.W., Garrett, E.M., Blednov, Y.A. & Harris, R.A. (2004) gamma-Aminobutyric acid A receptor subunit mutant mice: new perspectives on alcohol actions. *Biochem Pharmacol* **68**, 1581-1602
- Boehmer, C., Henke, G., Schniepp, R., Palmada, M., Rothstein, J.D., Broer, S. & Lang, F. (2003a) Regulation of the glutamate transporter EAAT1 by the ubiquitin ligase Nedd4-2 and the serum and glucocorticoid-inducible kinase isoforms SGK1/3 and protein kinase B. *J Neurochem* **86**, 1181-1188
- Boehmer, C., Okur, F., Setiawan, I., Broer, S. & Lang, F. (2003b) Properties and regulation of glutamine transporter SN1 by protein kinases SGK and PKB. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 156-162
- Boehmer, C., Rajamanickam, J., Schniepp, R., Kohler, K., Wulff, P., Kuhl, D., Palmada, M. & Lang, F. (2005) Regulation of the excitatory amino acid transporter EAAT5 by the serum and glucocorticoid dependent kinases SGK1 and SGK3. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 738-742
- Boehmer, C., Palmada, M., Rajamanickam, J., Schniepp, R., Amara, S. & Lang, F. (2006) Post-translational regulation of EAAT2 function by co-expressed ubiquitin ligase Nedd4-2 is impacted by SGK kinases. *J Neurochem* **97**, 911-921
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M. & Speed, T.P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185-193
- Bomberger, J.M., Parameswaran, N., Hall, C.S., Aiyar, N. & Spielman, W.S. (2005) Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J Biol Chem* **280**, 9297-9307

- Bowirrat, A. & Oscar-Berman, M. (2005) Relationship between dopaminergic neurotransmission, alcoholism, and Reward Deficiency syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **132B**, 29-37
- Breiter, H.C., Gollub, R.L., Weisskoff, R.M., Kennedy, D.N., Makris, N., Berke, J.D., Goodman, J.M., Kantor, H.L., Gastfriend, D.R., Riorden, J.P., Mathew, R.T., Rosen, B.R. & Hyman, S.E. (1997) Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron* **19**, 591-611
- Broderick, P.A., Hope, O., Okonji, C., Rahni, D.N. & Zhou, Y. (2004) Clozapine and cocaine effects on dopamine and serotonin release in nucleus accumbens during psychostimulant behavior and withdrawal. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**, 157-171
- Brody, A.L., Mandelkern, M.A., London, E.D., Childress, A.R., Lee, G.S., Bota, R.G., Ho, M.L., Saxena, S., Baxter, L.R., Jr., Madsen, D. & Jarvik, M.E. (2002) Brain metabolic changes during cigarette craving. *Arch Gen Psychiatry* **59**, 1162-1172
- Bromberg-Martin, E.S., Hikosaka, O. & Nakamura, K. (2010) Coding of task reward value in the dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* **30**, 6262-6272
- Brown, T.E., Forquer, M.R., Cocking, D.L., Jansen, H.T., Harding, J.W. & Sorg, B.A. (2007) Role of matrix metalloproteinases in the acquisition and reconsolidation of cocaine-induced conditioned place preference. *Learn Mem* **14**, 214-223
- Caine, S.B. & Koob, G.F. (1994) Effects of mesolimbic dopamine depletion on responding maintained by cocaine and food. *J Exp Anal Behav* **61**, 213-221
- Caine, S.B., Negus, S.S., Mello, N.K. & Bergman, J. (1999) Effects of dopamine D(1-like) and D(2-like) agonists in rats that self-administer cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **291**, 353-360
- Caine, S.B., Negus, S.S., Mello, N.K., Patel, S., Bristow, L., Kulagowski, J., Vallone, D., Saiardi, A. & Borrelli, E. (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**, 2977-2988
- Caine, S.B., Thomsen, M., Gabriel, K.I., Berkowitz, J.S., Gold, L.H., Koob, G.F., Tonegawa, S., Zhang, J. & Xu, M. (2007) Lack of self-administration of cocaine in dopamine D1 receptor knock-out mice. *J Neurosci* **27**, 13140-13150
- Cami, J. & Farre, M. (2003) Drug addiction. *N Engl J Med* **349**, 975-986
- Cardon, L.R. & Bell, J.I. (2001) Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* **2**, 91-99
- Carlezon, W.A., Jr., Boundy, V.A., Haile, C.N., Lane, S.B., Kalb, R.G., Neve, R.L. & Nestler, E.J. (1997) Sensitization to morphine induced by viral-mediated gene transfer. *Science* **277**, 812-814
- Carlow, D.A., Teh, S.J. & Teh, H.S. (1998) Specific antiviral activity demonstrated by TGTP, a member of a new family of interferon-induced GTPases. *J Immunol* **161**, 2348-2355
- Carr, C.M. & Munson, M. (2007) Tag team action at the synapse. *EMBO Rep* **8**, 834-838
- Carrasco, G.A. & Battaglia, G. (2007) Withdrawal from a single exposure to cocaine increases 5-HT<sub>2A</sub> receptor and G protein function. *Neuroreport* **18**, 51-55
- Carrasco, G.A., Van de Kar, L.D., Jia, C., Xu, H., Chen, Z., Chadda, R., Garcia, F., Muma, N.A. & Battaglia, G. (2007) Single exposure to a serotonin 1A receptor agonist, (+)8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin, produces a prolonged heterologous desensitization of serotonin 2A receptors in neuroendocrine neurons in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **320**, 1078-1086

- Carta, A.R., Gerfen, C.R. & Steiner, H. (2000) Cocaine effects on gene regulation in the striatum and behavior: increased sensitivity in D3 dopamine receptor-deficient mice. *Neuroreport* **11**, 2395-2399
- Castanon, N., Scearce-Levie, K., Lucas, J.J., Rocha, B. & Hen, R. (2000) Modulation of the effects of cocaine by 5-HT1B receptors: a comparison of knockouts and antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* **67**, 559-566
- Cigler, T., LaForge, K.S., McHugh, P.F., Kapadia, S.U., Leal, S.M. & Kreek, M.J. (2001) Novel and previously reported single-nucleotide polymorphisms in the human 5-HT(1B) receptor gene: no association with cocaine or alcohol abuse or dependence. *Am J Med Genet* **105**, 489-497
- Cole, J.C. & Sumnall, H.R. (2003) The pre-clinical behavioural pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA). *Neurosci Biobehav Rev* **27**, 199-217
- Colhoun, H.M., McKeigue, P.M. & Davey Smith, G. (2003) Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* **361**, 865-872
- Comings, D.E., Gonzalez, N., Wu, S., Saucier, G., Johnson, P., Verde, R. & MacMurray, J.P. (1999) Homozygosity at the dopamine DRD3 receptor gene in cocaine dependence. *Mol Psychiatry* **4**, 484-487
- Comings, D.E. & Blum, K. (2000) Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res* **126**, 325-341
- Cong, M., Perry, S.J., Hu, L.A., Hanson, P.I., Claing, A. & Lefkowitz, R.J. (2001) Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J Biol Chem* **276**, 45145-45152
- Connor, B. & Dragunow, M. (1998) The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Res Brain Res Rev* **27**, 1-39
- Connor, T.J. (2004) Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'Ecstasy'): a stressor on the immune system. *Immunology* **111**, 357-367
- Cordell, H.J. (2002) Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Hum Mol Genet* **11**, 2463-2468
- Couceyro, P., Pollock, K.M., Drews, K. & Douglass, J. (1994) Cocaine differentially regulates activator protein-1 mRNA levels and DNA-binding complexes in the rat striatum and cerebellum. *Mol Pharmacol* **46**, 667-676
- Courtin, C., Crete, D., Canestrelli, C., Noble, F. & Marie-Claire, C. (2006) Regulation of genes involved in dopamine transporter modulation by acute cocaine in rat striatum. *Neurosci Lett* **398**, 235-240
- Crabbe, J.C., Phillips, T.J., Buck, K.J., Cunningham, C.L. & Belknap, J.K. (1999) Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci* **22**, 173-179
- Crawford, F.C., Wood, M.L., Wilson, S.E., Mathura, V.S., Hollen, T.R., Geall, F., Kolippakkam, D.N. & Mullan, M.J. (2006) Cocaine induced inflammatory response in human neuronal progenitor cells. *J Neurochem* **97**, 662-674
- Crespi, D., Mennini, T. & Gobbi, M. (1997) Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine. *Br J Pharmacol* **121**, 1735-1743

- Cubells, J.F., Kranzler, H.R., McCance-Katz, E., Anderson, G.M., Malison, R.T., Price, L.H. & Gelernter, J. (2000) A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol Psychiatry* **5**, 56-63
- Cunningham, J.A. (2000) Remissions from drug dependence: is treatment a prerequisite? *Drug Alcohol Depend* **59**, 211-213
- Curran-Everett, D. (2000) Multiple comparisons: philosophies and illustrations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1-8
- Chakrabarti, K., Lin, R., Schiller, N.I., Wang, Y., Koubi, D., Fan, Y.X., Rudkin, B.B., Johnson, G.R. & Schiller, M.R. (2005) Critical role for Kalirin in nerve growth factor signaling through TrkA. *Mol Cell Biol* **25**, 5106-5118
- Chang, A.S., Chang, S.M., Starnes, D.M., Schroeter, S., Bauman, A.L. & Blakely, R.D. (1996) Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. *Brain Res Mol Brain Res* **43**, 185-192
- Chanock, S.J., Manolio, T., Boehnke, M., Boerwinkle, E., Hunter, D.J., Thomas, G., Hirschhorn, J.N., Abecasis, G., Altshuler, D., Bailey-Wilson, J.E., Brooks, L.D., Cardon, L.R., Daly, M., Donnelly, P., Fraumeni, J.F., Jr., Freimer, N.B., Gerhard, D.S., Gunter, C., Guttmacher, A.E., Guyer, M.S., Harris, E.L., Hoh, J., Hoover, R., Kong, C.A., Merikangas, K.R., Morton, C.C., Palmer, L.J., Phimister, E.G., Rice, J.P., Roberts, J., Rotimi, C., Tucker, M.A., Vogan, K.J., Wacholder, S., Wijsman, E.M., Winn, D.M. & Collins, F.S. (2007) Replicating genotype-phenotype associations. *Nature* **447**, 655-660
- Chausmer, A.L., Elmer, G.I., Rubinstein, M., Low, M.J., Grandy, D.K. & Katz, J.L. (2002) Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D2 receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* **163**, 54-61
- Chen, A.C., LaForge, K.S., Ho, A., McHugh, P.F., Kellogg, S., Bell, K., Schluger, R.P., Leal, S.M. & Kreek, M.J. (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**, 429-435
- Chen, B.T., Bowers, M.S., Martin, M., Hopf, F.W., Guillory, A.M., Carelli, R.M., Chou, J.K. & Bonci, A. (2008) Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* **59**, 288-297
- Chen, L., Segal, D.M., Moraes, C.T. & Mash, D.C. (1999) Dopamine transporter mRNA in autopsy studies of chronic cocaine users. *Brain Res Mol Brain Res* **73**, 181-185
- Chen, R., Tilley, M.R., Wei, H., Zhou, F., Zhou, F.M., Ching, S., Quan, N., Stephens, R.L., Hill, E.R., Nottoli, T., Han, D.D. & Gu, H.H. (2006) Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9333-9338
- Cheung, Y.T., Lau, W.K., Yu, M.S., Lai, C.S., Yeung, S.C., So, K.F. & Chang, R.C. (2009) Effects of all-trans-retinoic acid on human SH-SY5Y neuroblastoma as in vitro model in neurotoxicity research. *Neurotoxicology* **30**, 127-135
- Childress, A.R., Mozley, P.D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M. & O'Brien, C.P. (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am J Psychiatry* **156**, 11-18
- Dackis, C. & O'Brien, C. (2005) Neurobiology of addiction: treatment and public policy ramifications. *Nat Neurosci* **8**, 1431-1436
- Dackis, C.A. & Gold, M.S. (1985) New concepts in cocaine addiction: the dopamine depletion hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev* **9**, 469-477

- Dahl, J.P., Kampman, K.M., Oslin, D.W., Weller, A.E., Lohoff, F.W., Ferraro, T.N., O'Brien, C.P. & Berrettini, W.H. (2005a) Association of a polymorphism in the *Homer1* gene with cocaine dependence in an African American population. *Psychiatr Genet* **15**, 277-283
- Dahl, J.P., Weller, A.E., Kampman, K.M., Oslin, D.W., Lohoff, F.W., Ferraro, T.N., O'Brien, C.P. & Berrettini, W.H. (2005b) Confirmation of the association between a polymorphism in the promoter region of the prodynorphin gene and cocaine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **139B**, 106-108
- Dahl, J.P., Cubells, J.F., Ray, R., Weller, A.E., Lohoff, F.W., Ferraro, T.N., Oslin, D.W., Kampman, K.M., Dackis, C., Tang, Y., Gelernter, J., Kranzler, H.R., O'Brien, C.P. & Berrettini, W.H. (2006) Analysis of variations in the tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) gene in cocaine dependence. *Addict Biol* **11**, 76-83
- Dallas, P.B., Gottardo, N.G., Firth, M.J., Beesley, A.H., Hoffmann, K., Terry, P.A., Freitas, J.R., Boag, J.M., Cummings, A.J. & Kees, U.R. (2005) Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR – how well do they correlate? *BMC Genomics* **6**, 59
- Dani, J.A., Ji, D. & Zhou, F.M. (2001) Synaptic plasticity and nicotine addiction. *Neuron* **31**, 349-352
- Darmani, N.A. & Reeves, S.L. (1996) The stimulatory and inhibitory components of cocaine's actions on the 5-HTP-induced 5-HT<sub>2A</sub> receptor response. *Pharmacol Biochem Behav* **55**, 387-396
- Davidson, C., Lazarus, C., Xiong, X., Lee, T.H. & Ellinwood, E.H. (2002) 5-HT<sub>2</sub> receptor antagonists given in the acute withdrawal from daily cocaine injections can reverse established sensitization. *Eur J Pharmacol* **453**, 255-263
- de la Torre, R. & Farre, M. (2004) Neurotoxicity of MDMA (ecstasy): the limitations of scaling from animals to humans. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 505-508
- Decorte, T. (2000) *The Taming of Cocaine: Cocaine Use in European and American Cities*. VUBPress ISBN: 9789054872849.
- Degenhardt, L., Bruno, R. & Topp, L. (2010) Is ecstasy a drug of dependence? *Drug Alcohol Depend* **107**, 1-10
- Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Miguens, M., Garcia-Lecumberri, C., Borcel, E., Solis, J.M. & Ambrosio, E. (2006) Hippocampal synaptic plasticity and water maze learning in cocaine self-administered rats. *Ann N Y Acad Sci* **1074**, 427-437
- Del Olmo, N., Higuera-Matas, A., Miguens, M., Garcia-Lecumberri, C. & Ambrosio, E. (2007) Cocaine self-administration improves performance in a highly demanding water maze task. *Psychopharmacology (Berl)* **195**, 19-25
- Denizot, F., Brunet, J.F., Roustan, P., Harper, K., Suzan, M., Luciani, M.F., Mattei, M.G. & Golstein, P. (1989) Novel structures CTLA-2 alpha and CTLA-2 beta expressed in mouse activated T cells and mast cells and homologous to cysteine proteinase proregions. *Eur J Immunol* **19**, 631-635
- Dey, S. & Snow, D.M. (2007) Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons through TNF-alpha-mediated induction of Bax and phosphorylated c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Neurochem* **103**, 542-556
- Di Chiara, G. (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res* **137**, 75-114
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M.A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V. & Lecca, D. (2004) Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection.

*Neuropharmacology* **47 Suppl 1**, 227-241

- Donnelly, C.J., Fainzilber, M. & Twiss, J.L. (2010) Subcellular communication through RNA transport and localized protein synthesis. *Traffic* **11**, 1498-1505
- Donovan, D.M., Miner, L.L., Perry, M.P., Revay, R.S., Sharpe, L.G., Przedborski, S., Kostic, V., Philpot, R.M., Kirstein, C.L., Rothman, R.B., Schindler, C.W. & Uhl, G.R. (1999) Cocaine reward and MPTP toxicity: alteration by regional variant dopamine transporter overexpression. *Brain Res Mol Brain Res* **73**, 37-49
- Drgon, T., Zhang, P.W., Johnson, C., Walther, D., Hess, J., Nino, M. & Uhl, G.R. (2010) Genome wide association for addiction: replicated results and comparisons of two analytic approaches. *PLoS One* **5**, e8832
- Drouin, C., Darracq, L., Trovero, F., Blanc, G., Glowinski, J., Cotecchia, S. & Tassin, J.P. (2002) Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. *J Neurosci* **22**, 2873-2884
- Drummond, D.C., Tiffany, S.T., Glautier, S. & Remington, B. (1995) Addictive behaviour: cue exposure theory and practice. *West Sussex, England, Wiley*,
- Dudbridge, F. (2003) Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* **25**, 115-121
- Dulawa, S.C., Hen, R., Searce-Levie, K. & Geyer, M.A. (1998) 5-HT<sub>1B</sub> receptor modulation of prepulse inhibition: recent findings in wild-type and 5-HT<sub>1B</sub> knockout mice. *Ann N Y Acad Sci* **861**, 79-84
- Dulawa, S.C., Searce-Levie, K.A., Hen, R. & Geyer, M.A. (2000) Serotonin releasers increase prepulse inhibition in serotonin 1B knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* **149**, 306-312
- Elliot, E.E., Sibley, D.R. & Katz, J.L. (2003) Locomotor and discriminative-stimulus effects of cocaine in dopamine D<sub>5</sub> receptor knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* **169**, 161-168
- EMCDDA (2009) 2009 Annual report on the state of the drugs problem in Europe *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* ISBN/ISSN: 1609-6150.
- Enoch, M.A., Gorodetsky, E., Hodgkinson, C., Roy, A. & Goldman, D. (2010) Functional genetic variants that increase synaptic serotonin and 5-HT<sub>3</sub> receptor sensitivity predict alcohol and drug dependence. *Mol Psychiatry*,
- Erdtmann-Vourliotis, M., Mayer, P., Riechert, U. & Holtt, V. (1999) Acute injection of drugs with low addictive potential (delta(9)-tetrahydrocannabinol, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diamide) causes a much higher c-fos expression in limbic brain areas than highly addicting drugs (cocaine and morphine). *Brain Res Mol Brain Res* **71**, 313-324
- Eun, J.W., Kwack, S.J., Noh, J.H., Jung, K.H., Kim, J.K., Bae, H.J., Xie, H., Ryu, J.C., Ahn, Y.M., Min, J.H., Park, W.S., Lee, J.Y., Rhee, G.S. & Nam, S.W. (2009) Transcriptomic configuration of mouse brain induced by adolescent exposure to 3,4-methylenedioxymethamphetamine. *Toxicol Appl Pharmacol* **237**, 91-101
- Everitt, B.J. & Robbins, T.W. (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* **8**, 1481-1489
- Fagundo, A.B., Cuyas, E., Verdejo-Garcia, A., Khymenets, O., Langohr, K., Martin-Santos, R., Farre, M. & de la Torre, R. (2010) The influence of 5-HTT and COMT genotypes on verbal fluency in ecstasy users. *J Psychopharmacol* **24**, 1381-1393



- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**, 1567-1587
- Fantegrossi, W.E., Ullrich, T., Rice, K.C., Woods, J.H. & Winger, G. (2002) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") and its stereoisomers as reinforcers in rhesus monkeys: serotonergic involvement. *Psychopharmacology (Berl)* **161**, 356-364
- Ferguson, S.M., Fasano, S., Yang, P., Brambilla, R. & Robinson, T.E. (2006) Knockout of ERK1 enhances cocaine-evoked immediate early gene expression and behavioral plasticity. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2660-2668
- Fernández-Espejo, E. (2006) Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *Rev Neurol* **43**, 147-154
- Filip, M., Nowak, E. & Papla, I. (2001) On the role of serotonin<sub>2A/2C</sub> receptors in the sensitization to cocaine. *J Physiol Pharmacol* **52**, 471-481
- Filip, M., Bubar, M.J. & Cunningham, K.A. (2004) Contribution of serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes to the hyperlocomotor effects of cocaine: acute and chronic pharmacological analyses. *J Pharmacol Exp Ther* **310**, 1246-1254
- Filip, M. (2005) Role of serotonin (5-HT)<sub>2</sub> receptors in cocaine self-administration and seeking behavior in rats. *Pharmacol Rep* **57**, 35-46
- Filip, M., Frankowska, M., Zaniewska, M., Golda, A. & Przegalinski, E. (2005) The serotonergic system and its role in cocaine addiction. *Pharmacol Rep* **57**, 685-700
- Filip, M., Bubar, M.J. & Cunningham, K.A. (2006) Contribution of serotonin (5-HT) 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes to the discriminative stimulus effects of cocaine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **183**, 482-489
- Filip, M., Alenina, N., Bader, M. & Przegalinski, E. (2010) Behavioral evidence for the significance of serotonergic (5-HT) receptors in cocaine addiction. *Addict Biol* **15**, 227-249
- Fischer, H.S., Zernig, G., Schatz, D.S., Humpel, C. & Saria, A. (2000) MDMA ('ecstasy') enhances basal acetylcholine release in brain slices of the rat striatum. *Eur J Neurosci* **12**, 1385-1390
- Fisher, J.F. & Cho, A.K. (1979) Chemical release of dopamine from striatal homogenates: evidence for an exchange diffusion model. *J Pharmacol Exp Ther* **208**, 203-209
- Fletcher, P.J., Grottick, A.J. & Higgins, G.A. (2002) Differential effects of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist M100907 and the 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist SB242084 on cocaine-induced locomotor activity, cocaine self-administration and cocaine-induced reinstatement of responding. *Neuropsychopharmacology* **27**, 576-586
- Ford, J.D., Gelernter, J., DeVoe, J.S., Zhang, W., Weiss, R.D., Brady, K., Farrer, L. & Kranzler, H.R. (2009) Association of psychiatric and substance use disorder comorbidity with cocaine dependence severity and treatment utilization in cocaine-dependent individuals. *Drug Alcohol Depend* **99**, 193-203
- Fornai, F., Giorgi, F.S., Gesi, M., Chen, K., Alessri, M.G. & Shih, J.C. (2001) Biochemical effects of the monoamine neurotoxins DSP-4 and MDMA in specific brain regions of MAO-B-deficient mice. *Synapse* **39**, 213-221
- Foroud, T., Wetherill, L.F., Kramer, J., Tischfield, J.A., Nurnberger, J.I., Jr., Schuckit, M.A., Xuei, X. & Edenberg, H.J. (2008) The tachykinin receptor 3 is associated with alcohol and cocaine dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **32**, 1023-1030
- Fowler, J.S., Volkow, N.D., Wang, G.J., Gatley, S.J. & Logan, J. (2001) [(11)]Cocaine: PET studies of cocaine

pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. *Nucl Med Biol* **28**, 561-572

Fox, H.C., Parrott, A.C. & Turner, J.J. (2001) Ecstasy use: cognitive deficits related to dosage rather than self-reported problematic use of the drug. *J Psychopharmacol* **15**, 273-281

Freeman, W.M., Patel, K.M., Brucklacher, R.M., Lull, M.E., Erwin, M., Morgan, D., Roberts, D.C. & Vrana, K.E. (2008) Persistent alterations in mesolimbic gene expression with abstinence from cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* **33**, 1807-1817

Freimer, M., Kranzler, H., Satel, S., Lacobelle, J., Skipsey, K., Charney, D. & Gelernter, J. (1996) No association between D3 dopamine receptor (DRD3) alleles and cocaine dependence. *Addict Biol* **1**, 281-287

Fremeau, R.T., Jr., Kam, K., Qureshi, T., Johnson, J., Copenhagen, D.R., Storm-Mathisen, J., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A. & Edwards, R.H. (2004) Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* **304**, 1815-1819

Friedman, W.J., Ibanez, C.F., Hallbook, F., Persson, H., Cain, L.D., Dreyfus, C.F. & Black, I.B. (1993) Differential actions of neurotrophins in the locus coeruleus and basal forebrain. *Exp Neurol* **119**, 72-78

Friedman, W.J., Black, I.B. & Kaplan, D.R. (1998) Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* **84**, 101-114

Fumagalli, F., Racagni, G., Colombo, E. & Riva, M.A. (2003) BDNF gene expression is reduced in the frontal cortex of dopamine transporter knockout mice. *Mol Psychiatry* **8**, 898-899

Gainetdinov, R.R. & Caron, M.G. (2003) Monoamine transporters: from genes to behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **43**, 261-284

Gardner, E.L. (1997) Brain reward mechanisms. In Lowinson, J.H., Ruiz, P., Millman, R.B., Langrod, J.G. (eds). *Substance abuse: a comprehensive textbook Williams & Wilkins. Baltimore, MD.*

Gawin, F.H. & Kleber, H.D. (1985) Cocaine use in a treatment: population: patterns and diagnostic distinctions. *NIDA Res Monogr* **61**, 182-192

Gawin, F.H. & Kleber, H.D. (1986) Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers. Clinical observations. *Arch Gen Psychiatry* **43**, 107-113

Gawin, F.H. & Ellinwood, E.H., Jr. (1988) Cocaine and other stimulants. Actions, abuse, and treatment. *N Engl J Med* **318**, 1173-1182

Gawin, F.H. (1991) Cocaine addiction: psychology and neurophysiology. *Science* **251**, 1580-1586

Gelernter, J., Kranzler, H.R., Satel, S.L. & Rao, P.A. (1994) Genetic association between dopamine transporter protein alleles and cocaine-induced paranoia. *Neuropsychopharmacology* **11**, 195-200

Gelernter, J., Kranzler, H. & Cubells, J. (1999a) Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol Psychiatry* **4**, 476-483

Gelernter, J., Kranzler, H. & Satel, S.L. (1999b) No association between D2 dopamine receptor (DRD2) alleles or haplotypes and cocaine dependence or severity of cocaine dependence in European- and African-Americans. *Biol Psychiatry* **45**, 340-345

- Girault, J.A. & Greengard, P. (2004) The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol* **61**, 641-644
- Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M. & Caron, M.G. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* **379**, 606-612
- Goldstein, R.A., DesLauriers, C. & Burda, A.M. (2009) Cocaine: history, social implications, and toxicity—a review. *Dis Mon* **55**, 6-38
- Goldstein, R.Z. & Volkow, N.D. (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* **159**, 1642-1652
- Gordon, D. & Finch, S.J. (2005) Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *J Clin Invest* **115**, 1408-1418
- Gotz, R., Koster, R., Winkler, C., Raulf, F., Lottspeich, F., Schartl, M. & Thoenen, H. (1994) Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* **372**, 266-269
- Goudet, J. (1995) FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Hered* **86**, 485-486
- Grant, S., London, E.D., Newlin, D.B., Villemagne, V.L., Liu, X., Contoreggi, C., Phillips, R.L., Kimes, A.S. & Margolin, A. (1996) Activation of memory circuits during cue-elicited cocaine craving. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12040-12045
- Green, A.R., Mehan, A.O., Elliott, J.M., O'Shea, E. & Colado, M.I. (2003) The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy"). *Pharmacol Rev* **55**, 463-508
- Grimes, M.L., Zhou, J., Beattie, E.C., Yuen, E.C., Hall, D.E., Valletta, J.S., Topp, K.S., LaVail, J.H., Bunnett, N.W. & Mobley, W.C. (1996) Endocytosis of activated TrkA: evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J Neurosci* **16**, 7950-7964
- Grucza, R.A., Wang, J.C., Stitzel, J.A., Hinrichs, A.L., Saccone, S.F., Saccone, N.L., Bucholz, K.K., Cloninger, C.R., Neuman, R.J., Budde, J.P., Fox, L., Bertelsen, S., Kramer, J., Hesselbrock, V., Tischfield, J., Nurnberger, J.I., Jr., Almasy, L., Porjesz, B., Kuperman, S., Schuckit, M.A., Edenberg, H.J., Rice, J.P., Goate, A.M. & Bierut, L.J. (2008) A risk allele for nicotine dependence in *CHRNA5* is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry* **64**, 922-929
- Gudelsky, G.A. & Nash, J.F. (1996) Carrier-mediated release of serotonin by 3,4-methylenedioxymethamphetamine: implications for serotonin-dopamine interactions. *J Neurochem* **66**, 243-249
- Guindalini, C., O'Gara, C., Laranjeira, R., Collier, D., Castelo, A., Vallada, H. & Breen, G. (2005) A *GSTP1* functional variant associated with cocaine dependence in a Brazilian population. *Pharmacogenet Genomics* **15**, 891-893
- Guindalini, C., Howard, M., Haddley, K., Laranjeira, R., Collier, D., Ammar, N., Craig, I., O'Gara, C., Bubb, V.J., Greenwood, T., Kelsoe, J., Asherson, P., Murray, R.M., Castelo, A., Quinn, J.P., Vallada, H. & Breen, G. (2006) A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4552-4557
- Guindalini, C., Collier, D., Laranjeira, R., Barrett, T.B., Kelsoe, J., Castelo, A., Vallada, H. & Breen, G. (2007) Association analysis of *GRK3* gene promoter variants in cocaine abuse. *Psychiatr Genet* **17**, 239-242
- Guindalini, C., Laranjeira, R., Collier, D., Messas, G., Vallada, H. & Breen, G. (2008) Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct* **4**, 1

- Gusnanto, A., Calza, S. & Pawitan, Y. (2007) Identification of differentially expressed genes and false discovery rate in microarray studies. *Curr Opin Lipidol* **18**, 187-193
- Guzowski, J.F. (2002) Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* **12**, 86-104
- Hackstadt, A.J. & Hess, A.M. (2009) Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* **10**, 11
- Hagg, T. (2009) From neurotransmitters to neurotrophic factors to neurogenesis. *Neuroscientist* **15**, 20-27
- Halford, J.C. & Blundell, J.E. (2000) Separate systems for serotonin and leptin in appetite control. *Ann Med* **32**, 222-232
- Hall, F.S., Li, X.F., Sora, I., Xu, F., Caron, M., Lesch, K.P., Murphy, D.L. & Uhl, G.R. (2002) Cocaine mechanisms: enhanced cocaine, fluoxetine and nisoxetine place preferences following monoamine transporter deletions. *Neuroscience* **115**, 153-161
- Hall, F.S., Sora, I., Drgonova, J., Li, X.F., Goeb, M. & Uhl, G.R. (2004) Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. *Ann N Y Acad Sci* **1025**, 47-56
- Hallbook, F., Ibanez, C.F. & Persson, H. (1991) Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* **6**, 845-858
- Hekmatpanah, C.R. & Peroutka, S.J. (1990) 5-hydroxytryptamine uptake blockers attenuate the 5-hydroxytryptamine-releasing effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and related agents. *Eur J Pharmacol* **177**, 95-98
- Hemby, S.E., Tang, W., Muly, E.C., Kuhar, M.J., Howell, L. & Mash, D.C. (2005) Cocaine-induced alterations in nucleus accumbens ionotropic glutamate receptor subunits in human and non-human primates. *J Neurochem* **95**, 1785-1793
- Herman, A.I., Kranzler, H.R., Cubells, J.F., Gelernter, J. & Covault, J. (2006) Association study of the CNR1 gene exon 3 alternative promoter region polymorphisms and substance dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **141B**, 499-503
- Heydorn, A., Sondergaard, B.P., Hadrup, N., Holst, B., Haft, C.R. & Schwartz, T.W. (2004) Distinct in vitro interaction pattern of dopamine receptor subtypes with adaptor proteins involved in post-endocytotic receptor targeting. *FEBS Lett* **556**, 276-280
- Hiroi, N., Brown, J.R., Haile, C.N., Ye, H., Greenberg, M.E. & Nestler, E.J. (1997) FosB mutant mice: loss of chronic cocaine induction of Fos-related proteins and heightened sensitivity to cocaine's psychomotor and rewarding effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10397-10402
- Hnasko, T.S., Sotak, B.N. & Palmiter, R.D. (2007) Cocaine-conditioned place preference by dopamine-deficient mice is mediated by serotonin. *J Neurosci* **27**, 12484-12488
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K. & Barde, Y.A. (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature* **344**, 339-341
- Homayoun, H. & Moghaddam, B. (2006) Progression of cellular adaptations in medial prefrontal and orbitofrontal cortex in response to repeated amphetamine. *J Neurosci* **26**, 8025-8039
- Hope, B., Kosofsky, B., Hyman, S.E. & Nestler, E.J. (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5764-5768

- Horger, B.A., Iyasere, C.A., Berhow, M.T., Messer, C.J., Nestler, E.J. & Taylor, J.R. (1999) Enhancement of locomotor activity and conditioned reward to cocaine by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* **19**, 4110-4122
- Howlett, A.C., Breivogel, C.S., Childers, S.R., Deadwyler, S.A., Hampson, R.E. & Porrino, L.J. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**, 345-358
- Hoyer, D. & Martin, G. (1997) 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology* **36**, 419-428
- Huang da, W., Sherman, B.T., Stephens, R., Baseler, M.W., Lane, H.C. & Lempicki, R.A. (2008) DAVID gene ID conversion tool. *Bioinformatics* **2**, 428-430
- Huntley, G.W., Gil, O. & Bozdagi, O. (2002) The cadherin family of cell adhesion molecules: multiple roles in synaptic plasticity. *Neuroscientist* **8**, 221-233
- Hurd, Y.L. & Herkenham, M. (1993) Molecular alterations in the neostriatum of human cocaine addicts. *Synapse* **13**, 357-369
- Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y.A., Juhasz, M., Yancopoulos, G.D., Squinto, S.P. & Lindsay, R.M. (1991) BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature* **350**, 230-232
- Ip, N.Y. & Yancopoulos, G.D. (1996) The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* **19**, 491-515
- Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B. & Speed, T.P. (2003a) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* **31**, e15
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. & Speed, T.P. (2003b) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* **4**, 249-264
- Ito, R., Dalley, J.W., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (2002) Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue. *J Neurosci* **22**, 6247-6253
- Itzhak, Y. & Ali, S.F. (2006) Role of nitrenergic system in behavioral and neurotoxic effects of amphetamine analogs. *Pharmacol Ther* **109**, 246-262
- Iversen, S.D. & Iversen, L.L. (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* **30**, 188-193
- Jasmin, L., Narasaiah, M. & Tien, D. (2006) Noradrenaline is necessary for the hedonic properties of addictive drugs. *Vascul Pharmacol* **45**, 243-250
- Johanson, C.E. & Fischman, M.W. (1989) The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev* **41**, 3-52
- Johnson, M.P., Hoffman, A.J. & Nichols, D.E. (1986) Effects of the enantiomers of MDA, MDMA and related analogues on [<sup>3</sup>H]serotonin and [<sup>3</sup>H]dopamine release from superfused rat brain slices. *Eur J Pharmacol* **132**, 269-276
- Jönsson, E.G., Nothen, M.M., Grunhage, F., Farde, L., Nakashima, Y., Propping, P. & Sedvall, G.C. (1999) Polymorphisms in the dopamine D<sub>2</sub> receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* **4**, 290-296
- Jouvert, P., Dietrich, J.B., Aunis, D. & Zwiller, J. (2002) Differential rat brain expression of EGR proteins

and of the transcriptional corepressor NAB in response to acute or chronic cocaine administration. *Neuromolecular Med* **1**, 137-151

Kalayasiri, R., Sughondhabirrom, A., Gueorguieva, R., Coric, V., Lynch, W.J., Lappalainen, J., Gelernter, J., Cubells, J.F. & Malison, R.T. (2007) Dopamine beta-hydroxylase gene (DbetaH) -1021C-->T influences self-reported paranoia during cocaine self-administration. *Biol Psychiatry* **61**, 1310-1313

Kalivas, P.W. (2007) Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *Am J Addict* **16**, 71-78

Kaplan, D.R., Hempstead, B.L., Martin-Zanca, D., Chao, M.V. & Parada, L.F. (1991) The trk proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* **252**, 554-558

Karasinska, J.M., George, S.R., Cheng, R. & O'Dowd, B.F. (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**, 1741-1750

Karlsson, R.M., Hefner, K.R., Sibley, D.R. & Holmes, A. (2008) Comparison of dopamine D1 and D5 receptor knockout mice for cocaine locomotor sensitization. *Psychopharmacology (Berl)* **200**, 117-127

Karreman, M. & Moghaddam, B. (1996) The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum: an effect mediated by ventral tegmental area. *J Neurochem* **66**, 589-598

Katz, J.L., Chausmer, A.L., Elmer, G.I., Rubinstein, M., Low, M.J. & Grandy, D.K. (2003) Cocaine-induced locomotor activity and cocaine discrimination in dopamine D4 receptor mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)* **170**, 108-114

Kendler, K.S. & Prescott, C.A. (1998) Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* **173**, 345-350

Kendler, K.S., Karkowski, L.M., Neale, M.C. & Prescott, C.A. (2000) Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry* **57**, 261-269

Kilts, C.D., Schweitzer, J.B., Quinn, C.K., Gross, R.E., Faber, T.L., Muhammad, F., Ely, T.D., Hoffman, J.M. & Drexler, K.P. (2001) Neural activity related to drug craving in cocaine addiction. *Arch Gen Psychiatry* **58**, 334-341

Kindlundh-Hogberg, A.M., Svenningsson, P. & Schioth, H.B. (2006) Quantitative mapping shows that serotonin rather than dopamine receptor mRNA expressions are affected after repeated intermittent administration of MDMA in rat brain. *Neuropharmacology* **51**, 838-847

Kindlundh-Hogberg, A.M., Blomqvist, A., Malki, R. & Schioth, H.B. (2008) Extensive neuroadaptive changes in cortical gene-transcript expressions of the glutamate system in response to repeated intermittent MDMA administration in adolescent rats. *BMC Neurosci* **9**, 39

Kirk, J.M., Doty, P. & De Wit, H. (1998) Effects of expectancies on subjective responses to oral delta9-tetrahydrocannabinol. *Pharmacol Biochem Behav* **59**, 287-293

Klein, R., Jing, S.Q., Nanduri, V., O'Rourke, E. & Barbacid, M. (1991) The trk proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* **65**, 189-197

Knipper, M., da Penha Berzaghi, M., Blochl, A., Breer, H., Thoenen, H. & Lindholm, D. (1994) Positive feedback between acetylcholine and the neurotrophins nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* **6**, 668-671

- Knusel, B., Winslow, J.W., Rosenthal, A., Burton, L.E., Seid, D.P., Nikolics, K. & Hefti, F. (1991) Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 961-965
- Koch, S. & Galloway, M.P. (1997) MDMA induced dopamine release in vivo: role of endogenous serotonin. *J Neural Transm* **104**, 135-146
- Koe, B.K. (1976) Molecular geometry of inhibitors of the uptake of catecholamines and serotonin in synaptosomal preparations of rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **199**, 649-661
- Konradi, C. (2005) Gene expression microarray studies in polygenic psychiatric disorders: applications and data analysis. *Brain Res Brain Res Rev* **50**, 142-155
- Koob, G.F. (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* **13**, 177-184
- Koob, G.F. & Le Moal, M. (1997) Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* **278**, 52-58
- Koob, G.F. & Le Moal, M. (2001) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**, 97-129
- Koob, G.F. (2004) Allostatic view of motivation: implications for psychopathology. *Nebr Symp Motiv* **50**, 1-18
- Koob, G.F. (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* **101 Suppl 1**, 23-30
- Koob, G.F. & Le Moal, M. (2006) Neurobiology of Addiction. *Academic Press-Elsevier, Amsterdam* ISBN: 978-0-12-419239-3
- Koob, G.F. (2008) A role for brain stress systems in addiction. *Neuron* **59**, 11-34
- Koob, G.F. & Le Moal, M. (2008) Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* **59**, 29-53
- Koob, G.F. (2009) Brain stress systems in the amygdala and addiction. *Brain Res* **1293**, 61-75
- Koob, G.F. & Volkow, N.D. (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* **35**, 217-238
- Krasnova, I.N., Li, S.M., Wood, W.H., McCoy, M.T., Prabhu, V.V., Becker, K.G., Katz, J.L. & Cadet, J.L. (2008) Transcriptional responses to reinforcing effects of cocaine in the rat hippocampus and cortex. *Genes Brain Behav* **7**, 193-202
- Kremerskothen, J., Kindler, S., Finger, I., Veltel, S. & Barnekow, A. (2006) Postsynaptic recruitment of Dendrin depends on both dendritic mRNA transport and synaptic anchoring. *J Neurochem* **96**, 1659-1666
- Krishnan, V., Han, M.H., Graham, D.L., Berton, O., Renthal, W., Russo, S.J., Laplant, Q., Graham, A., Lutter, M., Lagace, D.C., Ghose, S., Reister, R., Tannous, P., Green, T.A., Neve, R.L., Chakravarty, S., Kumar, A., Eisch, A.J., Self, D.W., Lee, F.S., Tamminga, C.A., Cooper, D.C., Gershenfeld, H.K. & Nestler, E.J. (2007) Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell* **131**, 391-404
- Kuhar, M.J., Ritz, M.C. & Boja, J.W. (1991) The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* **14**, 299-302

- Kuzmin, A. & Johansson, B. (1999) Expression of c-fos, NGFI-A and secretogranin II mRNA in brain regions during initiation of cocaine self-administration in mice. *Eur J Neurosci* **11**, 3694-3700
- Lai, K.O., Fu, W.Y., Ip, F.C. & Ip, N.Y. (1998) Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* **11**, 64-76
- Lamballe, F., Klein, R. & Barbacid, M. (1991) trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**, 967-979
- Lee, S., Park, J.Y., Lee, W.H., Kim, H., Park, H.C., Mori, K. & Suk, K. (2009) Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. *J Neurosci* **29**, 234-249
- Lehrmann, E., Oyler, J., Vawter, M.P., Hyde, T.M., Kolachana, B., Kleinman, J.E., Huestis, M.A., Becker, K.G. & Freed, W.J. (2003) Transcriptional profiling in the human prefrontal cortex: evidence for two activational states associated with cocaine abuse. *Pharmacogenomics J* **3**, 27-40
- Lehrmann, E., Colantuoni, C., Deep-Soboslay, A., Becker, K.G., Lowe, R., Huestis, M.A., Hyde, T.M., Kleinman, J.E. & Freed, W.J. (2006) Transcriptional changes common to human cocaine, cannabis and phencyclidine abuse. *PLoS One* **1**, e114
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H. & Barde, Y.A. (1989) Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **341**, 149-152
- Lesch, K.P. & Mossner, R. (1998) Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry* **44**, 179-192
- Letchworth, S.R., Nader, M.A., Smith, H.R., Friedman, D.P. & Porrino, L.J. (2001) Progression of changes in dopamine transporter binding site density as a result of cocaine self-administration in rhesus monkeys. *J Neurosci* **21**, 2799-2807
- Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P.U. (1968) Nerve growth factor. *Physiol Rev* **48**, 534-569
- Levi-Montalcini, R. (1987) The nerve growth factor 35 years later. *Science* **237**, 1154-1162
- Levin, F.R., Mariani, J.J., Secora, A., Brooks, D., Cheng, W.Y., Bisaga, A., Nunes, E., Aharonovich, E., Raby, W. & Hennessy, G. (2009) Atomoxetine Treatment for Cocaine Abuse and Adult Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): A Preliminary Open Trial. *J Dual Diagn* **5**, 41-56
- Li, C. & Hung Wong, W. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* **2**, RESEARCH0032
- Li, C. & Wong, W.H. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 31-36
- Li, C.Y., Mao, X. & Wei, L. (2008) Genes and (common) pathways underlying drug addiction. *PLoS Comput Biol* **4**, e2
- Li, L., Carter, J., Gao, X., Whitehead, J. & Tourtellotte, W.G. (2005) The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol* **25**, 10286-10300
- Li, L., Yun, S.H., Keblesh, J., Trommer, B.L., Xiong, H., Radulovic, J. & Tourtellotte, W.G. (2007) Egr3, a synaptic activity regulated transcription factor that is essential for learning and memory. *Mol Cell Neurosci* **35**, 76-88
- Liechti, M.E., Saur, M.R., Gamma, A., Hell, D. & Vollenweider, F.X. (2000) Psychological and physiological



- effects of MDMA (“Ecstasy”) after pretreatment with the 5-HT(2) antagonist ketanserin in healthy humans. *Neuropsychopharmacology* **23**, 396-404
- Lindholm, P. & Saarma, M. (2010) Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol* **70**, 360-371
- Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., Altar, C.A. & DiStefano, P.S. (1994) Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci* **17**, 182-190
- Littleton, J.T., Barnard, R.J., Titus, S.A., Slind, J., Chapman, E.R. & Ganetzky, B. (2001) SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12233-12238
- Liu, Q.R., Drgon, T., Walther, D., Johnson, C., Poleskaya, O., Hess, J. & Uhl, G.R. (2005) Pooled association genome scanning: validation and use to identify addiction vulnerability loci in two samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11864-11869
- Liu, Q.R., Drgon, T., Johnson, C., Walther, D., Hess, J. & Uhl, G.R. (2006) Addiction molecular genetics: 639,401 SNP whole genome association identifies many “cell adhesion” genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **141B**, 918-925
- Logan, G.D., Schachar, R. & Tannock, R. (1997) Impulsivity and inhibitory control. *Psychol Sci* **8**, 60-64
- Lohoff, F.W., Bloch, P.J., Weller, A.E., Nall, A.H., Doyle, G.A., Buono, R.J., Ferraro, T.N., Kampman, K.M., Pettinati, H.M., Dackis, C.A., Oslin, D.W., O’Brien, C.P. & Berrettini, W.H. (2008a) Genetic variants in the cocaine- and amphetamine-regulated transcript gene (CARTPT) and cocaine dependence. *Neurosci Lett* **440**, 280-283
- Lohoff, F.W., Weller, A.E., Bloch, P.J., Nall, A.H., Ferraro, T.N., Kampman, K.M., Pettinati, H.M., Oslin, D.W., Dackis, C.A., O’Brien, C.P. & Berrettini, W.H. (2008b) Association between the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism and cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology* **33**, 3078-3084
- Lohoff, F.W., Bloch, P.J., Ferraro, T.N., Berrettini, W.H., Pettinati, H.M., Dackis, C.A., O’Brien, C.P., Kampman, K.M. & Oslin, D.W. (2009) Association analysis between polymorphisms in the conserved dopamine neurotrophic factor (CDNF) gene and cocaine dependence. *Neurosci Lett* **453**, 199-203
- Lohoff, F.W., Bloch, P.J., Hodge, R., Nall, A.H., Ferraro, T.N., Kampman, K.M., Dackis, C.A., O’Brien, C.P., Pettinati, H.M. & Oslin, D.W. (2010) Association analysis between polymorphisms in the dopamine D2 receptor (DRD2) and dopamine transporter (DAT1) genes with cocaine dependence. *Neurosci Lett* **473**, 87-91
- London, E.D., Cascella, N.G., Wong, D.F., Phillips, R.L., Dannals, R.F., Links, J.M., Herning, R., Grayson, R., Jaffe, J.H. & Wagner, H.N., Jr. (1990) Cocaine-induced reduction of glucose utilization in human brain. A study using positron emission tomography and [fluorine 18]-fluorodeoxyglucose. *Arch Gen Psychiatry* **47**, 567-574
- Lull, M.E., Freeman, W.M., Vrana, K.E. & Mash, D.C. (2008) Correlating human and animal studies of cocaine abuse and gene expression. *Ann N Y Acad Sci* **1141**, 58-75
- Luo, X., Kranzler, H.R., Zhao, H. & Gelernter, J. (2003) Haplotypes at the OPRM1 locus are associated with susceptibility to substance dependence in European-Americans. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **120B**, 97-108
- Luo, X., Kranzler, H., Lappalainen, J., Rosenheck, R., Charney, D., Zuo, L., Erdos, J., van Kammen, D.P. & Gelernter, J. (2004) CALCYON gene variation, schizophrenia, and cocaine dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **125B**, 25-30

- Luo, X., Kranzler, H.R., Zuo, L., Yang, B.Z., Lappalainen, J. & Gelernter, J. (2005) ADH4 gene variation is associated with alcohol and drug dependence: results from family controlled and population-structured association studies. *Pharmacogenet Genomics* **15**, 755-768
- Luziga, C., Nakamura, O., Deshapriya, R.M., Usui, M., Miyaji, M., Wakimoto, M., Wada, N., Mbassa, G. & Yamamoto, Y. (2008) Dendritic and axonal localization of cytotoxic T-lymphocyte antigen-2 alpha protein in mouse brain. *Brain Res* **1204**, 40-52
- Lyvers, M. (2006) Recreational ecstasy use and the neurotoxic potential of MDMA: current status of the controversy and methodological issues. *Drug Alcohol Rev* **25**, 269-276
- Ma, X.M. (2010) Kalirin-7 is a key player in the formation of excitatory synapses in hippocampal neurons. *ScientificWorldJournal* **10**, 1655-1666
- Maisonpierre, P.C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N.Y., Furth, M.E., Lindsay, R.M. & Yancopoulos, G.D. (1990) Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science* **247**, 1446-1451
- Maisonpierre, P.C., Le Beau, M.M., Espinosa, R., 3rd, Ip, N.Y., Belluscio, L., de la Monte, S.M., Squinto, S., Furth, M.E. & Yancopoulos, G.D. (1991) Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* **10**, 558-568
- Malison, R.T., Kranzler, H.R., Yang, B.Z. & Gelernter, J. (2006) Human clock, PER1 and PER2 polymorphisms: lack of association with cocaine dependence susceptibility and cocaine-induced paranoia. *Psychiatr Genet* **16**, 245-249
- Malsam, J., Kreye, S. & Sollner, T.H. (2008) Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2814-2832
- Mamounas, L.A., Blue, M.E., Siuciak, J.A. & Altar, C.A. (1995) Brain-derived neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain. *J Neurosci* **15**, 7929-7939
- Mamounas, L.A., Altar, C.A., Blue, M.E., Kaplan, D.R., Tessarollo, L. & Lyons, W.E. (2000) BDNF promotes the regenerative sprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain. *J Neurosci* **20**, 771-782
- Mannelli, P., Patkar, A.A., Murray, H.W., Certa, K., Peindl, K., Mattila-Evenden, M. & Berrettini, W.H. (2005) Polymorphism in the serotonin transporter gene and response to treatment in African American cocaine and alcohol-abusing individuals. *Addict Biol* **10**, 261-268
- Marie-Claire, C., Salzmann, J., David, A., Courtin, C., Canestrelli, C. & Noble, F. (2007) Rnd family genes are differentially regulated by 3,4-methylenedioxymethamphetamine and cocaine acute treatment in mice brain. *Brain Res* **1134**, 12-17
- Martinez-Turrillas, R., Moyano, S., Del Rio, J. & Frechilla, D. (2006) Differential effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on BDNF mRNA expression in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett* **402**, 126-130
- Martinez, D., Gelernter, J., Abi-Dargham, A., van Dyck, C.H., Kegeles, L., Innis, R.B. & Laruelle, M. (2001) The variable number of tandem repeats polymorphism of the dopamine transporter gene is not associated with significant change in dopamine transporter phenotype in humans. *Neuropsychopharmacology* **24**, 553-560
- Mash, D.C. & Staley, J.K. (1999) D3 dopamine and kappa opioid receptor alterations in human brain of cocaine-overdose victims. *Ann NY Acad Sci* **877**, 507-522

- Mash, D.C., 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
- McCann, U.D., Szabo, Z., Scheffel, U., Dannals, R.F. & Ricaurte, G.A. (1998) Positron emission tomographic evidence of toxic effect of MDMA ("Ecstasy") on brain serotonin neurons in human beings. *Lancet* **352**, 1433-1437
- McCarthy, M.I. & Hirschhorn, J.N. (2008) Genome-wide association studies: potential next steps on a genetic journey. *Hum Mol Genet* **17**, R156-165
- McLellan, A.T., Lewis, D.C., O'Brien, C.P. & Kleber, H.D. (2000) Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *Jama* **284**, 1689-1695
- Mead, A.N., Rocha, B.A., Donovan, D.M. & Katz, J.L. (2002) Intravenous cocaine induced-activity and behavioural sensitization in norepinephrine-, but not dopamine-transporter knockout mice. *Eur J Neurosci* **16**, 514-520
- Mehler, M.F. (2008) Epigenetics and the nervous system. *Ann Neurol* **64**, 602-617
- Mello, N.K. & Negus, S.S. (1996) Preclinical evaluation of pharmacotherapies for treatment of cocaine and opioid abuse using drug self-administration procedures. *Neuropsychopharmacology* **14**, 375-424
- Merikangas, K.R., Stolar, M., Stevens, D.E., Goulet, J., Preisig, M.A., Fenton, B., Zhang, H., O'Malley, S.S. & Rounsaville, B.J. (1998) Familial transmission of substance use disorders. *Arch Gen Psychiatry* **55**, 973-979
- Messas, G., Meira-Lima, I., Turchi, M., Franco, O., Guindalini, C., Castelo, A., Laranjeira, R. & Vallada, H. (2005) Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr Genet* **15**, 171-174
- Metzger, R.R., Hanson, G.R., Gibb, J.W. & Fleckenstein, A.E. (1998) 3-4-Methylenedioxymethamphetamine-induced acute changes in dopamine transporter function. *Eur J Pharmacol* **349**, 205-210
- Millan, M.J. & Colpaert, F.C. (1991) Methylenedioxymethamphetamine induces spontaneous tail-flicks in the rat via 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* **193**, 145-152
- Miller, M.B., Schwander, K. & Rao, D.C. (2008) Genotyping errors and their impact on genetic analysis. *Adv Genet* **60**, 141-152
- Miner, L.L., Drago, J., Chamberlain, P.M., Donovan, D. & Uhl, G.R. (1995) Retained cocaine conditioned place preference in D1 receptor deficient mice. *Neuroreport* **6**, 2314-2316
- Miyairi, I., Tatireddigari, V.R., Mahdi, O.S., Rose, L.A., Belland, R.J., Lu, L., Williams, R.W. & Byrne, G.I. (2007) The p47 GTPases Iigp2 and Irgb10 regulate innate immunity and inflammation to murine Chlamydia psittaci infection. *J Immunol* **179**, 1814-1824
- Mizuno, K., Carnahan, J. & Nawa, H. (1994) Brain-derived neurotrophic factor promotes differentiation of striatal GABAergic neurons. *Dev Biol* **165**, 243-256
- Moeller, F.G., Barratt, E.S., Dougherty, D.M., Schmitz, J.M. & Swann, A.C. (2001) Psychiatric aspects of impulsivity. *Am J Psychiatry* **158**, 1783-1793
- Moeller, F.G., Hasan, K.M., Steinberg, J.L., Kramer, L.A., Valdes, I., Lai, L.Y., Swann, A.C. & Narayana, P.A. (2007) Diffusion tensor imaging eigenvalues: preliminary evidence for altered myelin in cocaine dependence. *Psychiatry Res* **154**, 253-258

- Mori, M., Jefferson, J.J., Hummel, M. & Garbe, D.S. (2008) CNTF: a putative link between dopamine D2 receptors and neurogenesis. *J Neurosci* **28**, 5867-5869
- Morton, W.A. (1999) Cocaine and Psychiatric Symptoms. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* **1**, 109-113
- Muller, C.P. & Huston, J.P. (2006) Determining the region-specific contributions of 5-HT receptors to the psychostimulant effects of cocaine. *Trends Pharmacol Sci* **27**, 105-112
- Musani, S.K., Shriner, D., Liu, N., Feng, R., Coffey, C.S., Yi, N., Tiwari, H.K. & Allison, D.B. (2007) Detection of gene x gene interactions in genome-wide association studies of human population data. *Hum Hered* **63**, 67-84
- Nakamura, K., Matsumoto, M. & Hikosaka, O. (2008) Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus. *J Neurosci* **28**, 5331-5343
- Nelson, A. & Killcross, S. (2006) Amphetamine exposure enhances habit formation. *J Neurosci* **26**, 3805-3812
- Nestler, E.J. (1993) Cellular responses to chronic treatment with drugs of abuse. *Crit Rev Neurobiol* **7**, 23-39
- Nestler, E.J. & Aghajanian, G.K. (1997) Molecular and cellular basis of addiction. *Science* **278**, 58-63
- Nestler, E.J. (2000) Genes and addiction. *Nat Genet* **26**, 277-281
- Nestler, E.J. (2001a) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* **2**, 119-128
- Nestler, E.J. (2001b) Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict* **10**, 201-217
- Nestler, E.J. (2005) Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci* **8**, 1445-1449
- Nic Dhonnchadha, B.A., Fox, R.G., Stutz, S.J., Rice, K.C. & Cunningham, K.A. (2009) Blockade of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor suppresses cue-evoked reinstatement of cocaine-seeking behavior in a rat self-administration model. *Behav Neurosci* **123**, 382-396
- Nishimune, A., Isaac, J.T., Molnar, E., Noel, J., Nash, S.R., Tagaya, M., Collingridge, G.L., Nakanishi, S. & Henley, J.M. (1998) NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* **21**, 87-97
- Noble, E.P., Blum, K., Khalsa, M.E., Ritchie, T., Montgomery, A., Wood, R.C., Fitch, R.J., Ozkaragoz, T., Sheridan, P.J., Anglin, M.D. & et al. (1993) Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* **33**, 271-285
- Noble, E.P. (2000) Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *Eur Psychiatry* **15**, 79-89
- O'Callaghan, J.P. & Miller, D.B. (1994) Neurotoxicity profiles of substituted amphetamines in the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* **270**, 741-751
- Oliveira, M.T., Rego, A.C., Macedo, T.R. & Oliveira, C.R. (2003) Drugs of abuse induce apoptotic features in PC12 cells. *Ann NY Acad Sci* **1010**, 667-670
- Oray, S., Majewska, A. & Sur, M. (2004) Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron* **44**, 1021-1030
- Orejarena, M.J., Berrendero, F., Maldonado, R. & Robledo, P. (2009) Differential changes in mesolimbic

- dopamine following contingent and non-contingent MDMA self-administration in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **205**, 457-466
- Orejarena, M.J., Lanfumey, L., Maldonado, R. & Robledo, P. (2010) Involvement of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in MDMA reinforcement and cue-induced reinstatement of MDMA-seeking behaviour. *Int J Neuropsychopharmacol*, En premsa. PMID: 20942998
- Osten, P., Srivastava, S., Inman, G.J., Vilim, F.S., Khatri, L., Lee, L.M., States, B.A., Einheber, S., Milner, T.A., Hanson, P.I. & Ziff, E.B. (1998) The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron* **21**, 99-110
- Pan, H.S. & Wang, R.Y. (1991a) MDMA: further evidence that its action in the medial prefrontal cortex is mediated by the serotonergic system. *Brain Res* **539**, 332-336
- Pan, H.S. & Wang, R.Y. (1991b) The action of (+/-)-MDMA on medial prefrontal cortical neurons is mediated through the serotonergic system. *Brain Res* **543**, 56-60
- Parsons, L.H., Weiss, F. & Koob, G.F. (1998) Serotonin<sub>1B</sub> receptor stimulation enhances cocaine reinforcement. *J Neurosci* **18**, 10078-10089
- Parsons, L.H., Koob, G.F. & Weiss, F. (1999) RU 24969, a 5-HT<sub>1B/1A</sub> receptor agonist, potentiates cocaine-induced increases in nucleus accumbens dopamine. *Synapse* **32**, 132-135
- Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Hoehe, M., Hill, K.P., Sterling, R.C., Gottheil, E. & Weinstein, S.P. (2001) Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Addict Biol* **6**, 337-345
- Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Hoehe, M., Hill, K.P., Gottheil, E., Thornton, C.C. & Weinstein, S.P. (2002a) No association between polymorphisms in the serotonin transporter gene and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Psychiatr Genet* **12**, 161-164
- Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Hoehe, M., Thornton, C.C., Gottheil, E., Hill, K. & Weinstein, S.P. (2002b) Serotonin transporter polymorphisms and measures of impulsivity, aggression, and sensation seeking among African-American cocaine-dependent individuals. *Psychiatry Res* **110**, 103-115
- Patkar, A.A., Berrettini, W.H., Mannelli, P., Gopalakrishnan, R., Hoehe, M.R., Bilal, L., Weinstein, S. & Vergare, M.J. (2004) Relationship between serotonin transporter gene polymorphisms and platelet serotonin transporter sites among African-American cocaine-dependent individuals and healthy volunteers. *Psychiatr Genet* **14**, 25-32
- Pavlov, P.I. (1927) *Conditioned Reflexes*. Vol. Oxford Univ. Press. London. Oxford Univ. Press, London
- Peng, W. & Simantov, R. (2003) Altered gene expression in frontal cortex and midbrain of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) treated mice: differential regulation of GABA transporter subtypes. *J Neurosci Res* **72**, 250-258
- Penzes, P. & Jones, K.A. (2008) Dendritic spine dynamics—a key role for kalirin-7. *Trends Neurosci* **31**, 419-427
- Persico, A.M., Bird, G., Gabbay, F.H. & Uhl, G.R. (1996) D<sub>2</sub> dopamine receptor gene TaqI A1 and B1 restriction fragment length polymorphisms: enhanced frequencies in psychostimulant-preferring polysubstance abusers. *Biol Psychiatry* **40**, 776-784
- Piercey, M.F., Lum, J.T. & Palmer, J.R. (1990) Effects of MDMA ('ecstasy') on firing rates of serotonergic, dopaminergic, and noradrenergic neurons in the rat. *Brain Res* **526**, 203-206

- Platt, D.M., Rowlett, J.K. & Spealman, R.D. (2000) Dissociation of cocaine-antagonist properties and motoric effects of the D1 receptor partial agonists SKF 83959 and SKF 77434. *J Pharmacol Exp Ther* **293**, 1017-1026
- Pompanon, F., Bonin, A., Bellemain, E. & Taberlet, P. (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat Rev Genet* **6**, 847-859
- Pontier, S.M., Lahaie, N., Ginham, R., St-Gelais, F., Bonin, H., Bell, D.J., Flynn, H., Trudeau, L.E., McIlhinney, J., White, J.H. & Bouvier, M. (2006) Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *Embo J* **25**, 2698-2709
- Poon, H.F., Abdullah, L., Mullan, M.A., Mullan, M.J. & Crawford, F.C. (2007) Cocaine-induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. *Neurochem Int* **50**, 69-73
- Pounds, S.B. (2006) Estimation and control of multiple testing error rates for microarray studies. *Brief Bioinform* **7**, 25-36
- Prakash, N., Cohen-Cory, S. & Frostig, R.D. (1996) RAPID and opposite effects of BDNF and NGF on the functional organization of the adult cortex in vivo. *Nature* **381**, 702-706
- 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
- Rachlin, H. & Green, L. (1972) Commitment, choice and self-control. *J Exp Anal Behav* **17**, 15-22
- Radwanska, K., Caboche, J. & Kaczmarek, L. (2005) Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) modulate cocaine-induced gene expression in the mouse amygdala. *Eur J Neurosci* **22**, 939-948
- Reneman, L., Booij, J., Schmand, B., van den Brink, W. & Gunning, B. (2000) Memory disturbances in "Ecstasy" users are correlated with an altered brain serotonin neurotransmission. *Psychopharmacology (Berl)* **148**, 322-324
- Reneman, L., Endert, E., de Bruin, K., Lavalaye, J., Feenstra, M.G., de Wolff, F.A. & Booij, J. (2002) The acute and chronic effects of MDMA ("ecstasy") on cortical 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rat and human brain. *Neuropsychopharmacology* **26**, 387-396
- Reneman, L., Schilt, T., de Win, M.M., Booij, J., Schmand, B., van den Brink, W. & Bakker, O. (2006) Memory function and serotonin transporter promoter gene polymorphism in ecstasy (MDMA) users. *J Psychopharmacol* **20**, 389-399
- Renoir, T., Paizanis, E., El Yacoubi, M., Saurini, F., Hanoun, N., Melfort, M., Lesch, K.P., Hamon, M. & Lanfumey, L. (2008) Differential long-term effects of MDMA on the serotonergic system and hippocampal cell proliferation in 5-HTT knock-out vs. wild-type mice. *Int J Neuropsychopharmacol* **11**, 1149-1162
- Renthal, W., Kumar, A., Xiao, G., Wilkinson, M., Covington, H.E., 3rd, Maze, I., Sikder, D., Robison, A.J., LaPlant, Q., Dietz, D.M., Russo, S.J., Vialou, V., Chakravarty, S., Kodadek, T.J., Stack, A., Kabbaj, M. & Nestler, E.J. (2009) Genome-wide analysis of chromatin regulation by cocaine reveals a role for sirtuins. *Neuron* **62**, 335-348
- Ricaurte, G., Bryan, G., Strauss, L., Seiden, L. & Schuster, C. (1985) Hallucinogenic amphetamine selectively destroys brain serotonin nerve terminals. *Science* **229**, 986-988

- Risbrough, V.B., Masten, V.L., Caldwell, S., Paulus, M.P., Low, M.J. & Geyer, M.A. (2006) Differential contributions of dopamine D1, D2, and D3 receptors to MDMA-induced effects on locomotor behavior patterns in mice. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2349-2358
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R. & Kuhar, M.J. (1988) Cocaine self-administration appears to be mediated by dopamine uptake inhibition. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **12**, 233-239
- Ritz, M.C., Cone, E.J. & Kuhar, M.J. (1990) Cocaine inhibition of ligand binding at dopamine, norepinephrine and serotonin transporters: a structure-activity study. *Life Sci* **46**, 635-645
- Rizo, J. & Rosenmund, C. (2008) Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 665-674
- Roberts, D.C., Koob, G.F., Klonoff, P. & Fibiger, H.C. (1980) Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* **12**, 781-787
- Roberts, D.C., Loh, E.A., Baker, G.B. & Vickers, G. (1994) Lesions of central serotonin systems affect responding on a progressive ratio schedule reinforced either by intravenous cocaine or by food. *Pharmacol Biochem Behav* **49**, 177-182
- Robinson, T.E. & Berridge, K.C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* **18**, 247-291
- Robinson, T.E. & Berridge, K.C. (2000) The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* **95 Suppl 2**, S91-117
- Robinson, T.E., Gorny, G., Mitton, E. & Kolb, B. (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* **39**, 257-266
- Rocha, B.A., Ator, R., Emmett-Oglesby, M.W. & Hen, R. (1997) Intravenous cocaine self-administration in mice lacking 5-HT1B receptors. *Pharmacol Biochem Behav* **57**, 407-412
- Rocha, B.A., Fumagalli, F., Gainetdinov, R.R., Jones, S.R., Ator, R., Giros, B., Miller, G.W. & Caron, M.G. (1998) Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci* **1**, 132-137
- Rocha, B.A., Xu, F., Gainetdinov, R.R. & Caron, M.G. (1999) Acquisition of cocaine self-administration in the noradrenaline transporter knockout mice. *Soc Neurosci* **25**, 437.431
- Rocha, B.A., Goulding, E.H., O'Dell, L.E., Mead, A.N., Coufal, N.G., Parsons, L.H. & Tecott, L.H. (2002) Enhanced locomotor, reinforcing, and neurochemical effects of cocaine in serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor mutant mice. *J Neurosci* **22**, 10039-10045
- Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., Gotz, R. & Barde, Y.A. (1992) Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *Embo J* **11**, 917-922
- Rodriguez, J.J., Montaron, M.F., Aourousseau, C., Le Moal, M. & Abrous, D.N. (1999) Effects of amphetamine and cocaine treatment on c-Fos, Jun-B, and Krox-24 expression in rats with intrastriatal dopaminergic grafts. *Exp Neurol* **159**, 139-152
- Roiser, J.P., Rogers, R.D., Cook, L.J. & Sahakian, B.J. (2006) The effect of polymorphism at the serotonin transporter gene on decision-making, memory and executive function in ecstasy users and controls. *Psychopharmacology (Berl)* **188**, 213-227
- Rolls, E.T. (2000) The orbitofrontal cortex and reward. *Cereb Cortex* **10**, 284-294

- Rothman, R.B., Baumann, M.H., Dersch, C.M., Romero, D.V., Rice, K.C., Carroll, F.I. & Partilla, J.S. (2001) Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin. *Synapse* **39**, 32-41
- Roudkenar, M.H., Halabian, R., Roushandeh, A.M., Nourani, M.R., Masroori, N., Ebrahimi, M., Nikogoftar, M., Rouhbakhsh, M., Bahmani, P., Najafabadi, A.J. & Shokrgozar, M.A. (2009) Lipocalin 2 regulation by thermal stresses: protective role of Lcn2/NGAL against cold and heat stresses. *Exp Cell Res* **315**, 3140-3151
- Rubinstein, M., Phillips, T.J., Bunzow, J.R., Falzone, T.L., Dziewczapolski, G., Zhang, G., Fang, Y., Larson, J.L., McDougall, J.A., Chester, J.A., Saez, C., Pugsley, T.A., Gershnik, O., Low, M.J. & Grandy, D.K. (1997) Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. *Cell* **90**, 991-1001
- Rudnick, G. & Wall, S.C. (1992) The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1817-1821
- Rylett, R.J. & Williams, L.R. (1994) Role of neurotrophins in cholinergic-neurone function in the adult and aged CNS. *Trends Neurosci* **17**, 486-490
- Sabol, K.E. & Seiden, L.S. (1998) Reserpine attenuates D-amphetamine and MDMA-induced transmitter release in vivo: a consideration of dose, core temperature and dopamine synthesis. *Brain Res* **806**, 69-78
- Salzmann, J., Marie-Claire, C., Le Guen, S., Roques, B.P. & Noble, F. (2003) Importance of ERK activation in behavioral and biochemical effects induced by MDMA in mice. *Br J Pharmacol* **140**, 831-838
- Sanchez, J.J., Phillips, C., Borsting, C., Balogh, K., Bogus, M., Fondevila, M., Harrison, C.D., Musgrave-Brown, E., Salas, A., Syndercombe-Court, D., Schneider, P.M., Carracedo, A. & Morling, N. (2006) A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. *Electrophoresis* **27**, 1713-1724
- Scearce-Levie, K., Viswanathan, S.S. & Hen, R. (1999) Locomotor response to MDMA is attenuated in knockout mice lacking the 5-HT<sub>1B</sub> receptor. *Psychopharmacology (Berl)* **141**, 154-161
- Scott, R.M., Hides, L., Allen, J.S., Burke, R. & Lubman, D.I. (2010) Depressive and anxiety symptomatology in ecstasy users: the relative contribution of genes, trauma, life stress and drug use. *Psychopharmacology (Berl)* **209**, 25-36
- Schank, J.R., Ventura, R., Puglisi-Allegra, S., Alcaro, A., Cole, C.D., Liles, L.C., Seeman, P. & Weinschenker, D. (2006) Dopamine beta-hydroxylase knockout mice have alterations in dopamine signaling and are hypersensitive to cocaine. *Neuropsychopharmacology* **31**, 2221-2230
- Schank, J.R., Liles, L.C. & Weinschenker, D. (2008) Norepinephrine signaling through beta-adrenergic receptors is critical for expression of cocaine-induced anxiety. *Biol Psychiatry* **63**, 1007-1012
- Schilt, T., Koeter, M.W., de Win, M.M., Zinkstok, J.R., van Amelsvoort, T.A., Schmand, B. & den Brink, W. (2009) The effect of Ecstasy on memory is moderated by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**, 116-124
- Schmidt, C.J. (1987) Acute administration of methylenedioxymethamphetamine: comparison with the neurochemical effects of its N-desmethyl and N-ethyl analogs. *Eur J Pharmacol* **136**, 81-88
- Schmidt, C.J., Sullivan, C.K. & Fadayel, G.M. (1994) Blockade of striatal 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors reduces the increase in extracellular concentrations of dopamine produced by the amphetamine analogue 3,4-methylenedioxy-methamphetamine. *J Neurochem* **62**, 1382-1389



- Schoenbaum, G. & Setlow, B. (2005) Cocaine makes actions insensitive to outcomes but not extinction: implications for altered orbitofrontal-amygdalar function. *Cereb Cortex* **15**, 1162-1169
- Schoenbaum, G. & Shaham, Y. (2008) The role of orbitofrontal cortex in drug addiction: a review of preclinical studies. *Biol Psychiatry* **63**, 256-262
- Schultz, W., Tremblay, L. & Hollerman, J.R. (2000) Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia. *Cereb Cortex* **10**, 272-284
- Schweizer, F.E., Dresbach, T., DeBello, W.M., O'Connor, V., Augustine, G.J. & Betz, H. (1998) Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science* **279**, 1203-1206
- Segal, D.M., Moraes, C.T. & Mash, D.C. (1997) Up-regulation of D3 dopamine receptor mRNA in the nucleus accumbens of human cocaine fatalities. *Brain Res Mol Brain Res* **45**, 335-339
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chretien, M. & Murphy, R.A. (1996) Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* **379**, 247-250
- Shen, R.Y., Altar, C.A. & Chiodo, L.A. (1994) Brain-derived neurotrophic factor increases the electrical activity of pars compacta dopamine neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8920-8924
- Shippenberg, T.S., Hen, R. & 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**, 258-265
- Shirayama, Y., Hashimoto, K., Iyo, M., Watanabe, K., Higuchi, T. & Minabe, Y. (2000) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-induced egr-1 mRNA in rat brain: pharmacological manipulation. *Eur J Pharmacol* **402**, 215-222
- Simansky, K.J. (1996) Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. *Behav Brain Res* **73**, 37-42
- Simon, N.W. & Setlow, B. (2006) Post-training amphetamine administration enhances memory consolidation in appetitive Pavlovian conditioning: Implications for drug addiction. *Neurobiol Learn Mem* **86**, 305-310
- Siuciak, J.A., Boylan, C., Fritsche, M., Altar, C.A. & Lindsay, R.M. (1996) BDNF increases monoaminergic activity in rat brain following intracerebroventricular or intraparenchymal administration. *Brain Res* **710**, 11-20
- Siuciak, J.A., Clark, M.S., Rind, H.B., Whittemore, S.R. & Russo, A.F. (1998) BDNF induction of tryptophan hydroxylase mRNA levels in the rat brain. *J Neurosci Res* **52**, 149-158
- Sizemore, G.M., Co, C. & 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**, 391-398
- Sklair-Tavron, L. & Nestler, E.J. (1995) Opposing effects of morphine and the neurotrophins, NT-3, NT-4, and BDNF, on locus coeruleus neurons in vitro. *Brain Res* **702**, 117-125
- Snider, W.D. & Johnson, E.M., Jr. (1989) Neurotrophic molecules. *Ann Neurol* **26**, 489-506
- Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D. & Huganir, R.L. (1998) Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* **21**, 393-400
- Sora, I., Takahashi, N., Funada, M., Ujike, H., Revay, R.S., Donovan, D.M., Miner, L.L. & Uhl, G.R. (1997)

- Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1544-1549
- Sora, I., Wichems, C., Takahashi, N., Li, X.F., Zeng, Z., Revay, R., Lesch, K.P., Murphy, D.L. & Uhl, G.R. (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**, 7699-7704
- Sora, I., Hall, F.S., Andrews, A.M., Itokawa, M., Li, X.F., Wei, H.B., Wichems, C., Lesch, K.P., Murphy, D.L. & Uhl, G.R. (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5300-5305
- Spealman, R.D., Madras, B.K. & Bergman, J. (1989) Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. II. Stimulant effects on schedule-controlled behavior. *J Pharmacol Exp Ther* **251**, 142-149
- Spealman, R.D. (1993) Modification of behavioral effects of cocaine by selective serotonin and dopamine uptake inhibitors in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **112**, 93-99
- Sprouse, J.S., Bradberry, C.W., Roth, R.H. & Aghajanian, G.K. (1989) MDMA (3,4-methylenedioxymethamphetamine) inhibits the firing of dorsal raphe neurons in brain slices via release of serotonin. *Eur J Pharmacol* **167**, 375-383
- Stalnaker, T.A., Roesch, M.R., Franz, T.M., Burke, K.A. & Schoenbaum, G. (2006) Abnormal associative encoding in orbitofrontal neurons in cocaine-experienced rats during decision-making. *Eur J Neurosci* **24**, 2643-2653
- Stein, E.A., Pankiewicz, J., Harsch, H.H., Cho, J.K., Fuller, S.A., Hoffmann, R.G., Hawkins, M., Rao, S.M., Bandettini, P.A. & Bloom, A.S. (1998) Nicotine-induced limbic cortical activation in the human brain: a functional MRI study. *Am J Psychiatry* **155**, 1009-1015
- Stephens, M., Smith, N.J. & Donnelly, P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* **68**, 978-989
- Stephenson, C.P., Hunt, G.E., Topple, A.N. & McGregor, I.S. (1999) The distribution of 3,4-methylenedioxymethamphetamine "Ecstasy"-induced c-fos expression in rat brain. *Neuroscience* **92**, 1011-1023
- Stevens, D. (1999) Cocaine abuse and dependence linked to genetic risk factors among female twins. *West J Med* **171**, 24
- Strachan, T. & Read, A. (2005) Human molecular genetics 3. *Garland Science, New York*,
- Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G., Mack, A.F., Wagner, H.J., Just, L., Skutella, T., Lang, U.E., Henke, G., Striegel, M., Hollmann, M., Rouach, N., Nicoll, R.A., McCormick, J.A., Wang, J., Pearce, D. & Lang, F. (2005a) Regulation of GluR1 abundance in murine hippocampal neurones by serum- and glucocorticoid-inducible kinase 3. *J Physiol* **565**, 381-390
- Strutz-Seebohm, N., Seebohm, G., Shumilina, E., Mack, A.F., Wagner, H.J., Lampert, A., Grahammer, F., Henke, G., Just, L., Skutella, T., Hollmann, M. & Lang, F. (2005b) Glucocorticoid adrenal steroids and glucocorticoid-inducible kinase isoforms in the regulation of GluR6 expression. *J Physiol* **565**, 391-401
- Stumm, G., Schlegel, J., Schafer, T., Wurz, C., Mennel, H.D., Krieg, J.C. & Vedder, H. (1999) Amphetamines induce apoptosis and regulation of bcl-x splice variants in neocortical neurons. *Faseb J* **13**, 1065-1072
- Tang, W.X., Fasulo, W.H., Mash, D.C. & Hemby, S.E. (2003) Molecular profiling of midbrain dopamine regions in cocaine overdose victims. *J Neurochem* **85**, 911-924

- Thanos, P.K., Michaelides, M., Benveniste, H., Wang, G.J. & Volkow, N.D. (2008) The effects of cocaine on regional brain glucose metabolism is attenuated in dopamine transporter knockout mice. *Synapse* **62**, 319-324
- Thiriet, N., Ladenheim, B., McCoy, M.T. & Cadet, J.L. (2002) Analysis of ecstasy (MDMA)-induced transcriptional responses in the rat cortex. *FASEB J* **16**, 1887-1894
- Thoenen, H., Bandtlow, C. & Heumann, R. (1987a) The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: comparison with the periphery. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **109**, 145-178
- Thoenen, H., Barde, Y.A., Davies, A.M. & Johnson, J.E. (1987b) Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp* **126**, 82-95
- Thomas, D.M., Dowgiert, J., Geddes, T.J., Francescutti-Verbeem, D., Liu, X. & Kuhn, D.M. (2004) Microglial activation is a pharmacologically specific marker for the neurotoxic amphetamines. *Neurosci Lett* **367**, 349-354
- Thomas, M.J., Kalivas, P.W. & Shaham, Y. (2008) Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* **154**, 327-342
- Thomsen, M., Han, D.D., Gu, H.H. & Caine, S.B. (2009) Lack of cocaine self-administration in mice expressing a cocaine-insensitive dopamine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **331**, 204-211
- Tilley, M.R., Cagniard, B., Zhuang, X., Han, D.D., Tiao, N. & Gu, H.H. (2007) Cocaine reward and locomotion stimulation in mice with reduced dopamine transporter expression. *BMC Neurosci* **8**, 42
- Tilley, M.R. & Gu, H.H. (2008) Dopamine transporter inhibition is required for cocaine-induced stereotypy. *Neuroreport* **19**, 1137-1140
- Tilley, M.R., O'Neill, B., Han, D.D. & Gu, H.H. (2009) Cocaine does not produce reward in absence of dopamine transporter inhibition. *Neuroreport* **20**, 9-12
- Titeler, M., Lyon, R.A. & Glennon, R.A. (1988) Radioligand binding evidence implicates the brain 5-HT<sub>2</sub> receptor as a site of action for LSD and phenylisopropylamine hallucinogens. *Psychopharmacology (Berl)* **94**, 213-216
- Tobler, A.R., Short, S., Andersen, M.R., Paner, T.M., Briggs, J.C., Lambert, S.M., Wu, P.P., Wang, Y., Spoonde, A.Y., Koehler, R.T., Peyret, N., Chen, C., Broomer, A.J., Ridzon, D.A., Zhou, H., Hoo, B.S., Hayashibara, K.C., Leong, L.N., Ma, C.N., Rosenblum, B.B., Day, J.P., Ziegler, J.S., De La Vega, F.M., Rhodes, M.D., Hennessy, K.M. & Wenz, H.M. (2005) The SNPLex genotyping system: a flexible and scalable platform for SNP genotyping. *J Biomol Tech* **16**, 398-406
- Torres, E., Gutierrez-Lopez, M.D., Borcel, E., Peraile, I., Mayado, A., O'Shea, E. & Colado, M.I. (2010) Evidence that MDMA ('ecstasy') increases cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor expression in microglial cells: role in the neuroinflammatory response in rat brain. *J Neurochem* **113**, 67-78
- Trigo, J.M., Renoir, T., Lanfumey, L., Hamon, M., Lesch, K.P., Robledo, P. & Maldonado, R. (2007) 3,4-methylenedioxymethamphetamine self-administration is abolished in serotonin transporter knockout mice. *Biol Psychiatry* **62**, 669-679
- Trigo, J.M., Cabrero-Castel, A., Berrendero, F., Maldonado, R. & Robledo, P. (2008) MDMA modifies active avoidance learning and recall in mice. *Psychopharmacology (Berl)* **197**, 391-400
- Tzschentke, T.M. (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* **56**, 613-672

- Uhl, G.R., Li, S., Takahashi, N., Itokawa, K., Lin, Z., Hazama, M. & Sora, I. (2000) The VMAT2 gene in mice and humans: amphetamine responses, locomotion, cardiac arrhythmias, aging, and vulnerability to dopaminergic toxins. *FASEB J* **14**, 2459-2465
- Uhl, G.R., Liu, Q.R., Walther, D., Hess, J. & Naiman, D. (2001) Polysubstance abuse-vulnerability genes: genome scans for association, using 1,004 subjects and 1,494 single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* **69**, 1290-1300
- Uhl, G.R., Hall, F.S. & Sora, I. (2002) Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry* **7**, 21-26
- Ungar, D. & Hughson, F.M. (2003) SNARE protein structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 493-517
- UNODC (2009) World Drug Report 2009. *United Nations Office on Drugs and Crime United Nations Publications* ISBN: 978-92-1-148240-9.
- van der Sluis, S., Verhage, M., Posthuma, D. & Dolan, C.V. (2010) Phenotypic complexity, measurement bias, and poor phenotypic resolution contribute to the missing heritability problem in genetic association studies. *PLoS One* **5**, e13929
- Vestal, D.J., Buss, J.E., McKercher, S.R., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kelner, G.S., Asundi, V.K. & Maki, R.A. (1998) Murine GBP-2: a new IFN-gamma-induced member of the GBP family of GTPases isolated from macrophages. *J Interferon Cytokine Res* **18**, 977-985
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wolf, A.P., Schlyer, D., Shiue, C.Y., Alpert, R., Dewey, S.L., Logan, J., Bendriem, B., Christman, D. & et al. (1990) Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *Am J Psychiatry* **147**, 719-724
- Volkow, N.D., Hitzemann, R., Wang, G.J., Fowler, J.S., Wolf, A.P., Dewey, S.L. & Handlesman, L. (1992) Long-term frontal brain metabolic changes in cocaine abusers. *Synapse* **11**, 184-190
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., Hitzemann, R., Logan, J., Schlyer, D.J., Dewey, S.L. & Wolf, A.P. (1993) Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers. *Synapse* **14**, 169-177
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fischman, M.W., Foltin, R.W., Fowler, J.S., Abumrad, N.N., Vitkun, S., Logan, J., Gatley, S.J., Pappas, N., Hitzemann, R. & Shea, C.E. (1997a) Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* **386**, 827-830
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Gatley, S.J., Hitzemann, R., Chen, A.D., Dewey, S.L. & Pappas, N. (1997b) Decreased striatal dopaminergic responsiveness in detoxified cocaine-dependent subjects. *Nature* **386**, 830-833
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Hitzemann, R., Angrist, B., Gatley, S.J., Logan, J., Ding, Y.S. & Pappas, N. (1999) Association of methylphenidate-induced craving with changes in right striato-orbitofrontal metabolism in cocaine abusers: implications in addiction. *Am J Psychiatry* **156**, 19-26
- Volkow, N.D. & Fowler, J.S. (2000) Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* **10**, 318-325
- Volkow, N.D., Chang, L., Wang, G.J., Fowler, J.S., Ding, Y.S., Sedler, M., Logan, J., Franceschi, D., Gatley, J., Hitzemann, R., Gifford, A., Wong, C. & Pappas, N. (2001) Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *Am J Psychiatry* **158**, 2015-2021

- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Franceschi, D., Maynard, L., Ding, Y.S., Gatley, S.J., Gifford, A., Zhu, W. & Swanson, J.M. (2002) Relationship between blockade of dopamine transporters by oral methylphenidate and the increases in extracellular dopamine: therapeutic implications. *Synapse* **43**, 181-187
- Volkow, N.D., Fowler, J.S. & Wang, G.J. (2003) The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* **111**, 1444-1451
- Volkow, N.D. & Swanson, J.M. (2003) Variables that affect the clinical use and abuse of methylphenidate in the treatment of ADHD. *Am J Psychiatry* **160**, 1909-1918
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J. & Swanson, J.M. (2004) Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. *Mol Psychiatry* **9**, 557-569
- Volkow, N.D. & Li, T.K. (2004) Drug addiction: the neurobiology of behaviour gone awry. *Nat Rev Neurosci* **5**, 963-970
- Wagner, F.A. & Anthony, J.C. (2002) From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol. *Neuropsychopharmacology* **26**, 479-488
- Walsh, S.L. & Cunningham, K.A. (1997) Serotonergic mechanisms involved in the discriminative stimulus, reinforcing and subjective effects of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* **130**, 41-58
- Wang, G.J., Volkow, N.D., Fowler, J.S., Cervany, P., Hitzemann, R.J., Pappas, N.R., Wong, C.T. & Felder, C. (1999) Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. *Life Sci* **64**, 775-784
- Wang, L., Lv, Z., Hu, Z., Sheng, J., Hui, B., Sun, J. & Ma, L. (2010) Chronic cocaine-induced H3 acetylation and transcriptional activation of CaMKIIalpha in the nucleus accumbens is critical for motivation for drug reinforcement. *Neuropsychopharmacology* **35**, 913-928
- Wang, Y.M., Gainetdinov, R.R., Fumagalli, F., Xu, F., Jones, S.R., Bock, C.B., Miller, G.W., Wightman, R.M. & Caron, M.G. (1997) Knockout of the vesicular monoamine transporter 2 gene results in neonatal death and supersensitivity to cocaine and amphetamine. *Neuron* **19**, 1285-1296
- Wei, L.N. (2011) The RNA superhighway: axonal RNA trafficking of kappa opioid receptor mRNA for neurite growth. *Integr Biol (Camb)* **3**, 10-16
- Welter, M., Vallone, D., Samad, T.A., Meziane, H., Usiello, A. & Borrelli, E. (2007) Absence of dopamine D2 receptors unmasks an inhibitory control over the brain circuitries activated by cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 6840-6845
- Weller, A.E., Dahl, J.P., Lohoff, F.W., Kampman, K.M., Oslin, D.W., Dackis, C., Ferraro, T.N., O'Brien, C.P. & Berrettini, W.H. (2006) No association between polymorphisms in the prostate apoptosis factor-4 gene and cocaine dependence. *Psychiatr Genet* **16**, 193-196
- Wetherill, L., Schuckit, M.A., Hesselbrock, V., Xuei, X., Liang, T., Dick, D.M., Kramer, J., Nurnberger, J.I., Jr., Tischfield, J.A., Porjesz, B., Edenberg, H.J. & Foroud, T. (2008) Neuropeptide Y receptor genes are associated with alcohol dependence, alcohol withdrawal phenotypes, and cocaine dependence. *Alcohol Clin Exp Res* **32**, 2031-2040
- White, N.M. (1996) Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. *Addiction* **91**, 921-949; discussion 951-965
- White, S.R., Obradovic, T., Imel, K.M. & Wheaton, M.J. (1996) The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "Ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in

the central nervous system. *Prog Neurobiol* **49**, 455-479

- Wichems, C.H., Hollingsworth, C.K. & Bennett, B.A. (1995) Release of serotonin induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and other substituted amphetamines in cultured fetal raphe neurons: further evidence for calcium-independent mechanisms of release. *Brain Res* **695**, 10-18
- Williams, T.J., LaForge, K.S., Gordon, D., Bart, G., Kellogg, S., Ott, J. & Kreek, M.J. (2007) Prodynorphin gene promoter repeat associated with cocaine/alcohol codependence. *Addict Biol* **12**, 496-502
- Winstanley, C.A., LaPlant, Q., Theobald, D.E., Green, T.A., Bachtell, R.K., Perrotti, L.I., DiLeone, R.J., Russo, S.J., Garth, W.J., Self, D.W. & Nestler, E.J. (2007) DeltaFosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction. *J Neurosci* **27**, 10497-10507
- Wise, R.A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* **5**, 483-494
- Witkin, J.M., Baez, M., Yu, J., Barton, M.E. & Shannon, H.E. (2007) Constitutive deletion of the serotonin-7 (5-HT<sub>7</sub>) receptor decreases electrical and chemical seizure thresholds. *Epilepsy Res* **75**, 39-45
- Woolverton, W.L., Goldberg, L.I. & Ginos, J.Z. (1984) Intravenous self-administration of dopamine receptor agonists by rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **230**, 678-683
- Wu, Z., Irizarry, R.A., Gentleman, R., Murillo, F.M. & Spencer, F. (2004) A model based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *Journal of the American Statistical Association* **99**, 909-917
- Wyvell, C.L. & Berridge, K.C. (2001) Incentive sensitization by previous amphetamine exposure: increased cue-triggered "wanting" for sucrose reward. *J Neurosci* **21**, 7831-7840
- Xie, T., Tong, L., McCann, U.D., Yuan, J., Becker, K.G., Mehan, A.O., Cheadle, C., Donovan, D.M. & Ricaurte, G.A. (2004) Identification and characterization of metallothionein-1 and -2 gene expression in the context of (+/-)3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced toxicity to brain dopaminergic neurons. *J Neurosci* **24**, 7043-7050
- Xie, Z., Srivastava, D.P., Photowala, H., Kai, L., Cahill, M.E., Woolfrey, K.M., Shum, C.Y., Surmeier, D.J. & Penzes, P. (2007) Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* **56**, 640-656
- Xu, F., Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Jones, S.R., Bohn, L.M., Miller, G.W., Wang, Y.M. & Caron, M.G. (2000a) Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* **3**, 465-471
- Xu, M., Hu, X.T., Cooper, D.C., Moratalla, R., Graybiel, A.M., White, F.J. & Tonegawa, S. (1994) Elimination of cocaine-induced hyperactivity and dopamine-mediated neurophysiological effects in dopamine D1 receptor mutant mice. *Cell* **79**, 945-955
- Xu, M., Koeltzow, T.E., Santiago, G.T., Moratalla, R., Cooper, D.C., Hu, X.T., White, N.M., Graybiel, A.M., White, F.J. & Tonegawa, S. (1997) Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors. *Neuron* **19**, 837-848
- Xu, M., Guo, Y., Vorhees, C.V. & Zhang, J. (2000b) Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Res* **852**, 198-207
- Yamada, K., Akimoto, H., Ogawa, Y., Kinumi, T., Kamagata, Y. & Ohmiya, Y. (2009) Upregulation of immunity-related GTPase (IRG) proteins by TNF-alpha in murine astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **382**, 434-439

- Yamada, M.K., Nakanishi, K., Ohba, S., Nakamura, T., Ikegaya, Y., Nishiyama, N. & Matsuki, N. (2002) Brain-derived neurotrophic factor promotes the maturation of GABAergic mechanisms in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* **22**, 7580-7585
- Yamagata, Y., Kobayashi, S., Umeda, T., Inoue, A., Sakagami, H., Fukaya, M., Watanabe, M., Hatanaka, N., Totsuka, M., Yagi, T., Obata, K., Imoto, K., Yanagawa, Y., Manabe, T. & Okabe, S. (2009) Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning. *J Neurosci* **29**, 7607-7618
- Yamamoto, B.K. & Spanos, L.J. (1988) The acute effects of methylenedioxymethamphetamine on dopamine release in the awake-behaving rat. *Eur J Pharmacol* **148**, 195-203
- Yamamoto, B.K., Nash, J.F. & Gudelsky, G.A. (1995) Modulation of methylenedioxymethamphetamine-induced striatal dopamine release by the interaction between serotonin and gamma-aminobutyric acid in the substantia nigra. *J Pharmacol Exp Ther* **273**, 1063-1070
- Yau, J.L., Kelly, P.A., Sharkey, J. & Seckl, J.R. (1994) Chronic 3,4-methylenedioxymethamphetamine administration decreases glucocorticoid and mineralocorticoid receptor, but increases 5-hydroxytryptamine<sub>1C</sub> receptor gene expression in the rat hippocampus. *Neuroscience* **61**, 31-40
- Yau, J.L., Noble, J. & Seckl, J.R. (1997) Site-specific regulation of corticosteroid and serotonin receptor subtype gene expression in the rat hippocampus following 3,4-methylenedioxymethamphetamine: role of corticosterone and serotonin. *Neuroscience* **78**, 111-121
- Yoon, T.Y., Lu, X., Diao, J., Lee, S.M., Ha, T. & Shin, Y.K. (2008) Complexin and Ca<sup>2+</sup> stimulate SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 707-713
- Yu, Y., Kranzler, H.R., Panhuysen, C., Weiss, R.D., Poling, J., Farrer, L.A. & Gelernter, J. (2008) Substance dependence low-density whole genome association study in two distinct American populations. *Hum Genet* **123**, 495-506
- Yuen, E.C. & Mobley, W.C. (1996) Therapeutic potential of neurotrophic factors for neurological disorders. *Ann Neurol* **40**, 346-354
- Yuferov, V., Krosiak, T., Laforge, K.S., Zhou, Y., Ho, A. & Kreek, M.J. (2003) Differential gene expression in the rat caudate putamen after "binge" cocaine administration: advantage of triplicate microarray analysis. *Synapse* **48**, 157-169
- Yuferov, V., Nielsen, D., Butelman, E. & Kreek, M.J. (2005) Microarray studies of psychostimulant-induced changes in gene expression. *Addict Biol* **10**, 101-118
- Yuferov, V., Ji, F., Nielsen, D.A., Levran, O., Ho, A., Morgello, S., Shi, R., Ott, J. & Kreek, M.J. (2009) A functional haplotype implicated in vulnerability to develop cocaine dependence is associated with reduced PDYN expression in human brain. *Neuropsychopharmacology* **34**, 1185-1197
- Zerrahn, J., Schaible, U.E., Brinkmann, V., Gühlich, U. & Kaufmann, S.H. (2002) The IFN-inducible Golgi- and endoplasmic reticulum-associated 47-kDa GTPase IIGP is transiently expressed during listeriosis. *J Immunol* **168**, 3428-3436
- Zhang, H., Kranzler, H.R., Yang, B.Z., Luo, X. & Gelernter, J. (2008) The OPRD1 and OPRK1 loci in alcohol or drug dependence: OPRD1 variation modulates substance dependence risk. *Mol Psychiatry* **13**, 531-543
- Zhang, H.M., Yuan, J., Cheung, P., Luo, H., Yanagawa, B., Chau, D., Stephan-Tozy, N., Wong, B.W., Zhang, J., Wilson, J.E., McManus, B.M. & Yang, D. (2003) Overexpression of interferon-gamma-inducible GTPase

inhibits coxsackievirus B3-induced apoptosis through the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and inhibition of viral replication. *J Biol Chem* **278**, 33011-33019

Zhou, X.F. & Rush, R.A. (1994) Localization of neurotrophin-3-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Brain Res* **643**, 162-172

Zondervan, K.T. & Cardon, L.R. (2004) The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nat Rev Genet* **5**, 89-100

Zuo, L., Kranzler, H.R., Luo, X., Yang, B.Z., Weiss, R., Brady, K., Poling, J., Farrer, L. & Gelernter, J. (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**, 1504-1513



# APÈNDIX



# Article 1

N. Fernàndez-Castillo, M. Ribasés, C. Roncero,  
M. Casas, B. Gonzalvo, B. Cormand.  
*Association study between the DAT1, DBH and DRD2  
genes and cocaine dependence in a Spanish sample.*  
Psychiatric Genetics 2010, 20:317–320  
Versió publicada

## Association study between the *DAT1*, *DBH* and *DRD2* genes and cocaine dependence in a Spanish sample

Noèlia Fernández-Castillo<sup>a,b,d</sup>, Marta Ribasés<sup>e,f</sup>, Carlos Roncero<sup>c,e</sup>, Miquel Casas<sup>c,e</sup>, Begoña Gonzalvo<sup>e</sup> and Bru Cormand<sup>a,b,d</sup>

Drug addiction is a complex neuropsychiatric disorder involving the environmental and genetic factors. Genetic and physiological evidences suggest that the dopaminergic system may play an important role in cocaine abuse and dependence. Several association studies have focused on dopaminergic genes. We genotyped the Int8 and 3'UTR variable number of tandem repeats of the dopamine transporter gene (*DAT1/SLC6A3*), the *TaqIA* (rs1800497) and *TaqIB* (rs1079597) SNP polymorphisms within the dopamine receptor D2 gene and the 19-bp insertion/deletion and c.444G > A (rs1108580) polymorphisms of the dopamine  $\beta$ -hydroxylase gene (*DBH*) in a Spanish sample of 169 patients with cocaine addiction and 169 sex-matched controls. The case-control study showed a nominal overrepresentation of the 5R/5R genotype of the Int8 variable number of tandem repeats within *DAT1* in cocaine abusers ( $P=0.016$ ). However, no significant associations were detected when *DAT1* haplotype frequencies or polymorphisms within the other

dopaminergic genes were considered. Sample size is limited and further studies should be performed in a larger cohort. *Psychiatr Genet* 20:317–320 © 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

*Psychiatric Genetics* 2010, 20:317–320

**Keywords:** case-control association study, cocaine dependence, *DAT1*, *DBH*, dopamine transporter, *DRD2*, *SLC6A3*

<sup>a</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, <sup>b</sup>Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, <sup>c</sup>Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, <sup>d</sup>Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), <sup>e</sup>Department of Psychiatry and <sup>f</sup>Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

Correspondence to Dr Bru Cormand, PhD, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Catalonia, Spain  
Tel: +34 93 402 10 13; fax: +34 93 403 44 20;  
e-mail: bcormand@ub.edu

Received 24 August 2009 Revised 19 April 2010  
Accepted 23 April 2010

### Introduction

Cocaine addiction is a complex psychiatric disorder that results from the interaction of different genetic and environmental factors. The dopaminergic system plays an important role in drug addiction. Cocaine blocks the dopamine transporter (*DAT1*) (Volkow *et al.*, 1996) and this binding causes an increase of dopamine in the synapse that results in stimulation of the reward system and reinforcement (Volkow *et al.*, 1999, 2002). In addition, according to 'the reward deficiency syndrome' hypothesis (Comings and Blum, 2000), high dopamine reuptake or high levels of dopamine degradation, as well as low density of dopamine receptors, could predispose to cocaine addiction.

In this regard, several association studies in cocaine dependence have focused on dopaminergic genes, such as genes encoding *DAT1* (Persico *et al.*, 1993; Gelernter *et al.*, 1994; Guindalini *et al.*, 2006; Ballon *et al.*, 2007), the dopamine receptor D2 (*DRD2*) (Noble *et al.*, 1993; Persico *et al.*, 1996; Gelernter *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007), *DRD3* (Freimer *et al.*, 1996; Comings *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Bloch *et al.*, 2009) and *DRD4* (Ballon *et al.*, 2007) and dopamine  $\beta$  hydroxylase (*DBH*) (Cubells *et al.*, 2000; Kalayasiri *et al.*, 2007; Guindalini *et al.*, 2008), and displayed conflicting results.

We aimed to study several polymorphisms in *DAT1* [two variable number of tandem repeats (VNTRs) in the 3' untranslated region (3'UTR) and in intron 8], *DRD2* [*TaqIA* and *TaqIB* single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 3'UTR and in intron 1, respectively] and *DBH* (19-bp insertion/deletion in 5'UTR and c.444G > A in exon 2) in an ethnically homogeneous sample of 169 Spanish Caucasian cocaine-dependent patients and 169 sex-matched unrelated healthy controls.

### Materials and methods

The patient sample consisted of 169 cocaine-dependent patients [mean age  $37 \pm 7$  years and 84% males ( $n = 142$ )] recruited and evaluated at the Drugs Unit of the Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) according to *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, Fourth Edition Text Revision criteria. One hundred and sixty-nine sex-matched unrelated controls (mean age  $39 \pm 9$  years) were obtained at the Blood and Tissues Bank of the Hospital Universitari Vall d'Hebron. All of them were non-smoker blood donors that had never injected drugs intravenously. Both patients and controls were Spanish and Caucasian, with the last names of the parents being of Spanish origin. Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes using the *salting-out* method (Miller *et al.*, 1988).

Forty and 30-bp VNTRs in the 3'UTR and in intron 8 of the *DAT1* gene were genotyped as described earlier (Qian *et al.*, 2004; Brookes *et al.*, 2006). Genotyping of the *TaqIA* (rs1800497) and *TaqIB* (rs1079597) SNPs within the *DRD2* gene as well as the 19-bp insertion/deletion and the c.444G > A (rs1108580) SNP of the *DBH* gene has also been described earlier (Tan *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2003; respectively).

Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was assessed for all genotypes using the HWE software ([www2.biology.ualberta.ca/jbrzustohwenj.html](http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzustohwenj.html)). Genetic Power Calculator ([pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc](http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc)) was used to estimate the statistical power of the sample assuming an odds ratio (OR) of 1.5, a disease prevalence of 0.03, a calculated average Minor Allele Frequency of 0.27 and a significance level of 0.05. Genotype frequencies under a codominant model and allele frequencies were compared between cases and controls using the Fisher's exact test. Genotypes and alleles of VNTRs with a frequency under 0.05 were grouped in a single class. OR and confidence intervals (CI) were estimated using SPSS v14.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Logistic regression was used to adjust by age. The significance threshold was set at 2 *P* value of less than 0.0042 after the multiple comparison correction of Bonferroni considering genotype and allele comparisons for six different polymorphisms. When a nominal association was found, genotypes under recessive and dominant models were also compared. Haplotypes were estimated using the UNPHASED software ([homepages.lshmt.ac.uk/frankdudbridge/software/unphased/](http://homepages.lshmt.ac.uk/frankdudbridge/software/unphased/)).

**Results**

All the studied polymorphisms were in HWE in both cases and controls (Table 1). The minimal statistical power for the  $\chi^2$  test in our sample was 48%. When we

compared genotype and allele distributions of the *DAT1*, *DRD2* and *DBH* polymorphic variants between cocaine dependence patients and controls, no significant differences were detected for the *DRD2* and *DBH* genes (Table 1). Instead, a nominal association was identified under a codominant model for the Int8 VNTR in *DAT1* (*P* = 0.047), with an overrepresentation of the 5R/5R genotype in cocaine addicts [*P* = 0.016, OR = 4.02 (95% CI = 1.3–12.4)] that was also nominally significant when adjusting by age [*P* = 0.015, OR = 1.13 (95% CI = 1.02–1.26)]. However, these differences were not statistically significant after applying the Bonferroni correction. We further estimated *DAT1* haplotype frequencies considering the Int8 and the 3'UTR VNTRs but their comparison between cases and controls showed no significant differences (Table 2). Although the *DBH* polymorphisms did not show association signals in the single-marker analysis, we also tested the 19-bp deletion-c.444G > A haplotype as it had earlier been found associated with cocaine dependence (Cubells *et al.*, 2000), but no significant association was detected in our sample (Table 2).

**Discussion**

In this study a nominal association between cocaine dependence and the 5R/5R genotype of the Int8 VNTR polymorphism in the *DAT1* gene has been detected in a Caucasian Spanish population. A previous study in a Brazilian sample also found association between cocaine dependence and this polymorphism (Guindalini *et al.*, 2006). However, in this cohort the 6R allele (named allele 3 by the authors) and the 6R/6R genotype were more frequent in cases. This study also showed an influence of the 5R and 6R alleles on *DAT1* expression, as both showed decreased transcription levels when inserted into intronic or into 5' sequences of a reporter gene and transfected into appropriate cell lines, the 6R allele

**Table 1 Genotypic and allelic distributions of six polymorphisms within the *DAT1*, *DRD2* and *DBH* genes in 169 cocaine-dependent patients and 169 controls from Spain**

Gene	Polymorphism	HWE		Genotypes								Alleles	
		Cases	Controls	Cases N (%)				Controls N (%)				<i>P</i>	<i>P</i>
<i>DAT1</i>	3'UTR VNTR	0.31	0.54	9R/9R	9R/10R	10R/10R	Others <sup>a</sup>	9R/9R	9R/10R	10R/10R	Others <sup>a</sup>	0.74	0.49
	Int8 VNTR			15 (8.9)	52 (30.8)	100 (59.2)	2 (1.2)	4 (2.4)	56 (33.1)	108 (63.9)	1 (0.6)		
<i>DRD2</i>	TaqIA	0.24	1.00	CC	TC	TT		CC	TC	TT		0.56	0.68
	TaqIB			123 (72.8)	40 (23.7)	6 (3.6)	117 (69.2)	48 (28.4)	4 (2.4)				
<i>DBH</i>	5'UTR Ins/del	0.67	0.37	AA	AG	GG		AA	AG	GG		0.55	0.90
	c.444G>A			2 (1.2)	30 (17.8)	137 (81.1)	0 (0)	32 (18.9)	137 (81.1)				
		0.65	0.63	42 (24.9)	88 (52.1)	39 (23.1)	58 (34.3)	79 (46.7)	32 (18.9)		0.16	0.09	
		1	1.00	43 (25.4)	85 (50.3)	41 (24.3)	48 (28.4)	84 (49.7)	37 (21.9)		0.79	0.54	

DAT1, dopamine transporter; DBH, dopamine β-hydroxylase; DRD2, dopamine receptor D2; HWE, Hardy–Weinberg Equilibrium; VNTR, variable number of tandem repeats.

<sup>a</sup>Genotypes and alleles with frequency under 0.05 were grouped in a single class.

<sup>b</sup>For the Int8 VNTR in *DAT1*, the comparison of the 5R/5R genotype versus all the others displayed a *P* value of 0.016 (not shown in the Table), with an odds ratio (OR) of 4.02 (95% Confidence Interval= 1.3–12.4) that was not statistically significant after the Bonferroni correction for multiple testing.

**Table 2** Haplotype analysis of the *DBH* and *DAT1* genes

Haplotype	Cases n (%)	Controls n (%)
<i>DBH</i> : 5'UTR 19-bp insertion/deletion - c.444G>A <sup>a</sup>		
Del-A	114 (33.6)	93 (27.8)
Del-G	52 (15.5)	50 (15)
Ins-A	53 (15.8)	63 (18.9)
Ins-G	119 (35.1)	128 (38.3)
<i>DAT1</i> : Int8 VNTR - 3'UTR VNTR <sup>b</sup>		
5R-9R	64 (20.9)	55 (17.9)
6R-9R	40 (13.1)	44 (14.3)
6R-10R	202 (66.0)	209 (67.8)

*DAT1*, dopamine transporter; *DBH*, dopamine  $\beta$ -hydroxylase; VNTR, variable number of tandem repeats.

<sup>a</sup>Overall association  $\chi^2=3.027$ ; d.f.=3;  $P=0.3875$ .

<sup>b</sup>Overall association  $\chi^2=0.9846$ ; d.f.=2;  $P=0.6112$ .

reaching lower values than the 5R allele. In addition, the 6R allele showed a further decreased expression upon cocaine treatment (Guindalini *et al.*, 2006). These data prompted the authors to suggest that 6R/6R individuals may exhibit a differential response through altered *DAT1* gene expression when exposed to cocaine. However, the conflicting results observed in association studies, including ours, suggest that the Int8 VNTR polymorphism may not be the only functional variation in the gene that is related to the tested phenotype, or that other elements such as environmental risk factors or genetic background have a distorting effect on the analyses. Alternatively, we cannot discard a false positive result in our study, since the single-marker results were not statistically significant after the Bonferroni correction for multiple testing, and the multiple-marker analysis of the Int8 and the 3'UTR VNTRs in the *DAT1* gene did not show any haplotype overrepresented in patients.

No significant association was found between cocaine dependence and the 3'UTR VNTR of *DAT1*, the *TaqIA* and *TaqIB* of *DRD2* and the 19-bp insertion/deletion and c.444G>A of *DBH*, although a complete coverage of these genes is required to properly assess their involvement in this psychiatric disorder. The comparison of allele and genotype frequencies at all the studied polymorphisms between our control cohort and several European populations showed similar figure (Franke *et al.*, 2008; Togsverd *et al.*, 2008; Schosser *et al.*, 2010; [www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)). As reviewed earlier (Ballon *et al.*, 2007), no association has been reported between cocaine addiction and the 3'UTR VNTR polymorphism in the *DAT1* gene (Persico *et al.*, 1993; Gelernter *et al.*, 1994; Guindalini *et al.*, 2006; Ballon *et al.*, 2007), although a positive association was detected in a subgroup of Caucasian cocaine addicts which also presented cocaine-induced paranoia (Gelernter *et al.*, 1994). Two studies reported a positive association with the *DRD2 Taq1A* and *Taq1B* variations (Noble *et al.*, 1993; Persico *et al.*, 1996), but others did not replicate this association (Gelernter *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005). A more recent study described an association between cocaine dependence

with comorbid childhood ADHD and the *DRD2 Taq1A* polymorphism as well as a repeat in exon 3 of the *DRD4* gene (Ballon *et al.*, 2007). These conflicting results, together with those described between cocaine addiction and the *DRD3 BaI* polymorphism (Freimer *et al.*, 1996; Comings *et al.*, 1999; Messas *et al.*, 2005; Ballon *et al.*, 2007; Bloch *et al.*, 2009) highlight the need for more extensive association studies in terms of sample size and genetic coverage.

Polymorphisms in the *DBH* gene coding for DBH that catalyzes the conversion of dopamine to norepinephrine, have also been studied. The 19-bp deletion-c.444A haplotype of the *DBH* gene had been earlier associated with cocaine-induced paranoia and low DBH activity in plasma (Cubells *et al.*, 2000). In our sample we did not detect significant differences between cases and controls, although a slight overrepresentation of this allelic combination was observed in cases (33.6% in cases vs. 27.8% in controls; Table 2). Other polymorphisms within the gene have also been considered in earlier studies. In this regard, the -1021T>C (rs1611115) SNP in the *DBH* 5'UTR was associated with an increased propensity to paranoia over time during cocaine self-administration (Kalayasiri *et al.*, 2007) but showed no association with cocaine addiction (Guindalini *et al.*, 2008).

Limited sample size and heterogeneity at different levels may explain the observed conflicting results. In this regard, ethnicity, sex, comorbidity with other psychiatric disorders, environmental risk factors as well as different endophenotypes, such as cocaine-induced paranoia, may bias association results and might be important issues to consider in future studies to disentangle the genetic background of cocaine dependence.

In conclusion, we found nominal association between cocaine dependence and the 5R/5R genotype of the Int8 VNTR within the *DAT1* gene. Nevertheless, although our Spanish sample is ethnically homogeneous and cases and controls were individually sex-matched, sample size is still limited and further studies should be performed in a larger cohort.

### Acknowledgements

The authors are grateful to patients and controls for their participation in the study, to Rebeca Resmella and Constanza Daigre (Outpatient Drug clinic Vall d'Hebron) for their participation in the clinical assessment and collection of blood samples and to M. Dolors Castellar and others from the Banc de Sang i Teixits (Hospital Vall d'Hebron) for their collaboration in the recruitment of controls. NF-C and MR are recipients of a BRD and a Miguel de Servet contracts from the University of Barcelona and from the Instituto de Salud Carlos III (Spain), respectively.

This study was supported by 'Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR' (2009-SGR-00971), Generalitat de Catalunya, Spain.

## References

- Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Olie JP, Charles-Nicolas A, *et al.* (2007). 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* **144B**:1034–1041.
- Bloch PJ, Nall AH, Weller AE, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, *et al.* (2009). Association analysis between polymorphisms in the dopamine D3 receptor (DRD3) gene and cocaine dependence. *Psychiatr Genet* **19**:275–276.
- Brookes KJ, Mill J, Guindalini C, Curran S, Xu X, Knight J, *et al.* (2006). A common haplotype of the dopamine transporter gene associated with attention-deficit/hyperactivity disorder and interacting with maternal use of alcohol during pregnancy. *Arch Gen Psychiatry* **63**:74–81.
- Comings DE, Blum K (2000). Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res* **126**:325–341.
- Comings DE, Gonzalez N, Wu S, Saucier G, Johnson P, Verde R, *et al.* (1999). Homozygosity at the dopamine DRD3 receptor gene in cocaine dependence. *Mol Psychiatry* **4**:484–487.
- Cubells JF, Kranzler HR, McCance-Katz E, Anderson GM, Malison RT, Price LH, *et al.* (2000). A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol Psychiatry* **5**:56–63.
- Franke B, Hoogman M, Arias Vasquez A, Heister JG, Savelkoul PJ, Naber M, *et al.* (2008). Association of the dopamine transporter (SLC6A3/DAT1) gene 9-6 haplotype with adult ADHD. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**:1576–1579.
- Freimer M, Kranzler H, Satel S, Lacobelle J, Skipsey K, Charney D, *et al.* (1996). No association between D3 dopamine receptor (DRD3) alleles and cocaine dependence. *Addict Biol* **1**:281–287.
- Gelernter J, Kranzler HR, Satel SL, Rao PA (1994). Genetic association between dopamine transporter protein alleles and cocaine-induced paranoia. *Neuropsychopharmacology* **11**:195–200.
- Gelernter J, Kranzler H, Satel SL (1999). No association between D2 dopamine receptor (DRD2) alleles or haplotypes and cocaine dependence or severity of cocaine dependence in European- and African-Americans. *Biol Psychiatry* **45**:340–345.
- Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N, *et al.* (2006). A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:4552–4557.
- Guindalini C, Laranjeira R, Collier D, Messas G, Vallada H, Breen G (2008). Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct* **4**:1.
- Kalayasiri R, Sughondhabiroom A, Gueorguieva R, Coric V, Lynch WJ, Lappalainen J, *et al.* (2007). Dopamine beta-hydroxylase gene (DbetaH) -1021C→T influences self-reported paranoia during cocaine self-administration. *Biol Psychiatry* **61**:1310–1313.
- Messas G, Meira-Lima I, Turchi M, Franco O, Guindalini C, Castelo A, *et al.* (2005). Association study of dopamine D2 and D3 receptor gene polymorphisms with cocaine dependence. *Psychiatr Genet* **15**:171–174.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**:1215.
- Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, Wood RC, *et al.* (1993). Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* **33**:271–285.
- Persico AM, Vandenbergh DJ, Smith SS, Uhl GR (1993). Dopamine transporter gene polymorphisms are not associated with polysubstance abuse. *Biol Psychiatry* **34**:265–267.
- Persico AM, Bird G, Gabbay FH, Uhl GR (1996). D2 dopamine receptor gene TaqI A1 and B1 restriction fragment length polymorphisms: enhanced frequencies in psychostimulant-preferring polysubstance abusers. *Biol Psychiatry* **40**:776–784.
- Qian QJ, Wang YF, Zhou RL, Yang L, Li J (2004). Association studies of G352A polymorphism of dopamine transporter gene in Han Chinese attention deficit hyperactivity disorder patients. *Beijing Da Xue Xue Bao* **36**:626–629.
- Schosser A, Fuchs K, Scharl T, Schloegelhofer M, Kindler J, Mossaheb N, *et al.* (2010). Interaction between serotonin 5-HT2A receptor gene and dopamine transporter (DAT1) gene polymorphisms influences personality trait of persistence in Austrian Caucasians. *World J Biol Psychiatry* **11**:417–424.
- Tan EK, Tan Y, Chai A, Tan C, Shen H, Lum SY, *et al.* (2003). Dopamine D2 receptor TaqIA and TaqIB polymorphisms in Parkinson's disease. *Mov Disord* **18**:593–595.
- Togsverd M, Werge TM, Tankó LB, Bagger YZ, Hansen T, Qin G, *et al.* (2008). Association of a dopamine beta-hydroxylase gene variant with depression in elderly women possibly reflecting noradrenergic dysfunction. *J Affect Disord* **106**:169–172.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Ding YS, Logan J, *et al.* (1996). Relationship between psychostimulant-induced high and dopamine transporter occupancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10388–10392.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (1999). Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J Psychopharmacol* **13**:337–345.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Goldstein RZ (2002). Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem* **78**:610–624.
- Yamamoto K, Cubells JF, Gelernter J, Benkelfat C, Lalonde P, Bloom D, *et al.* (2003). Dopamine beta-hydroxylase (DBH) gene and schizophrenia phenotypic variability: a genetic association study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **117**:33–38.





# Article 3

N. Fernàndez-Castillo, M. Ribasés, C. Roncero,  
M. Casas, B. Gonzalvo, B. Cormand.  
*Association study between the DAT1, DBH and DRD2  
genes and cocaine dependence in a Spanish sample.*  
Psychiatric Genetics 2010, 20:317–320  
Versió publicada



ORIGINAL INVESTIGATION

## Candidate pathway association study in cocaine dependence: The control of neurotransmitter release

NOÈLIA FERNÀNDEZ-CASTILLO<sup>1,2,3</sup>, BRU CORMAND<sup>1,2,3</sup>, CARLOS RONCERO<sup>4,5,6</sup>, CRISTINA SÁNCHEZ-MORA<sup>4,7</sup>, LARA GRAU-LOPEZ<sup>6</sup>, BEGOÑA GONZALVO<sup>6</sup>, LAIA MIQUEL<sup>6</sup>, ROSER COROMINAS<sup>1,2</sup>, JOSEP ANTONI RAMOS-QUIROGA<sup>4,5</sup>, MIQUEL CASAS<sup>4,5</sup> & MARTA RIBASÉS<sup>4,7</sup>

<sup>1</sup>Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Catalonia, Spain, <sup>2</sup>CIBER Enfermedades Raras, Barcelona, Catalonia, Spain, <sup>3</sup>Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Catalonia, Spain, <sup>4</sup>Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain, <sup>5</sup>Department of Psychiatry and Legal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Catalonia, Spain, <sup>6</sup>Outpatient Drug Clinic Vall Hebron. Psychiatry Services. Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain, and <sup>7</sup>Psychiatric Genetics Unit, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Catalonia, Spain

### Abstract

**Objectives.** Cocaine is the second most used illegal drug in Europe. The transition from use to dependence involves both genetic and environmental factors. Genetic variation in neurotransmitter systems is involved in the susceptibility to cocaine dependence. We examined the possible contribution to cocaine dependence of 15 genes involved in the cellular machinery that controls neurotransmitter release: genes encoding proteins of the SNARE complex (*STX1A*, *SNAP25*, *VAMP1* and *VAMP2*), fusion control elements (*SYT*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2*, *CPLX3* and *CPLX4*) and regulatory elements (*STXBPI*, *SYT*, *SNPH*, *NSF*, and *RAB3A*). **Methods.** We genotyped 121 SNPs, selected according to genetic coverage criteria, in 360 cocaine-dependent patients and 360 controls from Spain. **Results.** Single and multiple-marker analyses revealed a strong association between cocaine dependence and the *NSF* gene, encoding the *N*-ethylmaleimide-sensitive factor ( $P = 5.1 \times 10^{-4}$ , OR = 2.44 (1.45–4.00) and  $P = 0.001$ , OR = 1.82 (1.28–2.59), respectively). The presence and absence of psychotic symptoms were also studied. Interestingly, when we considered the time between initial consumption and the onset of cocaine dependence, we observed that the association was mainly restricted to the group of patients that rapidly developed drug dependence ( $\leq 2$  years;  $P = 2.98 \times 10^{-6}$ , OR = 1.33 (1.20–1.47)). **Conclusions.** Our data show preliminary evidence that *NSF* may predispose not only to cocaine dependence, but also to an early onset of the dependence.

**Key words:** Cocaine dependence, NSF, SNARE complex, case-control association study, synaptic exocytosis

### Introduction

Cocaine is the second most used illegal drug in Europe, with around 13 million consumers (3.9% of adult Europeans) (EMCDDA Annual Report 2009; European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction). Cocaine is a powerful addictive drug with almost 16% of cocaine users developing cocaine dependence within 10 years after the first cocaine use (Wagner and Anthony 2002), and 5–6% within the first 2 years (O'Brien and Anthony 2005). The transition from use to dependence is not a fixed pharmacological property of cocaine, since both

environmental and genetic factors influence cocaine dependence. Heritability studies have estimated that 60–70% of an individual's risk for developing cocaine dependence is due to genetic factors (Kendler and Prescott 1998; Tsuang et al. 1998; Kendler et al. 2000), although the underlying genetic susceptibility factors are poorly understood.

Cocaine binds to the dopamine, serotonin and norepinephrine transporters (DAT1, SERT and NET, respectively), inhibiting the reuptake of these neurotransmitters and increasing their levels at the neuronal synapses (Kuhar et al. 1991; Kalivas 2007).

Correspondence: Marta Ribasés, Department of Psychiatry, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119–129, 08003 Barcelona, Catalonia, Spain. Tel: +34 93 2746734. Fax: +34 93 4894587. E-mail: mribases@ir.vhebron.net

(Received 29 July 2010; accepted 16 December 2010)

ISSN 1562-2975 print/ISSN 1814-1412 online © 2011 Informa Healthcare  
DOI: 10.3109/15622975.2010.551406

2 *N. Fernández-Castillo et al.*

Interestingly, the dopamine (DA) neurotransmission and the indirect activation of DA receptors have been established as central mediators of cocaine response (Woolverton and Johnson 1992; Volkow et al. 1996, 1999, 2002). Other neurotransmitters such as serotonin or glutamate also play an important role in cocaine effects (Spealman 1993; Walsh and Cunningham 1997; Filip 2005; Filip et al. 2001, 2004). Thus, cocaine indirectly influences glutamate transmission in the limbic system producing persistent changes in neuronal function that alter the behavioral effects of cocaine (Gass and Olive 2008; Kalivas and O'Brien 2008; Thomas et al. 2008; Uys and LaLumiere 2008).

In addition, animal models and also pharmacological and association studies support an essential role of these neurotransmitter systems in cocaine dependence. The rewarding effects of cocaine were abolished in homozygous *DAT1(-/-)SERT(-/-)* and heterozygous *DAT1(-/-)SERT(+/-)* double knock-out mice (Sora et al. 2001; Hall et al. 2002, 2004; Uhl et al. 2002). Interestingly, *NET(-/-)*, *SERT(-/-)* and *NET(-/-)/SERT(-/-)* knock-outs showed an even increased rewarding cocaine effect (Sora et al. 1998; Xu et al. 2000; Hall et al. 2002). Other knock-out studies also revealed an important role of the endocannabinoid system in cocaine self-administration and in the consolidation of the psychostimulant addictive process (Soria et al. 2005).

Pharmacological studies also provide insights into the role of neurotransmitter systems in cocaine dependence. Dopamine receptor D3 antagonists block cocaine acquisition and place preference and reduce cocaine induced reinstatement of self-administration (Vorel et al. 2002; Di Ciano et al. 2003). Glutamate agonists reduce the euphoric effects of cocaine and withdrawal symptoms (Dackis and O'Brien 2003; Dackis et al. 2003; Malcolm et al. 2006; Hart et al. 2008). Cannabinoid receptor agonists attenuate relapse induced by environmental cocaine-associated cues or cocaine re-exposure and antagonists induce relapse to cocaine seeking after a prolonged withdrawal period (DeVries et al. 2001; DeVries and Schoffelmeer 2005). In addition some promising medications that may prevent cocaine relapse (such as gamma-vinyl GABA "GVG", tiagabine and topiramate) are related to GABA neurotransmission (Dewey et al. 1997; Morgan and Dewey 1998; Cornish and Kalivas 2000; Gonzalez et al. 2003).

Finally, positive associations have been described between cocaine dependence and polymorphisms in genes of the dopaminergic (Noble et al. 1993; Comings et al. 1999; Ballon et al. 2007; Guindalini et al. 2006; Fernández-Castillo et al. 2010), serotonergic (Patkar et al. 2001; Mannelli et al. 2005), noradrenergic (Cubells et al. 2000; Guindalini et al. 2008),

endocannabinoid (Ballon et al. 2006; Zuo et al. 2009) and cholinergic neurotransmitter systems (Gruca et al. 2008).

All these neurotransmitter systems are candidates for being involved in cocaine dependence and depend on mechanisms that control neurotransmitter release at the synapse, including synaptic vesicle docking, fusion and recycling. The process is complex and involves different proteins such as the *N*-ethylmaleimide sensitive factor (NSF), the soluble NSF attachment proteins (SNAPs), the SNAP receptors (SNAREs), synaptobrevins (VAMP1, VAMP2), syntaxin-1 and SNAP-25, the SM protein Munc18-1 (STXBP) and small GTPases from the RAB3 family (Rizo and Rosenmund 2008). Interestingly, cocaine induces expression changes of some genes encoding proteins involved in this neurotransmitter release machinery, such as synaptotagmin, synaptobrevin (VAMP1), syntaxin-1, synaptophysin and RAB3A (Freeman et al. 2002; Yuferov et al. 2003; Ahmed et al. 2005).

Based on previous data that link different neurotransmission systems with cocaine dependence, we hypothesized that alterations in the neurotransmitter release machinery may be involved in the genetic susceptibility to this disorder, as well as cocaine induced psychotic symptoms and time between initial consumption and the onset of cocaine dependence. We performed a case-control association study in 360 cocaine-dependent patients and 360 sex-matched controls, with SNPs covering 16 candidate genes that encode proteins of the neurotransmitter release machinery: SNARE complex formed by syntaxin 1A, SNAP-25 and synaptobrevins (*STX1A*, *SNAP25*, *VAMP1* and *VAMP2*), the fusion control elements synaptotagmins and complexins (*SYT*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2*, *CPLX3* and *CPLX4*) and the regulatory elements Munc18.1 (*STXBPI*), synaptophysin (*SYP*), syntaphilin (*SNPH*), NSF,  $\alpha$ SNARE (*NAPA*) and *RAB3A*.

## Methods and materials

### Subjects

The patient sample consisted of 360 cocaine dependent patients (mean age  $34.6 \pm 7.6$  years and 83% males ( $n = 299$ )) 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) (First et al. 1997) was administered and volunteers with current DSM-IV diagnosis of cocaine dependence were included in the study. Other drug dependences were assessed in 334 patients (92.8%): alcohol dependence was present in 22.7% of the patients ( $n = 76$ ), cannabis

dependence in 26% ( $n = 87$ ), opiate dependence in 13.8% ( $n = 46$ ), benzodiazepine dependence in 5.1% ( $n = 17$ ), and amphetamine or methamphetamine dependence in 2.1% ( $n = 7$ ). Seventy-six percent of the patients were evaluated for the presence ( $n = 149$ ) or absence ( $n = 124$ ) of psychotic symptoms, and 71.4% ( $n = 257$ ) reported age at the initial consumption as well as age at dependence onset. Three hundred and sixty sex-matched unrelated controls (mean age  $54.9 \pm 16.6$  years) were recruited at the Blood and Tissues Bank of the Hospital Universitari Vall d'Hebron. None of them had injected drugs intravenously. Both patients and controls were Spanish and Caucasian. The study was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitari Vall d'Hebron, and written informed consent was obtained from all the participating individuals.

#### DNA isolation and quantification

Genomic DNA samples were obtained either from peripheral blood lymphocytes by the salting-out procedure (Miller et al. 1988) or from saliva using the Oragene DNA Self-Collection Kit (DNA Genotek, Kanata, Ontario, Canada). The double-stranded concentrations of all samples were determined on a Gemini XPS fluorometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) using the PicoGreen dsDNA Quantitation Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), following the manufacturer's instructions.

#### Gene and SNP selection

Sixteen candidate genes involved in the synaptic vesicle fusion and neurotransmitter release at the synapse were selected for this study: *STX1A*, *SNAP25*, *VAMP1*, *VAMP2* (SNARE complex), *SYT1*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2*, *CPLX3* and *CPLX4* (synaptotagmins and complexins) and *STXBPI*, *SYP*, *SNPH*, *NSF*, *NAPA* and *RAB3A* (regulatory elements). SNP selection was based on genetic coverage parameters in terms of linkage disequilibrium (LD). Genotyping data of CEU population for each candidate gene plus 5-kb flanking sequences upstream and downstream were downloaded from the HapMap database (HapMap data release 22/phase II Apr07, dbSNPb126) (Thorisson et al. 2005). To minimize redundancy, LD was evaluated using the Haploview software (Barrett et al., 2005) setting a maximum  $r^2$  threshold at 0.85 for all SNPs with minor allele frequency (MAF) of 0.15 or 0.25 for those genes with more than 20 tagSNPs (*SNAP25*, *SYT2*, *CPLX2*, *SNPH*). A total of 141 tagSNP (72 in multi-loci bins and 69 singletons) were selected with these criteria. Three additional SNPs were included: rs2293485 in exon 3

of *STX1A*, rs1968583 in exon 2 of *SYT2* (both exonic and synonymous) and rs2293945 in intron 6 of *SYP* (previously studied in ADHD (Brookes et al. 2005)).

#### Plex design, genotyping and quality control

From the initial selection of 145 SNPs, a VeraCode assay of 141 SNPs was designed (four SNPs did not pass the pipeline). SNPs were genotyped using the Illumina BeadXpress platform and the GoldenGate Genotyping Assay (Illumina, San Diego, CA, USA). This technology is based on allele-specific primer extension and highly multiplexed PCR with universal primers. Raw hybridization intensity data processing, clustering and genotype calling were performed using the genotyping module in the Illumina GenomeStudio package. The genotype cluster plots generated by GenomeStudio were visually inspected for quality of calls and edited when necessary. A total of 21 HapMap individuals including 7 trios were genotyped and used to help in the clustering and as a control of the genotyping process.

#### Statistical analysis

The minimal statistical power was estimated *post hoc* using the Genetic Power Calculator software (<http://pnu.gmgh.harvard.edu/~purcell/gpc/cc2.html>), assuming an odds ratio (OR) of 1.5, prevalence of 0.0062 (16% developing dependence of 3.9% consumers), significance level of 0.05 and the lowest MAF value of 0.126. The analysis of Hardy-Weinberg equilibrium (threshold set at  $P < 0.01$ ) and the comparison of genotype frequencies between cases and controls was performed using the SNPAssoc R package (Gonzalez et al. 2007). Only when a SNP displayed nominal association under a codominant model, the dominant (11 vs. 12+22) and recessive (11+12 vs. 22) were considered. Genotype frequencies of SNPs within the genes located on chromosome X (*SYP*) were only considered in the female sample. For the multiple testing correction we used the Q-value R package (Storey 2002), considering all the tests performed and assuming a false discovery rate (FDR) of 10%, which corresponded to a significance threshold of  $P \leq 0.00051$ . Additionally, we also corrected the significant  $P$  values that overcame the 10% FDR threshold by performing a permutation test using 10,000 permutations with the PLINK software (Purcell 2007). Significant  $P$  values after multiple testing corrections were adjusted for age. The haplotype-based association study was restricted to the single gene that was found associated with cocaine dependence in the single-marker analysis

after correction for multiple comparisons. The best two-marker haplotype from all possible combinations was identified in the whole sample and additional markers (up to four) were added to the initial two-SNP haplotype in a stepwise manner. Significance was estimated by a permutation procedure using 10,000 permutations with the UNPHASED software (Dudbridge 2003). Haplotypes with frequencies  $<0.05$  were excluded. Specific estimated haplotypes were assigned to individuals with the PHASE 2.0 software (Stephens et al. 2001). The comparison of the risk haplotype carriers in cases and controls as well as the effect of this risk haplotype in the presence of cocaine-induced psychotic symptoms, age at initial consumption and the time between initial and regular consumption were evaluated using the statistical package SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For the age at the first consumption and the lapse between initial consumption and the onset of cocaine dependence, normality was rejected using a Kolmogorov–Smirnov test and the comparison of medians was performed using the non-parametric Mann–Whitney *U*-test. Additionally, time between initial consumption and onset of cocaine dependence was dichotomized into early ( $\leq 2$  years) or late ( $> 2$  years) dependence onset and the comparison of the risk haplotype carriers between the two groups was performed with two-tailed Fisher's exact test. In the multiple-marker analysis *P* values were also adjusted for age and, considering cocaine dependence as well as related phenotypes, the significance threshold was set at  $2P < 0.01$  after the multiple testing correction of Bonferroni considering five comparisons (cocaine dependence, presence or absence of psychotic symptoms, and early or late dependence versus controls).

## Results

We examined tagSNPs in 16 candidate genes encoding proteins of the neurotransmitter release machinery in 360 cocaine dependent patients and 360 controls. Of the 145 SNPs initially selected, 23 were discarded (four did not pass the Veracode pipeline design, 19 had genotype calls  $<90\%$  and one had a significant departure from Hardy–Weinberg equilibrium in the control group). A total of 121 SNPs within 15 genes (the two SNPs of the *NAPA* gene failed) with an average call rate of 99.2% ( $SD = 1.8$ ) were considered for the analysis (Table SI). The minimal statistical power, considering the SNP with the lowest MAF (0.126), was 57.9% assuming a codominant model, 68.3% considering a dominant model and 8.4% under a recessive model of inheritance.

The comparison of genotype frequencies between cocaine dependent patients and controls allowed identification of nominal differences for eight SNPs located in six genes: *NSF*, *SYT1*, *SYT2*, *CPLX1*, *CPLX2* and *CPLX4* (Table I, Table SII). However, after correcting for multiple comparisons applying a FDR of 10% ( $P \leq 0.00051$ ), only rs183211 in the *NSF* gene ( $P = 5.1e-04$ , OR = 2.44 (1.45–4.00)) remained associated with cocaine dependence, with a higher frequency of carriers of the common G allele in cases (93.6%) than in the control group (85.9%). Consistently, the G allele is present in 71.5% of cases and in 65.7% of controls. The rs183211 SNP in *NSF* remained significantly associated with cocaine dependence after adjusting for age and correcting by permutation (Table I).

The analysis of all the possible SNP combinations within *NSF* revealed a two-marker haplotype (rs183211–rs1769817), that includes the SNP identified in the single-marker analysis, associated with cocaine dependence (global  $P = 0.031$ ; Figure 1), which remained significant after correcting by permutation ( $P$ -adjusted = 0.039). The evaluation of the contribution of individual haplotypes to the phenotype showed an over-representation of the G-T allelic combination ( $P = 0.013$ , OR = 1.3 (1.06–1.60)) and an under-representation of the A-T haplotype ( $P = 0.017$ , OR = 1.3 (1.05–1.64)) in the cocaine dependence sample (Table IIb). Consistently, we also identified an increased frequency of individuals carrying the G-T risk haplotype in this clinical sample, result that remained significant after adjusting by age ( $P$ -adjusted = 0.001, OR = 2.16 (1.38–3.83; Table III).

When patients were subdivided based on the presence/absence of psychotic symptoms, we did not identify differences between these two subgroups ( $P = 0.627$ ) and observed an over-representation of G-T carriers in the two clinical samples when they were compared to the control sample (patients with psychotic symptoms:  $P$ -adjusted = 0.002, OR = 2.51 (1.4–4.5); patients without psychotic symptoms:  $P$ -adjusted = 0.0055, OR = 2.3 (1.28–4.14); Table III), and remained significant after the Bonferroni correction (Table III).

We then focused on the time between first consumption and onset of cocaine dependence and observed an earlier dependence onset among carriers of the G-T *NSF* risk haplotype than in non-carriers ( $Z = -3.15$ ,  $P = 0.0015$ ). Interestingly, the main differences were clearly observed in the group of patients whose dependence onset started within two years after the initial drug use (Figure 2). When patients were subdivided in two subgroups, early ( $\leq 2$  years) and late ( $> 2$  years) dependence onset, we identified a higher frequency of carriers of the

Table I. Single-marker analysis: nominal associations identified in 360 cocaine dependent patients and 360 controls.

Gene	SNP	Cases N (%)						Controls N (%)						Genotypes			
		11		12		22		11		12		22		Genotype 11 vs. 12+22		Genotype 22 vs. 11+12	
		Sum	11	12	22	Sum	11	12	22	Sum	11	12	22	Sum	P	OR (95% CI)	P
NSF	rs183211*	178 (49.4)	159 (44.2)	23 (6.4)	360	164 (45.6)	145 (40.3)	51 (14.2)	360	2.4e-03	—	NS	2.44 (1.45-4)	5.1 e-04*			
SYT71	rs10861941	145 (42.9)	160 (47.3)	33 (9.8)	338	105 (32.9)	171 (53.6)	43 (13.5)	319	0.023	1.54 (1.11-2.08)	8.3e-03	—	NS			
SYT2	rs10800855	162 (45.0)	141 (39.2)	57 (15.8)	360	124 (34.6)	175 (48.9)	59 (16.5)	358	0.012	1.54 (1.14-2.08)	4.5e-03	—	NS			
	rs4400672	167 (46.4)	147 (40.8)	46 (12.8)	360	161 (45.0)	169 (47.2)	28 (7.8)	358	0.048	—	NS	1.73 (1.05-2.83)*	0.028			
CPLX1	rs11722977	133 (38.0)	181 (51.7)	36 (10.3)	350	163 (48.8)	133 (39.8)	38 (11.4)	334	6.4e-03	1.56 (1.15-2.11)*	4.3e-03	—	NS			
CPLX2	rs4868539	133 (36.9)	182 (50.6)	45 (12.5)	360	140 (38.9)	153 (42.5)	67 (18.6)	360	0.029	—	NS	1.61 (1.06-2.44)	0.023			
CPLX4	rs1914321	279 (77.9)	78 (21.8)	1 (0.3)	358	271 (77.0)	72 (20.5)	9 (2.6)	352	0.022	—	NS	9.09 (1.17-100)*	5.9e-03			
	rs640401	245 (68.1)	107 (29.7)	8 (2.2)	360	233 (64.7)	106 (29.4)	21 (5.8)	360	0.042	—	NS	2.7 (1.19-6.25)	0.012			

NS, not significant.

\*When odds ratio <1, the inverted score is shown.

\*Statistically significant P value after applying a false discovery rate of 10% (P < 0.00051), P value adjusted for age = 7 e-04, P value corrected by a permutation test = 0.00224).

Table II. (a) Haplotype analysis of four NSF SNPs in a clinical sample of 360 cocaine-dependent patients and 360 controls using the UNPHASED software; (b) haplotype distributions of the rsrs183211 and rs17698176 NSF SNPs.

(a)			
NSF			
Marker* haplotype	Global P value	Best haplotype- specific (Adjusted P-value)	Haplotype-specific OR
14	0.031	0.013 (0.039)	1.3 (1.06-1.60)
(b)			
Marker* haplotype	Cases	Controls	Haplotype specific P value; OR (CI)
14			
A T	205 (28.5)	247 (34.3)	0.017; 1.3 (1.05-1.64)**
G G	111 (15.4)	116 (16.1)	NS
G T	404 (56.1)	357 (49.6)	0.013; 1.3 (1.061.60)

NS, not significant.

\*1-rs183211; 4-rs17698176.

\*\*Inverted odds ratio score is shown.

G-T haplotype in the group of patients showing an early regular cocaine consumption (P = 2.2e-04, OR = 1.85 (1.4-2.4)). These differences were also observed when this group of patients, but not those showing late regular drug consumption, was compared with controls (P-adjusted = 5.77 e-05, OR = 3.90 (2.01-7.57); Table III), and was still significant after the Bonferroni correction. No significant differences were observed when we compared the average age at the first cocaine consumption

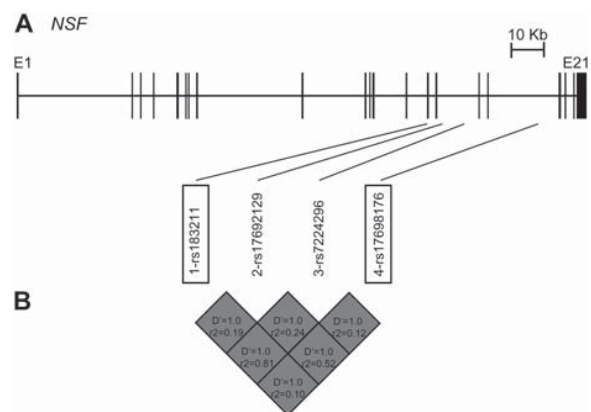


Figure 1. (A) Diagram of the NSF gene (NM\_006178). Black boxes indicate exons. The four tag SNPs included in the study are shown on top, with the two SNPs that conform the risk haplotype associated with cocaine dependence boxed. (B) Linkage disequilibrium plot of the four SNPs analyzed in the NSF gene, according to Haploview. Considering the Confidence Interval algorithm (Gabriel et al. 2002), the four SNPs are located in the same LD block in our control sample.

6 N. Fernández-Castillo et al.

Table III. Distribution of carriers of the G-T (rs183211–rs1769817) allelic combination within the *NSF* gene.

	Haplotypes, n (%)		Adjusted for age			
	G-T carriers	Other haplotypes	OR (95%CI)	P	OR (95%CI)	P
Cocaine dependence	295 (81.9)	65 (18.1)	1.82 (1.28–2.59)	<b>0.001</b>	2.16 (1.38–3.83)	<b>0.001</b>
Cocaine dependence with psychotic symptoms	126 (84.6)	23 (15.4)	2.20 (1.33–3.62)	<b>0.0015</b>	2.51 (1.40–4.50)	<b>0.002</b>
Cocaine dependence without psychotic symptoms	102 (82.3)	22 (17.7)	1.86 (1.11–3.11)	0.017	2.30 (1.28–4.14)	<b>0.0055</b>
Early cocaine dependence (≤2 years*)	134 (89.9)	15 (10.1)	3.58 (2.00–6.41)	<b>2.98 e-06</b>	3.90 (2.01–7.57)	<b>5.77 e-05</b>
Late cocaine dependence (>2 years*)	77 (71.3)	31 (28.7)	–	NS	–	NS
Controls	257 (71.4)	103 (28.6)				

NS, not significant.

In bold, significant *P* values after Bonferroni correction (*P* < 0.01).

\*Time between initial consumption and dependence onset.

between carriers and non-carriers of the G-T haplotype (*P*-adjusted = 0.372). Interestingly, the individual analysis of rs183221, the only SNP displaying positive signals in the single-marker analysis, also showed association with cocaine dependence when those cases with early dependence were considered (*P*-adjusted = 6.9 e-04, OR = 2.42 (1.45–4.04)).

**Discussion**

The present case–control association study aims at covering an entire candidate pathway or functional network rather than focusing on single candidate genes. To our knowledge, this is the first association study in cocaine dependence focused on genes coding for the main components of the neurotransmitter release machinery and have found a

significant association with *NSF*, mainly in the group of patients that rapidly develop drug dependence (≤2 years from the initial cocaine consumption). These results suggest that genetic factors may contribute to the neurobiological mechanisms underlying not only cocaine dependence but also an early development of this dependence. No relationship was observed between *NSF* and age at the first cocaine use or the presence of cocaine-induced psychotic symptoms.

The *NSF* gene encodes the *N*-ethylmaleimide sensitive factor, which participates in the SNARE complex recycling, ensuring that sufficient amounts of free SNAREs are available for the maintenance of intracellular membrane trafficking (Barszczewski et al. 2008). *NSF* is essential for the synaptic vesicle turnover as it modulates the kinetics of neurotransmitters release and the integrative properties of synapses (Schweizer et al. 1998; Littleton et al. 2001;

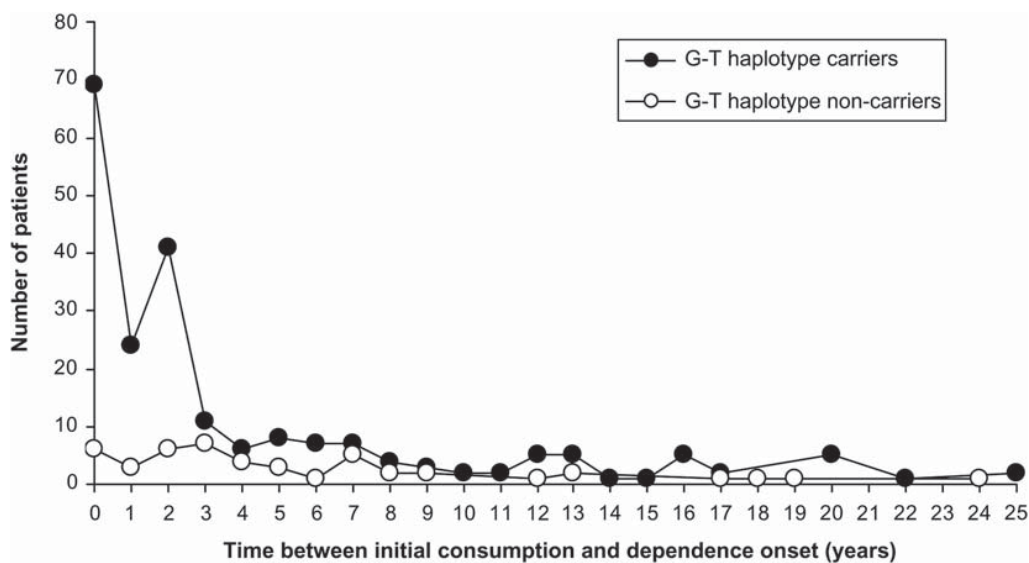


Figure 2. Time between initial consumption and cocaine dependence onset (years) in carriers and non-carriers of the *NSF* G-T (rs183211–rs1769817) risk haplotype in cocaine-dependent patients.

Malsam et al. 2008). It also has an essential role in the modulation of the trafficking between the plasma membrane and endosomes and in the binding of several cell-surface signalling receptors, such as the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor (AMPA), the beta-2 adrenergic receptor ( $\beta_2$ -AR), the DA receptors (more strongly D1 and D5), the adrenomedulin (AM) receptor and the  $\gamma$ -amino-butyric acid (GABA) receptor (Nishimune et al. 1998; Osten et al. 1998; Song et al. 1998; Cong et al. 2001; Heydorn et al. 2004; Bomberger et al. 2005; Pontier et al. 2006).

Altered NSF function may modulate the activity of the neurotransmitter systems involved in cocaine's effect and dependence. Thus, in agreement with the "reward deficiency syndrome", hypothesis that postulates that hypodopaminergic activity predisposes to cocaine addiction (Comings and Blum 2000), malfunction of NSF could have an effect on the turnover and availability of DA vesicles, altering the DA release to the synaptic cleft.

Some methodological considerations, however, should be taken into account in the present case—control association study: (i) in order to avoid sample heterogeneity that may bias the results in association studies, our sample consisted of patients and controls recruited in the same geographical area around Barcelona (Spain), all of them were Spanish, Caucasian and sex-matched; (ii) although significant after 10% FDR corrections for multiple testing, *NSF* did not remain associated with cocaine addiction under the most restrictive Bonferroni correction, considering 121 SNPs; (iii) the *NSF* risk haplotype associated with cocaine dependence consists of two SNPs located within introns, so it is possible that they do not cause functional effects by themselves, but rather are in LD with other sequence variants directly involved in the genetic susceptibility to cocaine dependence; (iv) the modest sample size (360 patients versus 360 controls) may have prevented from detecting subtle phenotypic effects; (v) cocaine dependence could not be discarded in the control sample, which may potentially dilute positive findings in the association study; and (vi) although the SNP selection was designed to cover 16 genes, gaps still exist in eight genes due to experimental constraints. Specifically, *NAPA* could not be tested for association as the two tagSNPs covering this gene failed in the genotyping assay.

To sum up, our study suggests that *NSF* contributes to the genetic susceptibility to cocaine dependence and, more specifically, to an early development of dependence. These results, however, need to be replicated in other samples. Also, further genetic and functional studies of the *NSF* gene are necessary to

identify those functional variants directly involved in this psychiatric disorder.

### Acknowledgements

We are grateful to patients and controls for their participation in the study, and to M. Dolors Castellar and others from the "Banc de Sang i Teixits" (Hospital Vall d'Hebron, Barcelona) and to Rebeca Ortega, Nuria Voltes, Carolina López, Oriol Esteve and Esther García, for their collaboration in the recruitment of samples. This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III-FIS (PI051982), the "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca-AGAUR" (2009GR00971) and the Department of Health of the Government of Catalonia (Generalitat de Catalunya). MR and NF-C are recipients of a "Miguel de Servet contract" from the Instituto de Salud Carlos III and a "Ajut Personal Investigador en Formació" from the Universitat de Barcelona, respectively. RC was supported by a fellowship of the Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER). SNP genotyping services were provided by the Barcelona node of the Spanish National Genotyping Center (CEGEN; www.cegen.org).

### Statement of Interest

None to declare.

### References

- Ahmed SH, Lutjens R, van der Stap LD, Lekic D, Romano-Spica V, Morales M, et al. 2005. Gene expression evidence for remodeling of lateral hypothalamic circuitry in cocaine addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(32):11533–11538.
- Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Charles-Nicolas A, Krebs MO, et al. 2006. (AAT)<sub>n</sub> repeat in the cannabinoid receptor gene (CNR1): association with cocaine addiction in an African-Caribbean population. *Pharmacogenomics J* 6(2):126–130.
- Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Olie JP, Charles-Nicolas A, et al. 2007. 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* 144B(8):1034–1041.
- Barszczewski M, Chua JJ, Stein A, Winter U, Heintzmann R, Zilly FE, et al. 2008. A novel site of action for alpha-SNAP in the SNARE conformational cycle controlling membrane fusion. *Mol Biol Cell* 19(3):776–784.
- Bomberger JM, Parameswaran N, Hall CS, Aiyar N, Spielman WS. 2005. Novel function for receptor activity-modifying proteins (RAMPs) in post-endocytic receptor trafficking. *J Biol Chem* 280(10):9297–9307.
- Brookes KJ, Knight J, Xu X, Asherson P. 2005. DNA pooling analysis of ADHD and genes regulating vesicle release of neurotransmitters. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139B(1):33–37.



- Comings DE, Blum K. 2000. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders. *Prog Brain Res* 126:325–341.
- Comings DE, Gonzalez N, Wu S, Saucier G, Johnson P, Verde R, et al. 1999. Homozygosity at the dopamine DRD3 receptor gene in cocaine dependence. *Mol Psychiatry* 4(5):484–487.
- Cong M, Perry SJ, Hu LA, Hanson PI, Claing A, Lefkowitz RJ. 2001. Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J Biol Chem* 276(48):45145–45152.
- Cornish JL, Kalivas PW. 2000. Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci* 20(15):RC89.
- Cubells JF, Kranzler HR, McCance-Katz E, Anderson GM, Malison RT, Price LH, et al. 2000. A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia. *Mol Psychiatry* 5(1):56–63.
- Dackis C, O'Brien C. 2003. Glutamatergic agents for cocaine dependence. *Ann NY Acad Sci* 1003:328–345.
- Dackis CA, Lynch KG, Yu E, Samaha FF, Kampman KM, Cornish JW, et al. 2003. Modafinil and cocaine: a double-blind, placebo-controlled drug interaction study. *Drug Alcohol Depend* 70(1):29–37.
- De Vries TJ, Schoffelmeier AN. 2005. Cannabinoid CB1 receptors control conditioned drug seeking. *Trends Pharmacol Sci* 26(8):420–426.
- De Vries TJ, Shaham Y, Homberg JR, Crombag H, Schuurman K, Dieben J, et al. 2001. A cannabinoid mechanism in relapse to cocaine seeking. *Nat Med* 7(10):1151–1154.
- Dewey SL, Chaurasia CS, Chen CE, Volkow ND, Clarkson FA, Porter SP, et al. 1997. GABAergic attenuation of cocaine-induced dopamine release and locomotor activity. *Synapse* 25(4):393–398.
- Di Ciano P, Underwood RJ, Hagan JJ, Everitt BJ. 2003. Attenuation of cue-controlled cocaine-seeking by a selective D3 dopamine receptor antagonist SB-277011-A. *Neuropsychopharmacology* 28(2):329–338.
- Dudbridge F. 2003. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25(2):115–121.
- Fernández-Castillo N, Ribasés M, Roncero C, Casas M, Gonzalvo B, Cormand B. 2010. Association study between the DAT1, DBH and DRD2 genes and cocaine dependence in a Spanish sample. *Psychiatr Genet*. E pub ahead of print. DOI: 10.1097/YPG.0b013e32833b6320.
- Filip M. 2005. Role of serotonin (5-HT)<sub>2</sub> receptors in cocaine self-administration and seeking behavior in rats. *Pharmacol Rep* 57(1):35–46.
- Filip M, Nowak E, Papla I. 2001. On the role of serotonin 2A/2C receptors in the sensitization to cocaine. *J Physiol Pharmacol* 52(3):471–481.
- Filip M, Bubar MJ, Cunningham KA. 2004. Contribution of serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) 5-HT<sub>2</sub> receptor subtypes to the hyperlocomotor effects of cocaine: acute and chronic pharmacological analyses. *J Pharmacol Exp Ther* 310(3):1246–1254.
- First MB, Spitzer RL, Gibbon M, Williams JBW (1997). *Structured Clinical Interview for DSM-IV disorders (SCID-IV)*. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Freeman WM, Brebner K, Patel KM, Lynch WJ, Roberts DC, Vrana KE. 2002. Repeated cocaine self-administration causes multiple changes in rat frontal cortex gene expression. *Neurochem Res* 27(10):1181–1192.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296(5576):2225–2229.
- Gass JT, Olive MF. 2008. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 75(1):218–265.
- Gonzalez G, Sevarino K, Sofuoglu M, Poling J, Oliveto A, Gonsai K, et al. 2003. Tiagabine increases cocaine-free urines in cocaine-dependent methadone-treated patients: results of a randomized pilot study. *Addiction* 98(11):1625–1632.
- Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X, et al. 2007. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23(5):644–645.
- Gruza RA, Wang JC, Stitzel JA, Hinrichs AL, Saccone SF, Saccone NL, et al. 2008. A risk allele for nicotine dependence in *CHRNA5* is a protective allele for cocaine dependence. *Biol Psychiatry* 64(11):922–929.
- Guindalini C, Howard M, Haddley K, Laranjeira R, Collier D, Ammar N, et al. 2006. A dopamine transporter gene functional variant associated with cocaine abuse in a Brazilian sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(12):4552–4557.
- Guindalini C, Laranjeira R, Collier D, Messas G, Vallada H, Breen G. 2008. Dopamine-beta hydroxylase polymorphism and cocaine addiction. *Behav Brain Funct* 4:1.
- Hall FS, Li XF, Sora I, Xu F, Caron M, Lesch KP, et al. 2002. Cocaine mechanisms: enhanced cocaine, fluoxetine and nisoxetine place preferences following monoamine transporter deletions. *Neuroscience* 115(1):153–161.
- Hall FS, Sora I, Drgonova J, Li XF, Goeb M, Uhl GR. 2004. Molecular mechanisms underlying the rewarding effects of cocaine. *Ann NY Acad Sci* 1025:47–56.
- Hart CL, Haney M, Vosburg SK, Rubin E, Foltin RW. 2008. Smoked cocaine self-administration is decreased by modafinil. *Neuropsychopharmacology* 33(4):761–768.
- Heydorn A, Sondergaard BP, Hadrup N, Holst B, Haft CR, Schwartz TW. 2004. Distinct in vitro interaction pattern of dopamine receptor subtypes with adaptor proteins involved in post-endocytotic receptor targeting. *FEBS Lett* 556(1–3):276–280.
- Kalivas PW. 2007. Neurobiology of cocaine addiction: implications for new pharmacotherapy. *Am J Addict* 16(2):71–78.
- Kalivas PW, O'Brien C. 2008. Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology* 33(1):166–180.
- Kendler KS, Prescott CA. 1998. Cocaine use, abuse and dependence in a population-based sample of female twins. *Br J Psychiatry* 173:345–350.
- Kendler KS, Karkowski LM, Neale MC, Prescott CA. 2000. Illicit psychoactive substance use, heavy use, abuse, and dependence in a US population-based sample of male twins. *Arch Gen Psychiatry* 57(3):261–269.
- Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW. 1991. The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* 14(7):299–302.
- Littleton JT, Barnard RJ, Titus SA, Slind J, Chapman ER, Ganetzky B. 2001. SNARE-complex disassembly by NSF follows synaptic-vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(21):12233–12238.
- Malcolm R, Swayngim K, Donovan JL, DeVane CL, Elkashef A, Chiang N, et al. 2006. Modafinil and cocaine interactions. *Am J Drug Alcohol Abuse* 32(4):577–587.
- Malsam J, Kreye S, Sollner TH. 2008. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65(18):2814–2832.
- Mannelli P, Patkar AA, Murray HW, Certa K, Peindl K, Mattila-Evenden M, et al. 2005. Polymorphism in the serotonin transporter gene and response to treatment in African American cocaine and alcohol-abusing individuals. *Addict Biol* 10(3):261–268.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):1215.
- Morgan AE, Dewey SL. 1998. Effects of pharmacologic increases in brain GABA levels on cocaine-induced changes in extracellular dopamine. *Synapse* 28(1):60–65.

- Nishimune A, Isaac JT, Molnar E, Noel J, Nash SR, Tagaya M, et al. 1998. NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21(1):87–97.
- Noble EP, Blum K, Khalsa ME, Ritchie T, Montgomery A, Wood RC, et al. 1993. Allelic association of the D2 dopamine receptor gene with cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* 33(3):271–285.
- O'Brien MS, Anthony JC. 2005. Risk of becoming cocaine dependent: epidemiological estimates for the United States, 2000–2001. *Neuropsychopharmacology* 30(5):1006–1018.
- Osten P, Srivastava S, Inman GJ, Vilim FS, Khatri L, Lee LM, et al. 1998. The AMPA receptor GluR2 C terminus can mediate a reversible, ATP-dependent interaction with NSF and alpha- and beta-SNAPs. *Neuron* 21(1):99–110.
- Patkar AA, Berrettini WH, Hoehle M, Hill KP, Sterling RC, Gotthel E, et al. 2001. Serotonin transporter (5-HTT) gene polymorphisms and susceptibility to cocaine dependence among African-American individuals. *Addict Biol* 6(4):337–345.
- Pontier SM, Lahaie N, Ginham R, St-Gelais F, Bonin H, Bell DJ, et al. 2006. Coordinated action of NSF and PKC regulates GABAB receptor signaling efficacy. *Embo J* 25(12):2698–2709.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira M, Bender D, et al. 2007. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Am J Hum Genet* 81(3):559–575.
- Rizo J, Rosenmund C. 2008. Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* 15(7):665–674.
- Schweizer FE, Dresbach T, DeBello WM, O'Connor V, Augustine GJ, Betz H. 1998. Regulation of neurotransmitter release kinetics by NSF. *Science* 279(5354):1203–1206.
- Song I, Kamboj S, Xia J, Dong H, Liao D, Hagan RL. 1998. Interaction of the N-ethylmaleimide-sensitive factor with AMPA receptors. *Neuron* 21(2):393–400.
- Sora I, Wichems C, Takahashi N, Li XF, Zeng Z, Revay R, et al. 1998. Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(13):7699–7704.
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, et al. 2001. Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(9):5300–5305.
- Soria G, Mendizabal V, Tourino C, Robledo P, Ledent C, Parmentier M, et al. 2005. Lack of CB1 cannabinoid receptor impairs cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 30(9):1670–1680.
- Spealman RD. 1993. Modification of behavioral effects of cocaine by selective serotonin and dopamine uptake inhibitors in squirrel monkeys. *Psychopharmacology (Berlin)* 112(1):93–99.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68(4):978–989.
- Storey J. 2002. A direct approach to false discovery Rates. *J R Stat Soc Ser B* 64:479–498.
- Thomas MJ, Kalivas PW, Shaham Y. 2008. Neuroplasticity in the mesolimbic dopamine system and cocaine addiction. *Br J Pharmacol* 154(2):327–342.
- Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD. 2005. The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15(11):1592–1593.
- Tsuang MT, Lyons MJ, Meyer JM, Doyle T, Eisen SA, Goldberg J, et al. 1998. Co-occurrence of abuse of different drugs in men: the role of drug-specific and shared vulnerabilities. *Arch Gen Psychiatry* 55(11):967–972.
- Uhl GR, Hall FS, Sora I. 2002. Cocaine, reward, movement and monoamine transporters. *Mol Psychiatry* 7(1):21–26.
- Uys JD, LaLumiere RT. 2008. Glutamate: the new frontier in pharmacotherapy for cocaine addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7(5):482–491.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, Ding YS, Logan J, et al. 1996. Relationship between psychostimulant-induced “high” and dopamine transporter occupancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(19):10388–10392.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ. 1999. Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J Psychopharmacol* 13(4):337–345.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Goldstein RZ. 2002. Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem* 78(3):610–624.
- Vorel SR, Ashby CR Jr, Paul M, Liu X, Hayes R, Hagan JJ, et al. 2002. Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. *J Neurosci* 22(21):9595–9603.
- 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(4):479–488.
- Walsh SL, Cunningham KA. 1997. Serotonergic mechanisms involved in the discriminative stimulus, reinforcing and subjective effects of cocaine. *Psychopharmacology (Berlin)* 130(1):41–58.
- Woolverton WL, Johnson KM. 1992. Neurobiology of cocaine abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13(5):193–200.
- Xu F, Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Bohn LM, Miller GW, et al. 2000. Mice lacking the norepinephrine transporter are supersensitive to psychostimulants. *Nat Neurosci* 3(5):465–471.
- Yuferov V, Krosiak T, Laforge KS, Zhou Y, Ho A, Kreek MJ. 2003. Differential gene expression in the rat caudate putamen after “binge” cocaine administration: advantage of triplicate microarray analysis. *Synapse* 48(4):157–169.
- Zuo L, Kranzler HR, Luo X, Yang BZ, Weiss R, Brady K, 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):1504–1513.

### Supplementary material available online

Table SI. Description of the VeraCode genotyping assay within 16 candidate genes encoding proteins involved in vesicle fusion for neurotransmitters release (data from HapMap Phase II\_April07\_dbSNP126\_NCBI B36).

Table SII. Nominal *P* values observed when genotype frequencies of 121 SNPs within 15 candidate genes were considered in 360 cocaine-dependent patients and 360 controls.

*Supplementary materials for Fernández-Castillo N, Cormand B, Roncero C, Sánchez-Mora C, Grau-Lopez L, Gonzalvo B, Miquel L, Corominas R, Ramos-Quiroga JA, Casas M, Ribasés M. 2011 Candidate pathway association study in cocaine dependence: The control of neurotransmitter release. World J Biol Psychiatry DOI: 10.3109/15622975.2010.551406.*

Table S1. Description of the VeraCode genotyping assay within 16 candidate genes encoding proteins involved in vesicle fusion for neurotransmitters release (data from HapMap Phase II\_April07\_dbSNP126\_NCBI B36).

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage#	Other SNPs within the bin
<b>SNAP25</b>		20p12.2	88.59	8	40	19	rs1889189	5'		1	
							rs6039769	5'			
							rs363039	Intron 1			
							rs363043	Intron 1			
							rs12626080	Intron 1			
							rs6074113	Intron 1			
							rs362547	Intron 1			
							rs362570	Intron 1			
							rs6039806	Intron 3			
							rs3025873	Intron 4			
							rs362988	Intron 7			
							rs6108464	Intron 7			
							rs3787283	Intron 7			
							rs4813925	Intron 7			
							rs6074121	3'			
							rs6032845	3'			
rs3025879	3'										
rs6032846	3'										
<b>STX1A</b>	NM_004603	7q11.23	20.45	10	8	4	rs6951030	Intron 1	Failed	0.75	
							rs941298	Intron 1			
							rs2293485*	Exon 3			
							rs3793243	Intron 3			
							rs4363087	Intron 6			
							rs8067606	5'			
							rs2534724	5'			
							rs10492096	5'			
							rs11064213	5'			
							rs2072376	Exon1 5'UTR			
rs2240867	Intron 1										
rs2534717	Intron 4										
rs12964	Exon 5										
<b>VAMP2</b>	NM_014232	17p13.1	3.83	5	4	1	rs2278637			1	
							rs2534722				
							rs10849466				
							rs2532485				
							rs7390				
							rs1045452				
							rs1045548				
							rs10849462				
							rs12422771				
							rs11064210				
<b>VAMP1</b>	NM_014231	12q13.31	8.4	5	33	8	rs1045546		Failed	0.71	
							rs12426815				
							rs2072377				
							rs7298570				
							rs2534715				
							rs1034969				
							rs1017101				
							rs2240866				
							rs2058288				
							rs2072375				
rs2534713											
rs2243750											
rs2243977											
rs2244083											
rs2534721											
rs2534711											

(Continued)

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kb)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage#	Other SNPs within the bin
<b>SYT1</b>	NM_005639	12q21.2	233.6	8	132	14	rs2177963	Intron 1		0.85	rs2177963, rs10861698, rs1918193, rs2037743, rs1918195, rs7968716, rs1918188, rs1918190, rs7311549, rs8181778, rs7967265, rs1918191, rs4842447, rs10861717, rs1405498, rs1465054, rs1358248, rs6539317, rs1245803, rs1245804, rs1245806, rs1245810, rs1245814, rs1245819, rs1245820, rs1268463, rs1245824, rs1312846, rs1245825, rs1245828, rs1245835, rs1245837, rs1245840, rs1245841, rs1245842, rs10778564, rs10778565, rs10861753, rs10861755, rs10861757, rs2141701, rs1921026, rs10861758, rs10861799, rs6539315, rs1245807, rs1245831, rs1245832, rs10861769, rs2293650, rs11113673, rs1465053, rs1245805, rs12578266, rs7296233, rs10746105, rs11609774, rs10746106, rs10746114, rs7967411
							rs6539344	Intron 1	No Veracode		rs1245829, rs7963801
							rs11113425	Intron 1			rs11113410, rs10861762, rs11113435,
							rs2400393	Intron 1			rs10778573, rs10778575, rs7300645, rs2272500, rs10861795, rs10861796, rs10861797, rs6539373, rs4612885, rs1526952, rs10746103
							rs1732664	Intron 6			
							rs10861941	Intron 6			
							rs1245775	Intron 6	Failed		
							rs6539445	Intron 6			rs11113980
							rs11114027	Intron 6			
							rs7308297	Intron 6			rs1245765, rs1245778, rs1465051, rs2400395, rs9788036, rs7966962, rs1245769, rs1245766, rs10861976, rs10778657, rs10861975, rs1465044, rs1245767
							rs1465046	Intron 6			rs17005544, rs12581451, rs10506815, rs1405493, rs11608808, rs7303658, rs1465048, rs1465049, rs1405495, rs1526955, rs17005561, rs1358243, rs1405497, rs7315638, rs7295888, rs17005588, rs11612225, rs2701566, rs1465046 rs7954927, rs1526963, rs17005594, rs11833031, rs1114107, rs7135647, rs11114122, rs7315113, rs11114116
							rs17294719	Intron 6			
							rs2251214	Intron 6			

<b>SVT2</b>	NM_177402	1q32.1	114.7	9	85	23	rs10800856	5'	Failed	0.77	-	-
							rs12564274	5'	Failed		-	rs3923371, rs4325195
							rs12409197	Intron 1	Failed		-	rs4364933
							rs12141884	Intron 1	Failed		-	rs4072140, rs10920457, rs11590011,
							rs4400672	Intron 1	Failed		-	rs11588808, rs4950738, rs4950788, rs4362037,
							rs10920459	Intron 1	Failed		-	rs11578029, rs12040487, rs12046408
							rs6673562	Intron 1	Failed		-	rs4418670, rs4572021
							rs10800855	Intron 1	Failed		-	rs6698441, rs11585345, rs6693751, rs4453099
							rs7550433	Intron 1	Failed		-	rs4950786, rs4950865, rs4113203, rs6661284,
							rs10733069	Intron 1	Failed		-	rs6662116, rs10920451, rs10920452, rs4950866,
							rs12121078	Intron 1	Failed		-	rs4950867, rs2095981, rs12038816, rs6696612,
							rs11585565	Intron 1	Failed		-	rs4372314, rs16850204
							rs7534078	Intron 1	Failed		-	rs867316, rs12047572, rs10920440, rs10920445,
							rs1934663	Intron 1	Failed		-	rs6669326, rs1417160, rs7517181, rs4950785,
							rs12739678	Intron 1	Failed		-	rs12728991, rs10800847
rs10920427	Intron 1	Failed	-	rs867313, rs867314, rs867315, rs946857,								
rs7552201	Intron 1	Failed	-	rs12404969, rs10920442, rs4950863, rs4537626,								
rs578816	Intron 1	Failed	-	rs10737582								
rs12566757	Intron 1	Failed	-	-								
rs1968583*	Exon 2	Failed	-	-								
rs907697	Intron 7	Failed	-	-								
rs9633344	Intron 8	Failed	-	-								
rs6427957	3'	Failed	-	-								
rs11248047	5'	Failed	-	-								
rs7375209	Intron 2	Failed	-	-								
rs6832751	Intron 2	Failed	-	-								
rs7376690	Intron 2	Failed	-	-								
rs11248043	Intron 2	Failed	-	-								
rs11248042	Intron 2	Failed	-	-								
rs9328758	Intron 2	Failed	-	-								
rs7677766	Intron 2	Failed	-	-								
rs10004297	Intron 2	Failed	-	-								
rs11722977	Intron 2	Failed	-	-								
rs2306251	Intron 2	Failed	-	-								
<b>CPLXI</b>	NM_006651	4p16.3	41.2	4	27	16	rs6427957	3'	Failed	0.81	-	rs936551
							rs11248047	5'	Failed		-	rs9328757, rs6842106, rs2276906
							rs7375209	Intron 2	Failed		-	rs7377207
							rs6832751	Intron 2	Failed		-	-
							rs7376690	Intron 2	Failed		-	-
							rs11248043	Intron 2	Failed		-	-
							rs11248042	Intron 2	Failed		-	-
							rs9328758	Intron 2	Failed		-	-
							rs7677766	Intron 2	Failed		-	-
							rs10004297	Intron 2	Failed		-	-
							rs11722977	Intron 2	Failed		-	-
							rs2306251	Intron 2	Failed		-	-
							rs6427957	3'	Failed		-	-
							rs11248047	5'	Failed		-	-
							rs7375209	Intron 2	Failed		-	-
rs6832751	Intron 2	Failed	-	-								
rs7376690	Intron 2	Failed	-	-								
rs11248043	Intron 2	Failed	-	-								
rs11248042	Intron 2	Failed	-	-								
rs9328758	Intron 2	Failed	-	-								
rs7677766	Intron 2	Failed	-	-								
rs10004297	Intron 2	Failed	-	-								
rs11722977	Intron 2	Failed	-	-								
rs2306251	Intron 2	Failed	-	-								

(Continued)

Table S1. (Continued)

Gene	Contig reference	Location	Length (kp)	N° of exons	SNPs	Tag SNPs	SNP ID	Location	Exclusion criteria	Gene Coverage#	Other SNPs within the bin	
<b>CPLX2</b>	NM_006650	5q35.2	87.41	5	62	27	rs3816676	Intron 3			rs3775140, rs6840352	
							rs4690313	Intron 3				
							rs2242237	Exon 4				
							rs3733358	3'				
							rs6811804	3'			Failed	rs17165034 rs6816868
							rs2243404	Exon 1			0.85	rs2443541, rs2434237, rs890736, rs2382120, rs7727183
							rs10866688	5'UTR				
							rs7718856	Intron 2			Failed	
							rs6874025	Intron 2				rs17065511, rs883188
							rs12520557	Intron 2				rs2382123, rs688724, rs10475623
							rs11134932	Intron 2			Failed	rs2382121
							rs4242187	Intron 2				
							rs10476170	Intron 2				
							rs17065535	Intron 2				
							rs6556225	Intron 2				rs6887620
rs1560035	Intron 2											
rs10072860	Intron 2			No Veracode								
rs12188152	Intron 2			Failed								
rs4867806	Intron 2				rs4868537, rs1560036							
rs11134935	Intron 2											
rs4868538	Intron 2				rs10866690, rs4867807							
rs10866691	Intron 2				rs10076867, rs999065							
rs4868539	Intron 2											
rs890737	Intron 2				rs7705543, rs1820646, rs1366116, rs12522368							
rs11134938	Intron 2				rs6860661, rs871853, rs1560033, rs4867808, rs3892909, rs4077871, rs3180249, rs12656972 rs4867809, rs9313730, rs3822674							
rs1006101	Exon 5				rs1560034							
rs10866692	3'UTR											
rs930047	Exon 5											
rs13166213	3'UTR											
rs11134942	Exon 5											
rs2114968	3'UTR											
rs7162232	Exon 5				rs2382114, rs7718100							
rs6495122	3'UTR			2	rs11634474, rs9210							
rs6092098	Exon 5	15q24.1	5.19	3	4	1						
rs10503024	Intron 1	18q21.32	23.23	3	27	0.89						
rs509886	Intron 2											
rs640401	Intron 2					rs561894, rs668992, rs654802						
rs12232757	Intron 2					rs537048, rs536113, rs508858						
rs12456930	Intron 2					rs4940456						



Table SII. Nominal P-values observed when genotype frequencies of 121 SNPs within 15 candidate genes were considered in 360 cocaine dependent patients and 360 controls.

GENE	SNP	P-value
<b>SYT2</b>	rs6427957	0.15212
	rs9633344	0.46772
	rs907697	0.90325
	rs7552201	0.86890
	rs10920427	0.75248
	rs12739678	0.06504
	rs1934663	0.57648
	rs7534078	0.96311
	rs11585565	0.75220
	rs12121078	0.08003
	rs10733069	0.16372
	rs7550433	0.34683
	rs10800855	<b>0.01254</b>
	rs6673562	0.15972
	rs4400672	<b>0.04832</b>
	rs12141884	0.32292
	rs12564274	0.20735
	<b>VAMP1</b>	rs12964
rs2534717		0.34739
rs2240867		0.22587
rs2072376		0.75251
rs10492096		0.39987
rs2177963		0.62265
<b>SYT1</b>	rs11113425	0.64354
	rs2400393	0.39748
	rs1732664	0.35062
	rs10861941	<b>0.02279</b>
	rs6539445	0.83461
	rs11114027	0.37482
	rs7308297	0.18092
	rs1465046	0.57448
	rs17294719	0.36636
	rs2251214	0.32359
<b>CPLX3</b>	rs7162232	0.67135
	rs6495122	0.60608
	rs8067606	0.80588
<b>VAMP2</b>	rs183211	<b>0.00238</b>
	rs17692129	0.83791
<b>NSF</b>	rs7224296	0.05305
	rs17698176	0.38155
	rs1914321	0.02163
	rs499824	0.81498
	rs7228681	0.13420
	rs12456930	0.08485
	rs12232757	0.42805
	rs640401	<b>0.04187</b>
	rs509886	0.20299
	rs10503024	0.13737
<b>RAB3A</b>	rs874628	0.73628
	rs2271881	0.77492
	rs2271882	0.25798
	rs17683539	0.70461
	rs2049051	0.05203
<b>SNPH</b>	rs6109320	0.98512
	rs7354385	0.58227
	rs3764715	0.23104

(Continued)

Table SII. (Continued)

GENE	SNP	P-value
<b>SNAP25</b>	rs6134520	0.32681
	rs4814106	0.25008
	rs2281711	0.97015
	rs1889189	0.15589
	rs6039769	0.15654
	rs363039	0.38271
	rs363043	0.87723
	rs12626080	0.54758
	rs6074113	0.32190
	rs362547	0.16478
	rs362570	0.28418
	rs6039806	0.05962
	rs3025873	0.75712
	rs362988	0.78774
	rs6108464	0.35760
	rs3787283	0.33002
	rs4813925	0.57665
	rs6074121	0.45345
<b>CPLX1</b>	rs6032845	0.67322
	rs3025879	0.24403
	rs6032846	0.14444
	rs3733358	0.30114
	rs2242237	0.46714
	rs4690313	0.11870
	rs3816676	0.50524
	rs2306251	0.69868
	rs11722977	0.00644
	rs7677766	0.75547
<b>CPLX2</b>	rs9328758	0.97542
	rs11248042	0.17946
	rs11248043	0.16668
	rs6832751	0.65893
	rs7375209	0.33853
	rs11248047	0.93505
	rs2243404	0.76688
	rs7718856	0.07444
	rs6874025	0.72218
	rs12520557	0.76957
<b>STX1A</b>	rs11134932	0.92888
	rs10476170	0.53281
	rs17065535	0.11211
	rs6556225	0.36353
	rs1560035	0.47697
	rs4867806	0.65625
	rs11134935	0.49431
	rs4868538	0.16514
	rs10866691	0.94357
	rs4868539	<b>0.02956</b>
	rs890737	0.90204
	rs11134938	0.57680
	rs1006101	0.88312
	rs10866692	0.99481
	rs930047	0.51534
	rs13166213	0.58418
	rs11134942	0.27905
	rs2114968	0.45165
rs4363087	0.90163	
rs3793243	0.86838	

(Continued)



Table SII. (Continued)

GENE	SNP	P-value
	rs2293485	0.66049
	rs941298	0.76395
<b>STXBPI</b>	rs2039204	0.71640
	rs7852204	0.84553
	rs2241167	0.62985
<b>SYP</b>	rs2293945	0.67915
	rs5906754	0.94017

In bold, nominally significant p-values.



