



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Análisis molecular de la comorbilidad en trastornos neurológicos

Alumno: María de la Luz Fernández Mesa

Julio, 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA COMORBIDAD EN TRASTORNOS NEUROLÓGICOS

Una firma manuscrita en tinta azul, que parece ser la del alumno, escrita sobre un fondo blanco.

Alumno: María de la Luz Fernández Mesa

Julio, 2017

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
3.1. Selección de enfermedades comórbidas a la esquizofrenia..	17
3.2. Identificación de genes.....	17
3.3. Análisis de agrupamiento de enfermedades y trastornos.....	18
3.4. Construcción de la red de interacción.....	19
3.5. Análisis de red.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Resultados.....	21
4.2. Análisis de agrupamiento.....	21
4.3. Construcción de la red de interacción y análisis de enriquecimiento funcional.....	24
4.4. Análisis de red.....	26
5. DISCUSIÓN.....	29
6. CONCLUSIÓN.....	33
7. BIBLIOGRAFÍA.....	35

RESUMEN

Las personas con alteraciones neurológicas de tipo psiquiátrico presentan un elevado riesgo de padecer comorbilidad con otras enfermedades o trastornos. La esquizofrenia es una enfermedad con un alto impacto social, por lo que conocer la posible relación molecular existente entre la esquizofrenia y sus trastornos comórbidos, puede ser muy útil en la selección de fármacos para su tratamiento. Para ello, en el presente Trabajo de Fin de Grado se ha seguido un abordaje propio de Biología de Sistemas mediante la construcción y caracterización de la red biológica de interacción de los genes que tiene en común la esquizofrenia con trastornos comórbidos a ella como son la depresión y los trastornos bipolar y de pánico. Los resultados obtenidos nos han permitido verificar que la mayor parte de los genes clave detectados están implicados en procesos neurológicos y que su alteración suele deberse a mutaciones génicas.

ABSTRACT

Patients with neurological disorders of the psychiatric type have a high risk of comorbidity with other diseases or disorders. Schizophrenia is a disease with a high social impact; thus, to know the possible molecular relationships between schizophrenia and its comorbid disorders can be useful for selecting the appropriate drugs and treatment. In the present work, we follow a Systems Biology approach to build and characterize the biological network of interacting genes that are in common among schizophrenia and its comorbid disorders such as depression, bipolarity and panic. The obtained results showed that the key genes thus detected are involved in neurological processes and that they are mainly affected by genetic mutations.

1. INTRODUCCIÓN

Desde los inicios del pasado siglo XX, el estudio del cerebro se encontraba parcelado en campos del conocimiento que se diferenciaban en su metodología, según los objetivos fuesen comprender bien la estructura o bien la función cerebral. A su vez, las investigaciones sobre la función del cerebro se dividían entre fisiológicas y comportamentales o psiquiátricas, siendo estas últimas consideradas como una “caja negra” donde sólo se conocía su acceso y salida, sin tener información sobre los componentes neurológicos de los que formaban parte y de su interacción (Sloane et al., 1963). De entre todas las alteraciones neurológicas, son las psiquiátricas las que, por sus características complejas e implicaciones sociales, nos resultan de interés analizar desde un punto de vista de relación molecular, pues está claro que, aún lejos de haberse desentramado sus correlaciones morfofuncionales, la mente es una función del cerebro (Mandler, 2011).

Existen una gran variedad de trastornos psiquiátricos, cada uno de los cuales se caracteriza en presentar diferentes manifestaciones en el comportamiento, así como por la combinación de distintos factores entre los que destacan alteraciones en el pensamiento, las emociones, la percepción, la conducta y la relación con los demás (Berner et al., 2015). Las personas con trastornos mentales tienen un elevado riesgo de padecer comorbilidad psiquiátrica (Druss et al., 2011). El término comorbilidad hace referencia a la co-ocurrencia de alteraciones que presenta un paciente con una determinada enfermedad o trastorno, sin tener en cuenta el orden cronológico en el que han ido apareciendo (Feinstein et al., 1970).

La esquizofenia es un trastorno mental grave, cuyos síntomas varían en función del paciente que lo padezca y entre los que podemos destacar la presencia de alteraciones en la percepción del pensamiento, alucinaciones y delirio, e incluso puede estar caracterizado por la aparición de trastornos emocionales y alteraciones en la conducta (López e Ibarra, 2013). Se ha estimado que es una de las enfermedades con más coste social, ocupando el séptimo lugar (Freedman, 2003). La complejidad de la esquizofrenia se debe a que es un trastorno en el que no sólo intervienen factores genéticos, sino que

también forman parte los factores ambientales. Además, los factores genéticos tienen una gran complejidad, ya que se ha descrito un elevado porcentaje de mutaciones en cientos de genes (Gejman et al., 2010).

Es muy habitual encontrarse comorbilidades psiquiátricas en pacientes con esquizofrenia (Buckley et al., 2009). Este hecho fue demostrado en varios estudios, los cuales indican que las personas que padecen esquizofrenia tienen una mayor probabilidad de padecer tres o más enfermedades crónicas con respecto a personas sanas (Carney et al., 2006). Uno de los trastornos asociados a la esquizofrenia es el estrés, el cual se apunta a que se produce como consecuencia de agotamiento del sistema inmunológico y a un incremento de la respuesta inflamatoria (Black, 2006). Otro trastorno mental muy común, la depresión, está también vinculado a una alteración de la función del sistema inmunitario como consecuencia de un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias (proteínas de señalización de pequeño tamaño que forman parte de la respuesta inflamatoria) y a una disminución de la respuesta inmunitaria celular (Kiecolt y Glaser, 2002). También cabe destacar la relación que existe entre la esquizofrenia y los comportamientos asociados al consumo de tabaco, bebidas alcohólicas, drogas y la insuficiencia de actividad física (Lasser et al., 2000), lo cual se asocia al objetivo de aspirar a un estado de emoción deseado, aliviar los efectos negativos que pueden producir los síntomas psiquiátricos o para hacer frente a los efectos producidos por el estrés (Schuckit et al., 2006)

En el presente trabajo nos centraremos en el estudio de trastornos psiquiátricos que están asociados con la esquizofrenia (Eaton et al., 2008) los cuales, a su vez, se consideran enfermedades multifactoriales, es decir, el desarrollo de éstos están influenciados por diferentes factores genéticos y ambientales (Budde et al., 2017).

El estudio de las enfermedades multifactoriales ha ido evolucionando gracias a la aparición de las tecnologías ómicas (epigenómica, genómica, proteómica, transcriptómica y metabolómica), cuyo objetivo principal es obtener un mayor conocimiento de los sistemas complejos biológicos (Silvestri et al., 2011). Estas tecnologías ayudan a estudiar tanto la estructura del genoma y los

procesos celulares que intervienen en él como la función biológica derivada (Egea et al., 2014). El análisis de la ingente cantidad de datos proporcionados por las tecnologías ómicas supone un reto que requiere la integración de conocimientos procedentes de disciplinas *a priori* muy diferentes como son la biología, la medicina, las matemáticas y la informática. De dicha integración se encarga la denominada Biología de Sistemas (Wang y Bodovitz, 2010), la cual nos permite obtener conclusiones funcionales a partir de datos moleculares y sus interacciones complejas (Altmäe et al., 2014).

Los datos biológicos como los perfiles de expresión de genes, las interacciones proteína-proteína, la transducción de señales y la rutas celulares, en Biología de Sistemas son normalmente representados mediante la construcción de redes (Chin et al., 2014), con el objetivo final de determinar cuáles son sus propiedades (Vera et al., 2016), y simbolizar el desarrollo bioquímico y molecular que tiene lugar en el interior de la célula (Diez et al., 2014).

Hoy día existen diferentes plataformas computacionales que nos permiten llevar a cabo la construcción de la red y, de un modo dirigido, analizar los genes detectados como diferencialmente expresados entre diferentes estados experimentales o médicos. De entre estas plataformas destaca STRING (Salwinski et al., 2004), la cual se basa en la detección de interacciones de productos génicos, principalmente proteína-proteína. Aunque otras bases de datos nos pueden ayudar a mostrar una visión general, a través de la agrupación de las funciones que tienen las proteínas en vías metabólicas, vías de señalización y vías de transcripción (Krieger et al., 2004), o incluso a predecir asociaciones proteína-proteína (Enault et al., 2004), STRING las engloba en un contexto común con todas las ventajas que conlleva (Von Mering et al., 2005).

En las redes moleculares nos podemos encontrar diferentes tipos elementos y estructuras a analizar. Por un lado los nodos, que pueden representar, como es en nuestro caso, genes o proteínas (Jeong et al., 2000). Por otro lado, módulos formados por un conjunto de diferentes nodos, con enlaces fuertemente vinculados en cuanto a su función de manera que, cuanto mayor sea el grado de dependencia entre estos nodos, la interacción entre ellos

será mayor con respecto a las demás moléculas que formen parte de la red (Spirin y Mirny, 2003). El reconocimiento de los módulos se establece mediante métodos de análisis topológico, los cuales establecen las estructuras de los módulos como complejos de proteínas o cascadas de señalización y muestran patrones de interacción, con el fin de identificar las regiones que estén fuertemente conectadas y detectando si participan en una determinada característica de interés. Además, los módulos pueden ser investigados por estrategias de enriquecimiento en cuanto a su funcionalidad, con el objetivo de valorar si los elementos que forman parte del módulo tienen gran importancia, además de descubrir nuevas funciones no esperadas (Mitra et al., 2013).

El interés que existe por la identificación de la estructura de las redes de enfermedades o trastornos se debe al papel que desempeñan los nodos y los enlaces que se establecen en la red, ya que a partir de estos podemos extraer información de los procesos que ocurren a nivel molecular. Esta información puede ser utilizada con el fin de identificar los cambios que se producen a lo largo del tiempo en la célula en cuanto a su actividad fisiológica y bioquímica a través de métodos computacionales (Diez et al., 2014).

La construcción de redes biológicas también puede utilizarse para configurar otros datos de interés. Un ejemplo es el *diseasoma* humano, cuya función consiste en conectar enfermedades con genes a nivel molecular, es decir, trata de describir enfermedades a partir de los genes que intervienen en ellas (Goh et al., 2007).

El siguiente paso a realizar una vez que ha sido construida la red molecular es su análisis. En la actualidad existen múltiples herramientas computacionales con este fin. En nuestro caso se ha utilizado *Cytoscape*, al ser una interfaz de uso sencillo (Shannon et al., 2003). Este sistema puede aceptar numerosos y diferentes tipos de datos en distintos formatos los cuales, además de integrarse en forma de red, pueden ser analizados tanto desde un punto de vista topológico como funcional. De entre el amplio conjunto de parámetros topológicos de una red destacan dos medidas de centralidad de redes: el grado (*degree*) y la intermediación (*betweenness*). La centralidad de grado, o *degree*, se define como el número total de nodos a los que un determinado nodo está

conectado; con este parámetro se evalúa la importancia que tiene dicho nodo en la red, si bien no tiene en cuenta la estructura global de la red; es decir, si un nodo establece conexión con muchos nodos es posible que éste no esté en situación de llegar a otros para acceder a recursos (Opsahl et al., 2010). Por otro lado, la intermediación o *betweenness*, permite evaluar el grado en el que un nodo actúa interconectando a varios grupos de nodos entre sí (Freeman, 1979). A diferencia de la centralidad de grado, la intermediación sí tiene en cuenta la estructura global de la red.

Cabe destacar que el análisis de redes biológicas permite la caracterización de enfermedades que presentan una base genómica común y, por lo tanto, la detección de trastornos con causas comunes, lo cual puede ser muy útil en la selección de fármacos para su tratamiento (Goh et al., 2007).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado consiste en conocer la posible relación molecular existente entre diferentes enfermedades y trastornos comórbidos a la esquizofrenia, mediante la construcción y caracterización de la red biológica de interacción de los genes que tiene en común. Además, tanto el abordaje como la metodología utilizados nos permiten integrar conocimientos de diferentes asignaturas cursadas durante el Grado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Selección de enfermedades comórbidas a la esquizofrenia

Los trastornos cómorbidos que se han sido seleccionados para analizar en el presente trabajo se obtuvieron de la investigación realizada por Eaton y colaboradores, en la cual se estudió el riesgo de mortalidad de personas con trastornos mentales con respecto a una población de personas sanas (Eaton et al., 2008). Los trastornos comórbidos y comportamientos de riesgo seleccionados fueron: esquizofrenia; trastorno de personalidad; trastorno bipolar; abuso de marihuana; trastorno de estrés; trastorno de pánico; consumo de cocaína; y trastorno depresivo.

3.2 Identificación de genes

La identificación de los genes reponsables de cada uno los trastornos comórbidos se realizó mediante la utilización de la plataforma Phenopedia (<https://phgkb.cdc.gov/PHGKB/startPagePhenoPedia.action>). A partir de cada uno de los términos MESH (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/>) asociados a las enfermedades comórbidas, Phenopedia genera una tabla en la que se incluyen los genes que se han detectado relacionados con la enfermedad, ordenados en función del número de artículos en los que se ha mostrado dicha relación (Yu et al., 2009). En la Tabla 1 se indican los términos MESH utilizados. Como ejemplo concreto, la Tabla 2 muestra parte de los genes seleccionados e implicados en la esquizofrenia.

Neurological disorders
Alcohol-Induced Disorders
Bipolar Disorder
Cocaine-Related Disorders
Depressive Disorder
Marijuana Abuse
Panic Disorder
Personality Disorders
Schizophrenia
Stress Disorders, Post-Traumatic disorders

Tabla 1. Términos MESH asociados a enfermedades comórbidas.

Nombre del gen	Publicaciones totales	Publicaciones de meta-análisis
COMT	331	15
DRD2	172	14
BDNF	157	17
NRG1	127	8
HTR2A	109	10
DISC1	107	10
SLC6A4	98	5
DTNBP1	94	3
DRD3	92	9
MTHFR	79	18
ZNF804A	70	12
CYP2D6	69	3
DRD4	66	6
DAOA	62	8
SLC6A3	59	3

Tabla 2. Símbolos de los 15 primeros genes pertenecientes a la esquizofrenia.

3.3 Análisis de agrupamiento de enfermedades y trastornos

Una vez seleccionados los genes implicados en cada enfermedad, nos propusimos tratar de averiguar la relación existente entre estas enfermedades comórbidas según su perfil génico. De entre los distintos métodos que pueden ser utilizados con este fin, en nuestro caso hemos llevado a cabo un análisis de agrupamiento (*cluster*). Dicho método de agrupamiento tiene como finalidad distribuir el conjunto de observaciones en asociaciones de elementos según su similitud, que en este estudio son los genes comunes (Cilibiasi y Vitanyi, 2005).

Para ello, en primer lugar se llevó a cabo la construcción de una matriz de ausencia/presencia de cada gen con respecto a cada una de las enfermedades; se utilizaron *scripts* personalizados en Python, un lenguaje de programación usado frecuentemente en bioinformática (Karlebach y Shamir, 2008). Con la

matriz generada construimos el dendrograma mediante el paquete fcp del software R (<https://cran.rproject.org/web/packages/fpc.pdf>). Se utilizó el índice de Jaccard como parámetro de similitud puesto que únicamente tiene en cuenta las presencias (y no las ausencias); es decir, actúa comparando en los conjuntos de datos qué genes están presentes en una enfermedad y cuáles no. Como método de agrupamiento se utilizó el de tipo completo. A continuación se realizó una validación de significación estadística mediante *bootstrapping*, lo cual nos permite evaluar la estabilidad y la validez de las agrupaciones (Kerr y Churchill, 2001). Los valores del índice de agrupamiento que sean iguales o estén por debajo de 0,65 se suelen considerar inestables y, por lo tanto, no significativos.

Con el fin de visualizar la intersección entre los conjuntos de genes asociados a cada enfermedad o trastorno se construyeron diagramas de Venn (<http://bioinformatiics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

3.4 Construcción de la red de interacción

Para construir las redes de interacción molecular se utilizó el software STRING (*Search Tool for Retrieval of Interacting Genes/Proteins*; <http://string-db.org/>). Una vez importado el listado de genes de interés, las interacciones se obtuvieron utilizando el procedimiento empleado por Wall y sus colaboradores (2009), el cual incluye: co-ocurrencia, vecindad, co-expresión, base de datos y minería de texto (Szkarczyk et al., 2015). Con respecto a la puntuación de interacción, podemos encontrar varios niveles de confianza que van desde 0,15 hasta el 0,90 y cuyo valor coincide con la probabilidad de encontrar proteínas correspondientes a cada asociación prevista (Von Mering et al., 2005). En nuestro caso se seleccionó un nivel medio de confianza: 0,40.

3.5. Análisis de red

Para realizar el análisis de la red se utilizó *Cytoscape* (<http://cytoscape.org>), una plataforma de software que se encuentra disponible gratuitamente y que permite visualizar y analizar redes complejas. Dicho análisis

se realizó a partir de los resultados de interacción proporcionados por STRING. Como parámetros de centralidad se red se obtuvieron la intermediación (*betweenness*) y el número de interacciones que tiene cada gen con respecto a los demás genes (*degree*). Se seleccionaron como significativos los nodos con un *degree* o *betweenness* superior a la media más la desviación estándar.

4. RESULTADOS

4.1 Resultados

Se identificaron 8 enfermedades comórbidas con la esquizofrenia (Tabla 1). Con el uso de Phenopedia se obtuvieron los genes que han sido implicados en estos trastornos. Tal y como se muestra en la Tabla 1, el número de genes asociados fue muy variable, desde los 1806 y 1039 relacionados con la esquizofrenia y el desorden bipolar, respectivamente, a los 71 obtenidos cuando la búsqueda se centró en el abuso de marihuana.

Neurological disorders	Number of genes
Alcohol-Induced Disorders	147
Bipolar Disorders	1039
Cocaine-Related Disorders	103
Depressive Disorders	456
Marijuana Abuse	71
Panic Disorders	379
Personality Disorders	128
Schizophrenia	1806
Stress Disorders, Post-Traumatic	74

Tabla 3. Enfermedades comórbidas a la esquizofrenia (se indican los terminos en inglés) y número de genes relacionados a cada una según Phenopedia.

4.2 Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento generó un dendrograma que indica la relación de proximidad de la esquizofrenia con los ocho trastornos comórbidos. La figura 1 muestra cómo la esquizofrenia se relaciona, según su perfil génico, principalmente con el desorden bipolar y también con el trastorno depresivo y de pánico. El coeficiente de estabilidad de agrupamiento del dendrograma obtenido fue de 0,85; valores superiores a 0,65 se consideran no producidos al azar.

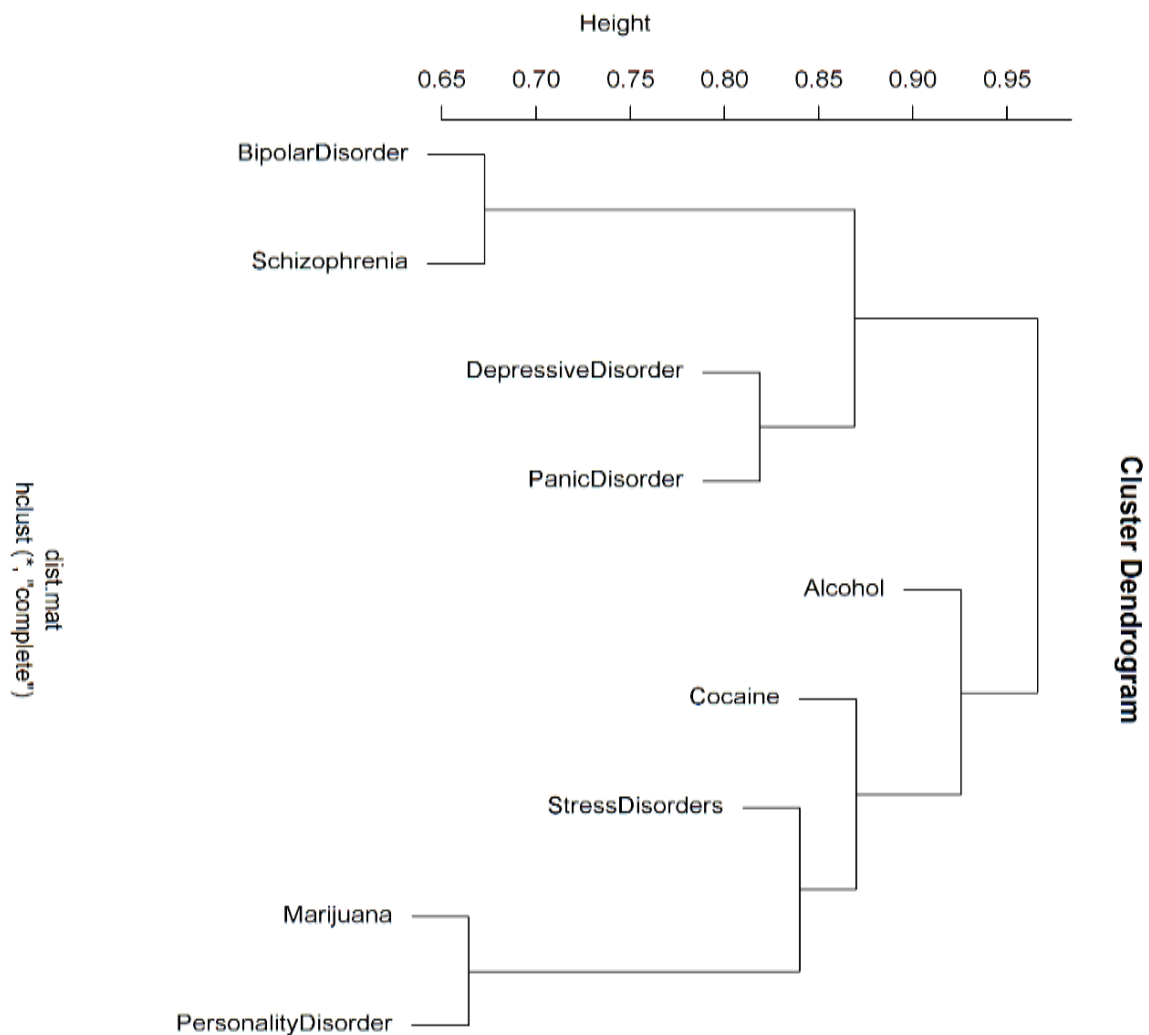


Figura 1. Dendrograma correspondiente al clustering jerárquico de los 9 trastornos neurológicos comórbidos.

Con el objetivo de detectar los genes comunes a los trastornos más próximos a la esquizofrenia (bipolar, depresión y pánico) se llevó a cabo la construcción un diagrama de Venn que muestra la intersección entre ellos. La figura 2 indica que son 112 los genes en común, de un total de 2298 genes. La tabla 4 incluye los símbolos de estos genes de interés.

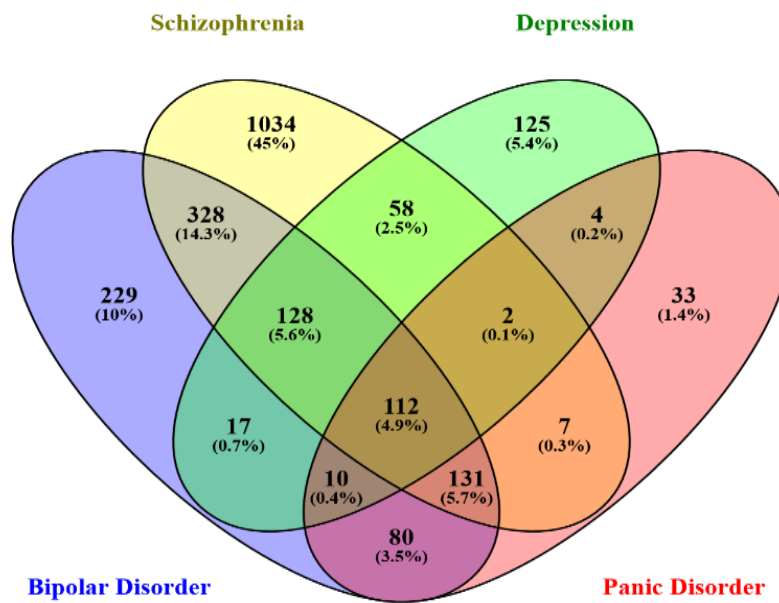


Figura 2. Diagrama de Venn que muestra la intersección de los genes asociados a los cuatro trastornos de interés: esquizofrenia, depresión, pánico y bipolar.

Names intersected	Total	Elements
Bipolar Disorder Depression Panic Disorder Schizofrenia	112	NOS2 DTNBP1 MAOA APOE MDD1 DRD3 CRHBP ADRA2A GRIK2 HTR3A OXTR AGT DBH ADRA1A DISC1 PPP1R1B TNF GRIP1 EGF GRIA1 NPY GAD2 S100B ESR1 HTR5A NRXN1 GAL CREM LSAMP NR3C2 HTR1A CRHR1 GDNF NTRK2 ADCYAP1 CRH IL10 EGFR CREB1 GABRP VIP GRIK3 PDE4B HTR1D GRM7 GABRG2 POMC GRIA4 HTR2A TPH2 GPX1 P2RX7 AANAT COMT SLC6A3 CHRNA7 GNB3 DRD1 SLC6A2 CTNND2 SLC6A4 NRP1 NOS1 HTR2C PON1 BDNF ADORA2A GRIK4 CRHR2 CNR1 ABCB1 NR3C1 FAAH HTR3B SNAP25 CNTF DRD2 GRIN2B TPH1 GABRA2 PER2 ADRB2 SLC17A7 GRIA3 NTRK3 GABRA6 ADA VIPR2 ACE L1CAM HTR2B MAOB GRIK1 HTR1B MAGI2 TSPO SLC6A5 HOMER1 HTR6 CCKAR AVPR1A NLGN1 CNTNAP2 NOS3 CHRM2 OPRM1 DAOA NRG1 AR GAD1 GABRA3 GRIA2

Tabla 4. Símbolo de cada uno de los 112 genes que se han detectado en común entre los trastornos de bipolaridad, depresión, pánico y esquizofrenia.

4.3 Construcción de la red de interacción y análisis de enriquecimiento funcional.

La figura 3 muestra la red de interacción generada por STRING a partir de los 112 genes en común entre los trastornos comórbidos de interés. Con esta plataforma también puede realizarse el análisis de enriquecimiento funcional de dichos genes. Los resultados se muestran en la tabla 4 y, como puede observarse, los procesos implicados están relacionados con la función del sistema nervioso.

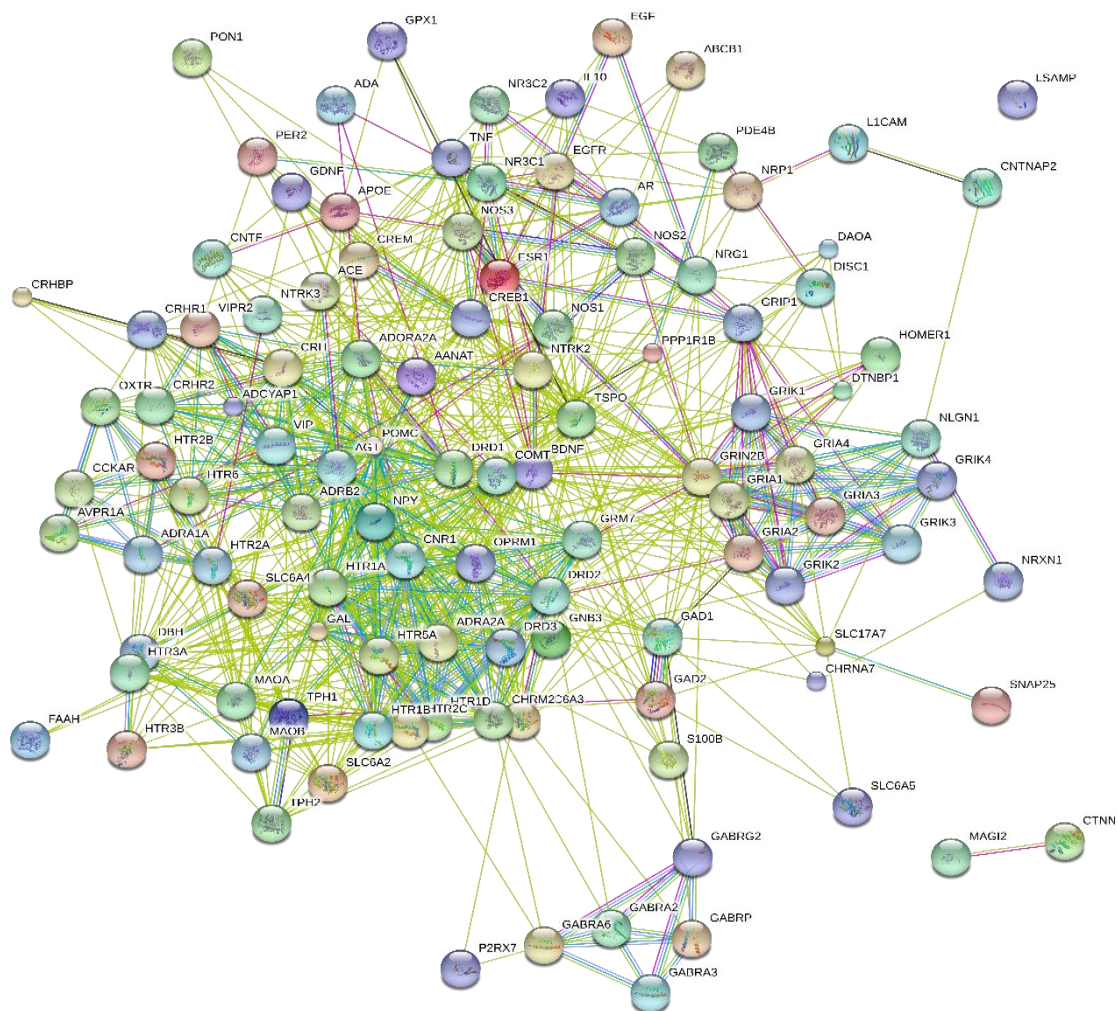


Figura 3. Red de interacción del conjunto de genes en común entre los cuatro trastornos comórbidos.

Biological Process (GO)			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
GO:0007267	cell-cell signaling	59	1.76e-47
GO:0007268	synaptic transmission	46	8.53e-40
GO:0044708	single-organism behavior	38	1.42e-34
GO:0007610	behavior	39	7.91e-32
GO:0014070	response to organic cyclic compound	43	9.94e-30
(more ...)			
Molecular Function (GO)			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
GO:0004888	transmembrane signaling receptor activity	47	1.66e-27
GO:0038023	signaling receptor activity	46	2.63e-25
GO:0004871	signal transducer activity	49	2.39e-24
GO:0004872	receptor activity	47	3.94e-24
GO:0060089	molecular transducer activity	50	1.89e-23
(more ...)			
Cellular Component (GO)			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
GO:0043005	neuron projection	51	9.98e-39
GO:0097458	neuron part	54	1.7e-37
GO:0036477	somatodendritic compartment	41	2.95e-32
GO:0097060	synaptic membrane	30	9.43e-30
GO:0030424	axon	32	4.63e-28
(more ...)			
KEGG Pathways			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	43	6.28e-50
04020	Calcium signaling pathway	19	1.44e-17
04726	Serotonergic synapse	16	6.92e-17
05033	Nicotine addiction	12	8.77e-17
04728	Dopaminergic synapse	15	1.1e-14
(more ...)			
PFAM Protein Domains			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
PF00001	7 transmembrane receptor (rhodopsin family)	14	4.32e-12
PF00060	Ligand-gated ion channel	6	1.55e-10
PF10613	Ligated ion channel L-glutamate- and glycine-binding site	6	1.55e-10
PF01094	Receptor family ligand binding region	6	2.77e-08
PF00104	Ligand-binding domain of nuclear hormone receptor	4	0.0211
(more ...)			
INTERPRO Protein Domains and Features			
<i>pathway ID</i>	<i>pathway description</i>	<i>count in gene set</i>	<i>false discovery rate</i>
IPR000276	G protein-coupled receptor, rhodopsin-like	14	4.72e-11
IPR017452	GPCR, rhodopsin-like, 7TM	14	4.72e-11
IPR001320	Ionotropic glutamate receptor	6	1.98e-10
IPR001508	Ionotropic glutamate receptor, metazoa	6	1.98e-10
IPR019594	Ionotropic glutamate receptor, L-glutamate and glycine-binding domain	6	1.98e-10
(more ...)			

Tabla 5. Análisis de enriquecimiento funcional de los componentes de la red.

4.4 Análisis de red

Con el fin de detectar qué nodos de la red están más conectados o tienen un mayor índice de intermediación, los datos de interacción se analizaron con el software Cytoscape. Como genes significativos se seleccionaron aquellos con un valor de estos parámetros superior a la media más la desviación estándar (36,7 para el grado de conexión y 0,05 para la intermediación).

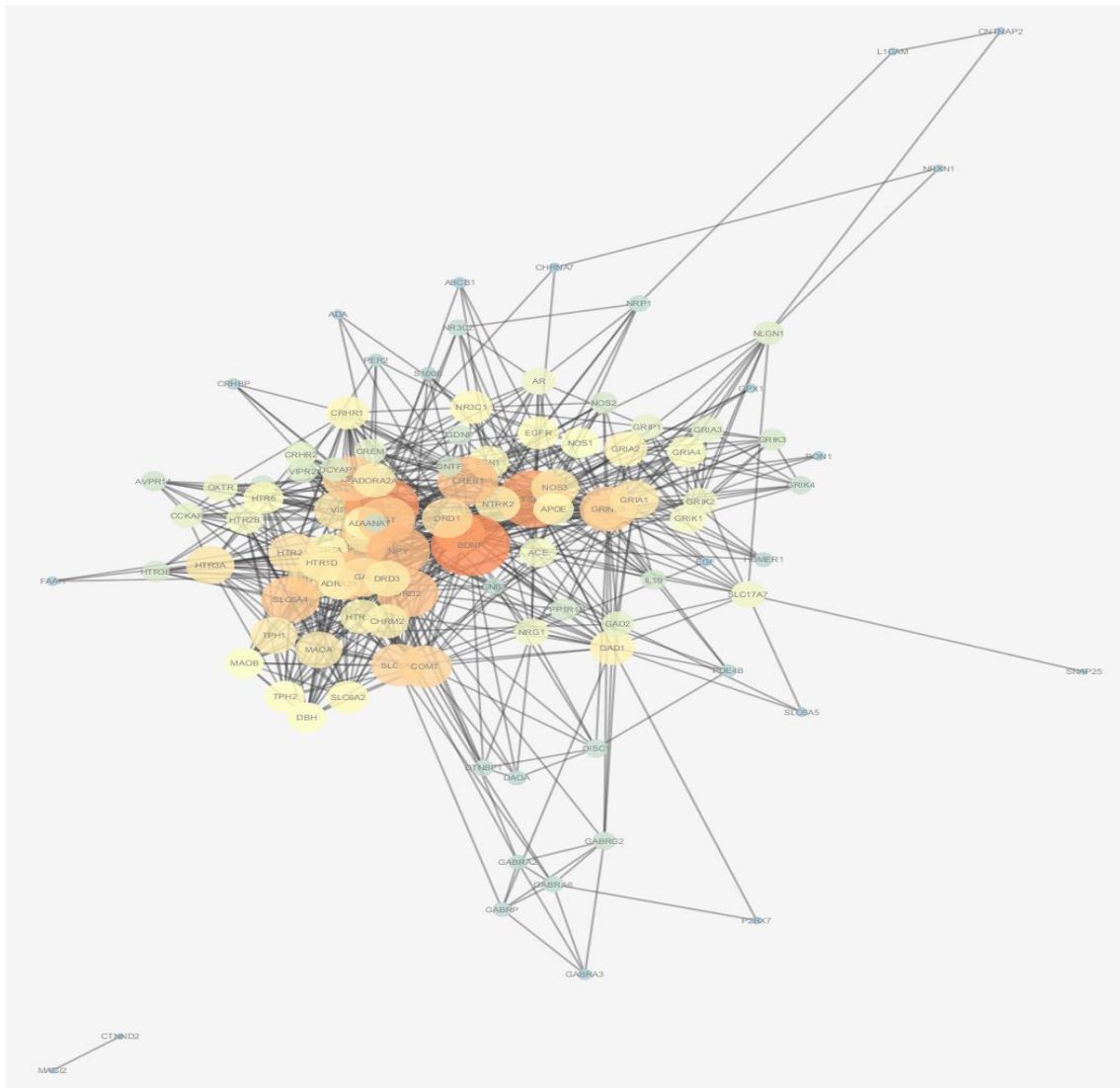


Figura 4. Red de interacción construida a partir de los genes correspondientes a los trastornos comórbidos. Los genes significativos son representados con un mayor tamaño del nodo en la intermediación y con un color más oscuro en el grado de conexión.

Los resultados obtenidos indicaron que los genes con grado de conexión significativo fueron los codificantes para el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la proopiomelanocortina (POMC), la proteína translocadora (TSPO), el neuropéptido Y (NPY), el factor de transcripción CREB1 y el receptor de dopamina D2 (DRD2). En cuanto a los genes con un valor de intermediación significativo, se detectaron BDNF, POMC, TSPO y la subunidad épsilon-2 del receptor de glutamato NMDA (GRIN2B).

Símbolo	Nombre	<i>Betweenness</i>	<i>Degree</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro	0,1	53
POMC	Proopiomelanocortina	0,06	48
TSPO	Proteína translocadora	0,12	47
NPY	Neuropéptido Y	0,03	38
CREB1	Factor de transcripción CREB1	0,04	36
DRD2	Receptor de dopamina D2	0,05	36
GRIN2B	Subunidad épsilon-2 del receptor de glutamato NMDA	0,06	32

Tabla 6. Lista de genes seleccionados con un *Betweenness* superior a 0,05 y un *Degree* igual o superior a 36.

5. DISCUSIÓN

En este estudio se ha llevado a cabo un análisis de relación de comorbidad basado en los perfiles génicos diferenciales la esquizofrenia y 8 trastornos comórbidos inicialmente seleccionados por criterios clínicos. De entre estos trastornos hemos detectado, mediante análisis propios de la Biología de Sistemas, que aquellos más próximos a la esquizofrenia son los trastornos bipolar, depresivo y de pánico, compartiendo entre ellos 112 genes principalmente implicados en funciones del sistema nervioso.

Con el fin de tratar de identificar posibles dianas terapéuticas, se construyó la red de interacción proteica, de la cual se obtuvieron los parámetros de centralidad de grado e intermediación. A partir de estos parámetros se detectaron 7 genes que pueden ser clave en el desarrollo de trastornos comórbidos a la esquizofrenia: el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), la proopiomelanocortina (POMC), la proteína translocadora (TSPO), el neuropéptido Y (NPY), el factor de transcripción CREB1, el receptor de dopamina D2 (DRD2) y la subunidad épsilon-2 del receptor de glutamato NMDA (GRIN2B).

El gen que presenta un mayor grado de centralidad e intermediación es el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el cual participa en el desarrollo, la función y la supervivencia de las neuronas así como en la neuroplasticidad (Kowiański et al., 2017). La proteína que codifica se encuentra expresada en todo el sistema nervioso central (Binder y Scharfman, 2004), principalmente en las áreas corticales y en zonas de la médula espinal. Nuestros resultados indican que este gen desempeña un papel importante en la fisiopatología de trastornos mentales entre los que cabe destacar la esquizofrenia, trastorno bipolar y el trastorno depresivo. Efectivamente, este hecho ha sido recientemente demostrado en un estudio en el que se observó que los niveles tanto de BDNF precursor como del pro-péptido BDNF y BDNF maduro (proteínas que provienen de la conversión del gen BDNF una vez que ha sido codificada la proteína preproBDNF) eran inferiores con respecto a un grupo control sin trastornos mentales, tanto en áreas del cerebro como en tejidos periféricos (Yang et al.,

2017), a pesar de que aún se desconoce la función de ambas proteínas en dichas áreas de pacientes con trastornos psiquiátricos. Otro estudio reciente ha revelado que las personas que padecen esquizofrenia tienen niveles de BDNF en sangre inferiores a quienes no padecen esquizofrenia (Primavera et al., 2017), lo que confirma la importancia de la implicación del BDNF en la enfermedad.

Con respecto a la proopiomelancortina (POMC), existen diferentes estudios que relacionan a este polipéptido precursor hormonal con los trastornos psiquiátricos, en el que cabe destacar el péptido adrenocorticotropa (ACTH), producto de la escisión de POMC y encargado de controlar las alteraciones debidas al estrés tanto fisiológico como metabólico (Dey y Noguchi, 2017). Además, podemos encontrar que las mutaciones producidas en este gen están asociadas a enfermedades entre las que cabe destacar la obesidad y la insuficiencia suprarrenal (Krude et al., 2003). La obesidad es producida por una disminución en los niveles de POMC como consecuencia del consumo de una dieta hipercalórica, que contribuye a un aumento de la actividad microglial y esta, a su vez, a la secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF α), el cual provoca estrés oxidativo en las mitocondrias que forman parte de las neuronas productoras de POMC (Yi et al., 2017).

Otro gen diana, según nuestros resultados, codifica a la proteína translocadora TSPO situada en las mitocondrias, concretamente en su membrana externa, la cual se expresa tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos (Kuhnast et al., 2012). En condiciones fisiológicas normales, los niveles de TSPO son bajos en el sistema nervioso; sin embargo, van aumentando progresivamente en las zonas donde se ha producido un daño cerebral. Así pues, esta proteína ha sido utilizada como marcador en la alteración del funcionamiento de una o varias zonas del cerebro, mediante la utilización de la tomografía de emisión de positrones (Chen y Guilarte, 2008). Además, a través de dicho método se han logrado grandes avances en estos últimos años, no solo en enfermedades neurodegenerativas sino también en trastornos psiquiátricos (Dupont et al., 2017).

El gen neuropeptido Y (NPY) se encarga de codificar un neuropéptido que se expresa en el sistema nervioso central y está implicado en la respuesta al estrés, la ansiedad y el consumo de alcohol (Palmisiano y Pandey, 2017). Se ha descubierto que este gen actúa como neurotransmisor en numerosas funciones cerebrales, además de estar involucrado en el desarrollo de la esquizofrenia (Morosawa et al., 2017). Entre las enfermedades asociadas a NPY cabe destacar la neuropatía autonómica y el trastorno de adaptación, siendo este último característico de enfermedades mentales (Enguita y Ramos, 2013).

El gen CREB1 es un factor de transcripción cuya función es elemental para la expresión génica involucrada en la formación de la memoria (Rosales-Reynoso et al., 2016). Otra de las funciones asociadas a CREB1 es el papel que desempeña una de las proteínas reguladas por este gen, ya que se encarga de regular la transcripción del BDNF (Tao et al., 1998). Uno de los trastornos involucrados en la alteración CREB1 es el estrés, además de producir variaciones en la expresión del gen BDNF, y que conllevan la aparición de los efectos patológicos pertenecientes a trastornos relacionados, como es el caso de la depresión (Alboni et al., 2011).

Mutaciones erróneas del gen DRD2 pueden causar la aparición de distonía, caracterizada por un conjunto de trastornos del movimiento que conllevan a la contracción muscular involuntaria seguida de movimientos continuos (Phukan et al., 2011), además de estar asociada a comorbilidades psiquiátricas, entre las que cabe destacar la depresión, la ansiedad, la conducta obsesiva-compulsiva, los trastornos de personalidad así como el consumo excesivo de alcohol (Weissbach et al., 2013). También, se han estudiado varios polimorfismos genéticos en relación con la esquizofrenia, siendo el más llamativo el polimorfismo de DRD2, concretamente el Ins/Del-141 C, caracterizado por una inserción/delección de una base nitrogenada, la citosina, en el lugar de nucleótido -141, que conlleva a una alteración de la expresión génica *in vitro* y, por tanto, se considera un gen de riesgo para dicho trastorno (Cordeiro et al., 2009).

Por último, decir que el gen GRIN2B está implicado en el desarrollo normal de las neuronas y es fundamental para el proceso de aprendizaje y la memoria (Hu et al., 2016). Mutaciones en este gen están asociadas a trastornos epilépticos, del neurodesarrollo y psiquiátricos entre los que hay que destacar la esquizofrenia y trastorno bipolar (Mishra et al., 2016).

6. CONCLUSIÓN

En conclusión, mediante un abordaje de Biología de Sistemas y el análisis de redes llevado a cabo, hemos podido detectar los genes más importantes que tiene en común los trastornos neurológicos relacionados con la esquizofrenia y se ha podido examinar cuales son los procesos biológicos de los que forman parte. Los resultados obtenidos nos han permitido verificar que la mayor parte de los genes clave detectados están implicados en procesos neurológicos, y que su alteración suele deberse a mutaciones génicas, como se ha detectado en DRD2 y GRIN2B.

Por último, indicar que la realización de este TFG ha permitido integrar conocimientos de diferentes asignaturas cursadas durante el Grado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alboni, S., Tascedda, F., Corsini, D., Benatti, C., Caggia, F., Capone G, Barden, N., Blom, JM., & Brunello, N. 2011. Stress induces altered CRE/CREB pathway activity and BDNF expression in the hippocampus of glucocorticoid receptor-impaired mice. *Neuropharmacology*. 60, 1337-1346.
- Altmäe, S., Esteban, F. J., Stavreus-Evers, A., Simón, C., Giudice, L., Lessey, B. A., Salumets, A. 2014. Guidelines for the design, analysis and interpretation of “omics” data: focus on human endometrium. *Human Reproduction Update*. 20, 12-28.
- Bener, A., Abou-Saleh, M. T., Dafeeah, E. E., & Bhugra, D. 2015. The Prevalence and Burden of Psychiatric Disorders in Primary Health Care Visits in Qatar: Too Little Time?. *Journal of Family Medicine and Primary Care*. 4, 89-95.
- Binder, D. K., & Scharfman, H. E. 2004. Brain-derived Neurotrophic Factor. *Growth Factors*. 22, 123-131.
- Black, P. H. 2006. The Inflammatory Consequences of Psychologic Stress. Relationship to Insulin Resistance, Obesity, Atherosclerosis and Diabetes Mellitus, Type II. *Medical Hypotheses*. 67, 879-891.
- Buckley, P. F., Miller, B. J., Lehrer, D. S., & Castle, D. J. 2009. Psychiatric Comorbidities and Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*. 35, 383-402.
- Budde, M., Forstner, A. J., Adorjan K., Schaupp, S. K., Nöthen, M. M., & Schulze, T. G. 2017. Genetics of bipolar disorder. *Nervenarzt* (in-press).
- Carney, C. P., Jones, L., & Woolson, R. F. 2006. Medical Comorbidity in Women and Men with Schizophrenia: A Population-Based Controlled Study. *Journal of General Internal Medicine*. 21, 1133-1137.
- Chen, M. K., & Guilarte, T. R. 2008. Translocator Protein 18kDA (TSPO): Molecular Sensor of Brain Injury & Repair. *Pharmacology Therapeutics*. 118, 1-17.
- Chin, C.H., Chen, S.H., Wu, H.H., Ho, C.W., Ko, M.T., & Lin, C.Y. 2014. cytoHubba: Identifying Hub Objects and Sub-Networks from Complex Interactome. *BMC Systems Biology*. 8, Suppl 4:S11.

- Cilibrasi, R., & Vitanyi, P. 2005. Clustering by compression. *IEE Transaction on Information Theory*. 51,1523-1545.
- Cordeiro, Q., Siqueira-Roberto, J., Zung, S., & Vallada, H. 2009. Association between the DRD2-141C Insertion/Deletion polymorphism and schizophrenia. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 67, 191-194.
- Dey, S., & Noguchi, C. 2017. Erythropoietin and Hypothalamic–Pituitary Axis. *Vitamins and Hormones*. 105, 101-120.
- Diez, D., Agust, A., & Wheelock, C. E. 2014. Network analysis in the investigation of chronic respiratory diseases: From basics to application. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 190, 981-988.
- Druss, B. G., von Esenwein, S. A., Compton, M. T., Zhao, L., & Leslie, D. L. 2011. Budget Impact and Sustainability of Medical Care Management for Persons with Serious Mental Illnesses. *The American Journal of Psychiatry*. 168, 1171-1178.
- Dupont, A.-C., Largeau, B., Santiago Ribeiro, M., Guilloteau, D., Tronel, C., & Arlicot, N. 2017. Translocator Protein-1 8 kDa (TSPO) Positron Emission Tomography (PET) Imaging and Its Clinical Impact in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 18, 785.
- Eaton, W.W, Martins, S.S, Nestadt, G., Bienvenu, O., Clarke, D., & Alexandre, P. 2008. The Burden of Mental Disorders. *Epidemiologic Reviews*. 30, 1-14.
- Egea, R. R., Puchalt, N. G., Escrivá, M. M., & Varghese, A. C. 2014. OMICS: Current and Future Perspectives in Reproductive Medicine and Technology *Journal of Human Reproductive Sciences*. 7, 73-92.
- Enault, F., Suhre, K., Poirot, O., Abergel, C., & Claverie, J.M .2004. Phydbac2: improved inference of gene function using interactive phylogenomic profiling and chromosomal location analysis. *Nucleic Acids Research*. 32, 336-339.
- Enguita, R. C., & Ramos, R. 2013. Trastorno de adaptación: análisis de la Incapacidad Laboral por contingencias comunes en Ibermutuamur, Mutua de Accidentes de Trabajo y Enfermedades Profesionales de la Seguridad Social. *Medicina y Seguridad del Trabajo*. 59, 322-344.

- Feinstein A. 1970. Pre-Therapeutic Classification of Co-Morbidity in Chronic Disease. *Journal of Chronic Diseases*. 23, 455-468.
- Freedman, R. 2003. Schizophrenia. *The New England Journal of Medicine*. 349, 1738-1749.
- Freeman, L. C., Roeder, D., & Mulholland, R. R. 1979. Centrality in social networks: II. Experimental results. *Social Networks*. 2, 119-141.
- Gejman, P. V., Sanders, A. R., & Duan, J. 2010. The Role of Genetics in the Etiology of schizophrenia. *The Psychiatric Clinics of North America*. 33, 35-66.
- Goh, K. I., Cusick, M.E, Valle, D., Childs, B., Vidal, M., & Barabási, A.L. 2007. The human disease network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, 8685-8690.
- Hu, C., Chen, W., Myers, S., Yuan, H. and Traynelis, S. 2016. Human GRIN2B variants in neurodevelopmental disorders. *Journal of Pharmacological Sciences*. 132, 115-121.
- Jeong, H., Tombor, B., Albert, R., Oltvai, Z. N., & Barabasi, A.-L. 2000. The large-scale organization of metabolic networks. *Nature*. 407, 651-654.
- Karlebach, G., & Shamir, R. 2008. Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9, 770-780.
- Kerr, M. K., & Churchill, G. A. 2001. Bootstrapping cluster analysis: assessing the reliability of conclusions from microarray experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98, 8961-8965.
- Kiecolt-Glaser, J. & Glaser, R. 2002. Depression and immune function. *Journal of Psychosomatic Research*. 53, 873-876.
- Kowiański, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waśkow, M., Steliga, A., & Moryś, J. 2017. BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and Molecular Neurobiology* (in-press).

- Krieger, C. J., Zhang, P., Mueller, L. A., Wang, A., Paley, S., Arnaud, M., Pick, J., Rhee, S. Y & Karp, P. D. 2004. MetaCyc: una base de datos de multiorganismos de Vías metabólicas y enzimas. *Nucleic Acids Res.* 32, 438-442.
- Krude, H., Biebermann, H., Schnabel, D., Tansek, M. Z., Theunissen, P., Mullis, P. E., & Grüters, A. 2003. Obesity Due to Proopiomelanocortin Deficiency: Three New Cases and Treatment Trials with Thyroid Hormone and ACTH4-10. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 88, 4633-4640.
- Kuhnast, B., Damont, A., Hinnen, F., Catarina, T., Demphel, S., Le Helleix, S., Coulon, C., Goutal, S., Gervais, P., & Dollé, F. 2012. [18F]DPA-714, [18F] PBR111 and [18F] FEDAA1106-Selective radioligands for imaging TSPO 18kDa with PET: Automated radiosynthesis on a TRACERLab FX-FN synthesizer and quality controls. *Applied Radiation and Isotopes.* 70, 489-497.
- Lasser, K., Boyd, J. W., Woolhandler, S., Himmelstein, D. U., McCormick, D., & Bor, D. H. 2000. Smoking and Mental Illness. *Jama.* 284, 2606-2610.
- López, B., & Ibarra, M. 2013. Esquizofrenia. *Revista de Actualización Clínica.* 35, 1804-1809.
- Mandler, G. 2011. A history of modern experimental psychology. Cambridge, Mass: MIT Press.
- Mishra, N., Kouzmitcheva, E., Orsino, A., & Minassian, B. A. 2016. Chromosome 12p Deletion Spanning the GRIN2B Gene Presenting With a Neurodevelopmental Phenotype: A Case Report and Review of Literature. *Child Neurology Open.* 3:2329048X16629980 (eCollection 2016).
- Mitra, K., Carvunis, A.R., Ramesh, S.K., & Ideker, T. 2013. Integrative Approaches for Finding Modular Structure in Biological Networks. *Nature reviews. Genetics.* 14, 719-732.
- Morosawa ,S., Iritani S., Fujishiro, H., Sekiguchi, H.,Torii ,Y., Habuchi , C., Kuroda, K., Kaibuchi, K., & Ozaki, N. 2017. Neuropeptide Y neuronal network dysfunction in the frontal lobe of a genetic mouse model of schizophrenia. *Neuropeptides.* 62, 27-35.

- Opsahl, T. 2010. Node Centrality in Weighted Networks: Generalizing Degree and Shortest Paths. *Social Networks*. 32, 245-251.
- Palmisano, M., & Pandey, S. C. 2017. Epigenetic mechanisms of alcoholism and stress-related disorders. *Alcohol*. 60, 7-18.
- Phukan, J., Albanese, A., Gasser, T., & Warner, T. 2011. Primary dystonia and dystonia-plus syndromes: Clinical characteristics, diagnosis, and pathogenesis. *The Lancet Neurology*. 10, 1074-1085.
- Primavera, D., Manchia, M., Deriu, L., Tusconi, M., Collu, R., Scherma, M., & Carpiello, B. 2017. Longitudinal assessment of brain-derived neurotrophic factor in Sardinian psychotic patients (LABSP): a protocol for a prospective observational study. *BMJ Open*. 7, e014938.
- Rosales-Reynoso, M. A., Ochoa-Hernández, A. B., Juárez-Vázquez, C. I., & Barros-Núñez, P. 2016. Mecanismos epigenéticos en el desarrollo de la memoria y su implicación en algunas enfermedades neurológicas. *Neurologia*. 31, 628-638.
- Salwinski, L., Miller, C. S., Smith, A. J., Pettit, F. K., Bowie, J. U., & Eisenberg, D. 2004. The Database of Interacting Proteins: 2004 update. *Nucleic Acids Research*. 32, D449-D451.
- Schuckit, M. A., Smith, T. L., & Chacko, Y. 2006. Evaluation of a depression-related model of alcohol problems in 430 probands from the San Diego prospective study. *Drug and Alcohol Dependence*. 82, 194-203.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., & Ideker, T. 2003. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research*. 13, 2498-2504.
- Silvestri, E., Lombardi, A., de Lange, P., Glinni, D., Senese, R., Cioffi, F., & Moreno, M. 2011. Studies of Complex Biological Systems with Applications to Molecular Medicine: The Need to Integrate Transcriptomic and Proteomic Approaches. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011, 1-19.
- Sloane, R. B., Payne, R. W., & Inglis, J. 1963. Clinical Investigation in Psychiatry. *Canadian Medical Association Journal*. 88, 75-79.

- Spirin, V., & Mirny, L. A. 2003. Protein complexes and functional modules in molecular networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100, 12123-12128.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Von Mering, C. 2015. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*. 43, D447-D452.
- Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D. B., Shaywitz, A. J., & Greenberg, M. E. 1998. Ca^{2+} Influx Regulates BDNF Transcription by a CREB Family Transcription Factor-Dependent Mechanism. *Neuron*. 20, 709-726.
- Vera, M., Biswas, J., Senecal, A., Singer, R. H., & Park, H. Y. 2016. Single-Cell and Single-Molecule Analysis of Gene Expression Regulation. *Annual Review of Genetics*. 50, 267-291.
- Von Mering, C., Jensen, L. J., Snel, B., Hooper, S. D., Krupp, M., Foglierini, M., & Bork, P. 2005. STRING: known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Research*. 33, 433-437.
- Wall, D. P., Esteban, F. J., Deluca, T. F., Huyck, M., Monaghan, T., Velez de Mendizabal, N., Goñí, J., Kohane, I. S. 2009. Comparative analysis of neurological disorders focuses genomewide search for autism genes. *Genomics*. 93, 120-129.
- Wang, D., & Bodovitz, S. 2010. Single cell analysis: the new frontier in “Omics.” *Trends in Biotechnology*. 28, 281-290.
- Weissbach, A., Kasten, M., Grünewald, A., Brüggemann, N., Trillenberg, P., Klein, C., & Hagenah, J. 2013. Prominent psychiatric comorbidity in the dominantly inherited movement disorder myoclonus-dystonia. *Parkinsonism and Related Disorders*. 19, 422-425.
- Yang, B., Ren, Q., Zhang, J., Chen, Q., & Hashimoto, K. 2017. Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide and their precursor proBDNF in brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain–liver axis. *Translational Psychiatry*. 7, e1128.

- Yi, C., Walter, M., Gao, Y., Pitra, S., Legutko, B., Kälin, S., & Tschöp, M. H. 2017. TNF α drives mitochondrial stress in POMC neurons in obesity. *Nature Communications*. 8, 15143.
- Yu, W., Clyne, M., Khoury, M. J., & Gwinn, M. 2009. Phenopedia and genopedia: Disease-centered and gene-centered views of the evolving knowledge of human genetic associations. *Bioinformatics*. 26, 145-146.