



**Fundació**  
La Marató de TV3

22è SIMPOSIUM  
Diabetis i Obesitat



## **ESTUDI DE NOVES DIANES MOLECULARS EN MODELS PRECLÍNICS D'OBESITAT**

**Elena Martín Garcia**

Laboratori de Neurofarmacologia - Universitat Pompeu Fabra

**Mara Dierssen Sotos**

CRG Centre de Regulació Genòmica

**Emmanuel Valjent**

Institut de Génomique Fonctionnelle INSERM – Montpellier

## 1. Resum

El consum d'aliments altament apetitosos i altament calòrics podria produir una funcionalitat alterada de les neurones espinoses mitjanes estriatopallidals (MSN) del receptor de dopamina tipus 2 (D2), cosa que porta al desenvolupament de l'obesitat a través d'un mecanisme que involucra la quinasa 1A d'especificitat dual regulada per la fosforilació de la tirosina-Y (en anglès, Dyrk1A). L'objectiu general d'aquesta proposta d'investigació va ser avaluar l'impacte del consum excessiu d'aliments altament apetitosos i calòrics sobre les modificacions de l'activitat de les MSN estriatopallidals per caracteritzar els mecanismes cel·lulars i moleculars subjacents a les alteracions. Es va parlar un interès especial en el paper de Dyrk1A en aquests fenotips. Per tant, es va dur a terme la determinació del perfil estriatopallidal específic dels ARNm seguint un model d'obesitat induïda per menjar en excés i una avaluació de la implicació funcional dels gens candidats identificats. Es va generar un nou model de ratolí en l'àmbit preclínic per a l'estudi de l'obesitat dirigida a les MSN, els ratolins D2-RiboTag. Es van estudiar les característiques patogèniques de l'obesitat en aquests ratolins emprant un model conductual de trastorn alimentari, és a dir, un comportament de menjar en excés per exposició *ad libitum* a aliments amb alt contingut calòric i apetitós. Els ARNm traduïts activament en neurones que expressen receptors D2 dels estriats dorsal i ventral es van estudiar per RNAseq en aquest model de comportament. Els ARNm modificats de manera significativa es van identificar mitjançant anàlisi bioinformàtica per descobrir noves dianes terapèutiques potencials per al tractament de l'obesitat. A continuació, es va dur a terme una validació posterior dels gens candidats per determinar si eren funcionalment rellevants. Finalment, es va dur a terme una validació de les noves dianes terapèutiques potencials per al tractament de l'obesitat.

## 2. Resultats

En aquest projecte, vam estudiar els mecanismes neurobiològics implicats en la pèrdua de control sobre la ingesta que condueix a l'obesitat. Vam obtenir fenotips relacionats amb el desenvolupament de l'obesitat i la pèrdua de control sobre la ingesta d'aliments. Vam desenvolupar models animals d'obesitat en la soca consanguínia de ratolins C57Bl6/J. Aquest objectiu ens va permetre tenir sota control la variable genètica i estudiar en detall dianes moleculars i genètiques específiques. En aquests

models, vam exposar els ratolins a aliments molt apetitosos amb diferents règims d'accés als aliments durant un període llarg de temps. Vam observar alteracions en els paràmetres metabòlics perifèrics i a escala molecular i cel·lular en el cervell que van servir per validar el model de ratolins obesos. Els nostres resultats van suggerir que el gen *Dyrk1A* pot ser essencial com a modulador de la conducta alimentària després de consumir aliments saborosos. Havíem analitzat el desenvolupament de l'obesitat i la conducta alimentària induïda per la ingesta de dietes altes en calories en diferents models murins de *Dyrk1A*, un model que sobreexpressa *Dyrk1A* i un model amb expressió reduïda de *Dyrk1A* en neurones que expressen el receptor de dopamina D2. Hem caracteritzat un model de ratolí amb reducció parcial de l'expressió de *Dyrk1A*, el model heterozigot *Dyrk1A*, cosa que demostra la participació crucial d'aquest gen en la conducta alimentària. A més, els perfils de transcripció i traducció de cèl·lules positives al receptor D2, avaluats per ARNseq d'alt rendiment amb ARNm units a ribosomes marcats, ens van permetre identificar 2.928 gens que codifiquen proteïnes enriquides significativament en el nucli accumbens (NAC). Entre ells, el gen *Wfs1* va ser un dels més significatius estadísticament en l'anàlisi derivada de l'estudi amb ARNseq.

A més, vam investigar, mitjançant anàlisi transcriptòmica, les alteracions funcionals que es van produir específicament en les subpoblacions neuronals de neurones positives per D2 durant el desenvolupament d'un comportament de tipus compulsiu. Per a això, vam utilitzar els ratolins D2-RiboTag, una línia innovadora de ratolins transgènics que permet l'expressió selectiva d'hemaglutinina (HA) en cèl·lules que contenen el receptor D2. Els gens seleccionats per a la validació funcional farmacològica van ser *Adora2a* (receptor A2a), colecistoquinina (*CCK*) i *DAGL $\alpha$* . La comparació dels perfils transcriptòmics de les cèl·lules positives per al receptor D2 en el NAc entre els grups de dieta estàndard amb afartament, lliure elecció i control van revelar una regulació positiva dels gens *Adora2a*, *CCK* i *DAGL $\alpha$*  en ratolins del grup amb afartaments en comparació amb els de lliure elecció i de dieta estàndard. La validació farmacològica dels gens candidats seleccionats es va dur a terme mitjançant l'administració local de l'agonista de *CCK* CCK-8S (vehicle, 1, 2 o 5 ng/costat), l'inhibidor de *DAGL $\alpha$*  O-7460 (vehicle, 1, 2 o 10 ng/costat) i l'agonista d'A2a CGS 21680 (vehicle, 1, 2 o 4 ng/costat) bilateralment en la NAc de ratolins exposats al protocol d'afartament o a la dieta estàndard. Pel que fa a l'administració de l'agonista de *CCK* CCK-8S, els resultats van mostrar que l'activació del receptor *CCK* no va modificar ni la ingesta d'aliments ni l'activitat locomotora. Els resultats de la validació

farmacològica amb l'inhibidor de *DAGL $\alpha$*  O-7460 (vehicle, 1, 2 o 10 ng/costat) van mostrar que només la dosi més alta de 10 ng/costat va ser capaç de fer disminuir la ingesta de xocolata en el grup d'afartaments després d'1,5 hores d'exposició a la dieta sense afectar l'activitat locomotora.

Finalment, la validació farmacològica es va dur a terme injectant l'agonista del receptor *A2a* CGS 21680 (vehicle, 1, 2 o 4 ng/costat) bilateralment en el NAc de ratolins exposats al protocol d'afartaments o a l'administració de dieta estàndard i també es va dur a terme l'activitat locomotora. Els resultats van mostrar que totes les dosis provades van produir una tendència o una disminució significativa de la ingesta de xocolata 1,5 hores, 3 hores i 24 hores després de l'exposició a la dieta d'afartaments en comparació amb els nivells basals. Amb la dosi més alta de 4 ng/costat, l'activitat locomotora també va disminuir durant els primers 60 minuts després de l'administració intracerebral en el NAc.

En resum, l'administració farmacològica intraestructural en el NAc de l'agonista del receptor *A2a* i l'inhibidor de l'enzim *DAGL $\alpha$*  pot regular el comportament de tipus compulsiu mitjançant la reducció de la ingesta d'aliments, específicament els aliments palatables d'alta densitat energètica. Per a la validació funcional mitjançant un enfocament genètic, es va seleccionar el gen *Adora2a*. Es va utilitzar un enfocament de vector viral per explorar en profunditat el paper regulador d'aquest gen candidat en les neurones que expressen el receptor *D2* en el NAc en el desenvolupament del comportament de tipus compulsiu. Estudis previs han demostrat que l'activació del receptor *A2a* i el bloqueig del receptor de tipus *D2* contraresten la recaiguda de la cocaïna i els aliments. Es proposa que la senyalització d'adenosina i dopamina intervinguda pel receptor *A2a* i el receptor *D2* interactua antagonísticament a les neurones estriatopallidals gabaèrgiques per regular la cocaïna i el comportament de recerca d'aliments. Tenint en compte que els nostres resultats van demostrar que l'activació farmacològica intraestructural del receptor *A2a* va disminuir el comportament compulsiu per la reducció de la ingesta d'aliments altament calòrics i apetitosos, vam seleccionar aquest gen candidat per dur a terme una validació genètica funcional utilitzant un vector viral. Específicament, vam provar si la sobreexpressió selectiva d'*Adora2a* a les projeccions de NAc al pàl·lid ventral central (*core-ventral pallidum*, *core-VP*) induïa una disminució de la ingesta de xocolata i una menor recerca de l'autoadministració d'aliments apetitosos. Usant aquestes condicions

experimentals, el nostre objectiu era imitar la regulació positiva del gen *Adora2a* observat en ratolins que menjaven compulsivament d'acord amb els resultats d'ARN-seq. Sospitem que aquesta regulació a l'alça pot produir-se per reduir la ingesta excessiva d'aliments i pot representar un mecanisme de protecció. Per a la sobreexpressió específica d'*Adora2a* en projeccions NAC core-VP, utilitzem un enfocament de vector viral dual amb un AAV-*Adora2a* dependent de Cre (AAV-hSyn-DIO-*Adora2a*-mCherry) i AAV-control (AAV-Syn1-DIO-mCherry), vector viral injectat en el NAc, i un AAV-retrògrad-Cre (AAV-pmSyn-GFP-Cre) injectat al pàl·lid ventral (VP). Primer vam verificar el lloc d'injecció de l'AAV mitjançant visualització d'auto fluorescència d'mCherry i Cre recombinasa. Per provar l'efecte de la sobreexpressió d'*Adora2a* en la ingesta i la recerca d'aliments amb xocolata, es va aplicar un protocol experimental de 20 setmanes que combinava afartaments i comportament operant.

Els resultats van mostrar que els ratolins que van sobreexpressar el gen *Adora2a* a les projeccions del nucli NAc al VP i que van ser exposats a la dieta compulsiva van reduir el consum de xocolata en els cicles d'afartament en comparació amb els nivells basals i en comparació amb el grup de control. Aquest resultat suggereix que la sobreexpressió del gen *Adora2a* va ser un factor protector relacionat amb el desenvolupament de l'obesitat, com es va predir. A continuació, la motivació pel menjar amb gust de xocolata es va reduir en ratolins que sobreexpressaven el gen *Adora2a* al circuit que va des del NAc al pàl·lid central independentment de la dieta. No es van obtenir diferències en la persistència de la resposta o la compulsió segons la injecció d'AAV o la dieta d'exposició. També es va mesurar el comportament d'impulsivitat, i els ratolins que sobreexpressaven *Adora2a* exposats a una dieta estàndard van mostrar un comportament d'impulsivitat reduït. En la prova de flexibilitat cognitiva es van invertir les palanques actives i inactives. Els resultats van mostrar que els ratolins del grup d'afartaments eren menys flexibles, i hi va haver una lleugera tendència dels ratolins amb una dieta d'afartaments i injecció d'AAV-*Adora2a* a ser més flexibles que el grup de control.

Els tres criteris d'addicció al menjar (motivació, persistència en la resposta i compulsió) es van utilitzar per classificar els ratolins com a vulnerables o resistent per desenvolupar un comportament de tipus compulsiu i pèrdua de control sobre la ingesta d'aliments. D'acord amb les proves de comportament utilitzades per mesurar el comportament similar a l'addicció al menjar, els ratolins es van classificar com a

animals vulnerables o no vulnerables segons la quantitat de criteris positius que havien complert. Un animal es va considerar positiu per a un criteri similar a l'addicció quan la puntuació de la prova de comportament específica estava superava el percentil 75 de la distribució normal del grup de control de xocolata. Els ratolins que van complir dos o tres criteris similars a l'addicció es van considerar animals vulnerables, i els ratolins amb cap o amb un criteri similar a l'addicció es van considerar animals no vulnerables. El percentatge de ratolins classificats com a vulnerables va ser del 0 % en els ratolins que sobreexpressen *Adora2a* del grup de dieta estàndard. Aquest percentatge va ser molt més baix que el 20 % esperat de ratolins vulnerables que es troben en el grup de control estàndard. Per contra, en el grup de ratolins compulsius, la sobreexpressió d'*Adora2a* no va reduir el percentatge de ratolins que complien els criteris de vulnerabilitat. Aquest percentatge no es va incrementar amb la dieta compulsiva.

En conclusió, els resultats van validar les troballes anteriors amb validació farmacològica i van assenyalar un paper protector de la sobreexpressió d'*Adora2a* a la NAc en les neurones que projecten al pà·lid ventral per al comportament de tipus compulsiu que condueix al desenvolupament de l'obesitat. Els nostres resultats van proporcionar nous enfocaments mecanicistes que podrien ser valorats per establir noves perspectives terapèutiques per tractar i prevenir el sobrepès i l'obesitat en l'àmbit clínic. A més, les nostres troballes aporten novetats sobre les mesures de prevenció en haver identificat els mecanismes neuronals necessaris per enfortir el fenotip resilient que potencialment pot prevenir el desenvolupament de l'obesitat.

### **3. Rellevància i possibles implicacions futures**

Va ser rellevant el descobriment del paper crucial de la via NAc i core-VP modulada per *Adora2a* com un mecanisme crític per motivar la recerca d'aliments saborosos i el consum excessiu de xocolata. La sobreexpressió del gen *Adora2a* en aquesta via té un paper decisiu en la prevenció d'aquests fenotips. Així, els nostres resultats van proporcionar nous enfocaments mecanicistes que podrien ser valorats per establir noves perspectives terapèutiques per tractar i prevenir el sobrepès i l'obesitat en l'àmbit clínic. A més, les nostres troballes aporten novetats sobre les mesures de prevenció en haver identificat els mecanismes neuronals necessaris per enfortir el fenotip resilient que potencialment pot prevenir el desenvolupament de l'obesitat. Els

nostres resultats també suggereixen que el gen *Dyrk1A* pot ser essencial com a modulador de la conducta alimentària després de consumir aliments saborosos. L'anàlisi dels perfils de transcripció i traducció de cèl·lules positives per al receptor D2, avaluats per ARNseq d'alt rendiment amb ARNm units a ribosomes marcats, ens va permetre identificar 2.928 gens que codifiquen proteïnes significativament enriquides al NAc. Entre aquests gens, *Wfs1* va ser un dels més significatius estadísticament de l'anàlisi d'ARNseq. Hem dilucidat el paper crucial de la via que comprèn el nucli NAc i el pàl·lid ventral modulada pel gen *Adora2a* com un mecanisme motivacional crític per a la recerca d'aliments altament saborosos i el consum incontrolat de xocolata. La sobreexpressió del gen *Adora2a* en aquesta via té un paper crucial en la prevenció d'aquests fenotips.

#### 4. Bibliografia científica generada

Alemany-González M, Gener T, Nebot P, Vilademunt M, Dierssen M, Puig MV. *Prefrontal-hippocampal functional connectivity encodes recognition memory and is impaired in intellectual disability.*

Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 May 26; 117(21): 11788-11798.

Azua IR, Martín-García E, Domingo-Rodríguez L, Rey AA, Cuadrado DP. *Cannabinoid CB1 receptor in dorsal telencephalic glutamatergic neurons drives overconsumption of palatable food and obesity.*

Neuropsychopharmacology. 2021;46, 982-991.

Burokas A, Martín-García E, Espinosa-Carrasco J, Erb I, McDonald J, Notredame C, Dierssen M, Maldonado R.

*Extinction and reinstatement of an operant responding maintained by food in different models of obesity.*

Addict Biol. 2018;23(2):544-555.

Busquets-Garcia A, Gomis-González M, Salgado-Mendialduá V, Galera-López L, Puighermanal E, Martín-García E, Maldonado R, Ozaita A.

*Hippocampal Protein Kinase C Signaling Mediates the Short-Term Memory Impairment Induced by Delta9-Tetrahydrocannabinol.*

Neuropsychopharmacology. 2018;43(5):1021-1031.

Cabana-Domínguez J, Martín-García E, Gallego A, Maldonado R, Fernández-Castillo N, Cormand B.

*Reduced cue-induced reinstatement of cocaine-seeking behavior in Plcb1+/- mice.*

Transl. Psychiatry. 2021 (abans de la impressió).

De Toma I, Ortega M, Catuara-Solarz S, Sierra C, Sabidó E, Dierssen M.

*Re-establishment of the epigenetic state and rescue of kinome deregulation in Ts65Dn mice upon treatment with green tea extract and environmental enrichment.*

Sci Rep. 2020; 10: 16023.

Dierssen M, Fructuoso M, Martínez de Lagrán M, Perluigi M, Barone E.

Down Syndrome Is a Metabolic Disease: Altered Insulin Signaling Mediates Peripheral and Brain Dysfunctions.

Front Neurosci. 2020; 14: 670.

Domingo-Rodríguez L, Ruiz de Azua I, Domínguez E, Senabre E, Serra I, Kummer S, Navandar M, Baddenhausen S, Hofmann C, Andero R, Gerber S, Navarrete M, Dierssen M, Lutz B, Martín-García E, Maldonado R.

*A specific prelimbic-nucleus accumbens pathway controls resilience versus vulnerability to food addiction.*

Nat Commun. 2020;11(1).

Espinosa-Carrasco J, Burokas A, Fructuoso M, Erb I, Martín-García E, Gutiérrez-Martos M, Notredame C, Maldonado R, Dierssen M.

*Time-course and dynamics of obesity-related behavioral changes induced by energy-dense foods in mice.*

Addict Biol. 2018;23(2):531-543.

Espinosa-Carrasco J, Erb I, Hermoso Pulido T, Ponomarenko J, Dierssen M, Notredame C.

Pergola: Boosting Visualization and Analysis of Longitudinal Data by Unlocking Genomic Analysis Tools.

iScience. 2018 Nov 30;9:244-257.



Fructuoso M, Espinosa-Carrasco J, Erb I, Notredame C, Dierssen M.

*Protocol for Measuring Compulsive-like Feeding Behavior in Mice.*

Bio Protoc. 2019 Jul 20;9(14):e3308.

García-Blanco A, Domingo-Rodríguez L, Cabana-Domínguez J, Fernández-Castillo N, Pineda-Cirera L, Mayneris-Perxachs J, Burokas A, Espinosa-Carrasco J, Arboleya S, Latorre J, Stanton, C, Cormand B, Fernández-Real JM, Martín-García E, Maldonado R. *MicroRNAs and gut microbiota signatures for vulnerability to food addiction.*

Science. 2021. Enviat per a publicació.

Gutiérrez-Martos M, Girard B, Mendonça-Netto S, Perroy J, Valjent E, Maldonado R, Martin M.

*Cafeteria diet induces neuroplastic modifications in the nucleus accumbens mediated by microglia activation.*

Addict Biol. 2018;23(2):735-749.

Maldonado R, Cabañero D, Martín-García E.

*The endocannabinoid system in modulating fear, anxiety, and stress.*

Dialogues Clin. Neurosci. 2020;22, 135.

Maldonado R, Calve P, García-Blanco A, Domingo-Rodríguez L, Senabre E, Martín-García E.

*Genomics and epigenomics of addiction.*

Am. J. Med. Genet. 2021; <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32843>.

Maldonado R, Calvé P, García-Blanco A, Domingo-Rodríguez L, Senabre E, Martín-García E.

*Vulnerability to addiction.*

Neuropharmacology. 2021;186, 108466.

Martín-García E, Domingo-Rodríguez L, Maldonado R.

*An operant conditioning model combined with a viral vector approach to study the neurobiology of food addiction in mice.*

Bio-protocol. 2020;10(19).

Martínez de Lagran M, Martín E, Valjent E, Dierssen M.  
*Dyrk1A, A Down syndrome candidate gene, regulates obesity development acting over dopaminergic D2 receptors expressing neurons.*  
European Neuropsychopharmacol. 2020; Nov 40: P.688, S392-S393.

Navandar M, Martín-García E, Maldonado R, Lutz B, Gerber S, Ruiz de Azua I.  
*Transcriptional signatures in prefrontal cortex confer vulnerability versus resilience to food and cocaine addiction-like behavior.*  
Sci. Rep. 2021 (abans de la impressió).

Navarro-Romero A, Vázquez-Oliver A, Gomis-González M, Garzón-Montesinos C, Falcón-Moya R, Pastor A, Martín-García E, Pizarro N, Busquets-Garcia A, Revest JM, Piazza PV, Bosch F, Dierssen M, de la Torre R, Rodríguez-Moreno A, Maldonado R, Ozaita A.  
*Cannabinoid type-1 receptor blockade restores neurological phenotypes in two models for Down syndrome.*  
Neurobiol Dis. 2019 May;125:92-106. doi: 10.1016/j.nbd.2019.01.014. EPUB 25 de gener del 2019.

Puighermanal E, Castell L, Esteve-Codina A, Melser S, Kaganovsky K, Zussy C, Boubaker-Vitre J, Gut M, Rialle S, Kellendonk C, Sanz E, Quintana A, Marsicano G, Martin M, Rubinstein M, Girault JA, Ding JB, Valjent E.  
*Functional and molecular heterogeneity of D2R neurons along dorsal ventral axis in the striatum.*  
Nat Commun. 2020;11(1):1957.