



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Modificaciones epigenéticas asociadas a los efectos de la morfina en el SNC del pez cebra

Ada Jiménez González

Salamanca 2016



800 AÑOS
VNiVERSIDAD
D SALAMANCA
1218 ~ 2018



**INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN**



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Modificaciones epigenéticas asociadas a los efectos de la morfina en el SNC del pez cebra

Memoria presentada por

Ada Jiménez González

**Para optar al título de Doctor por la
Universidad de Salamanca**

Salamanca 2016



**DÑA. RAQUEL E. RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DEL
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.**

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Modificaciones epigenéticas asociadas a los efectos de la morfina en el SNC del pez cebra**”, que presenta la doctorando Dña. Ada Jiménez González, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, de la Universidad de Salamanca, y reúne a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y optar al Título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expide el presente certificado.

Salamanca a 25 de Julio de 2016.

Fdo. Prof. Raquel E. Rodríguez Rodríguez

A mis padres: Mara y José

Agradecimientos

Como sucede en todo relato, el desarrollo de una historia no sólo consiste en lo que les ocurre a los protagonistas sino que muchas otras piezas intervienen para enriquecer su trama. En esta historia de mi Tesis, no podía ser menos. Este trabajo ha sido fruto de las aportaciones, no siempre científicas, de muchas personas. Por ello quiero agradecer a todos el haber formado parte de él sin, a veces, siquiera ser conscientes.

A Mara y José, mis padres. Estar en este mundo sería motivo más que suficiente para agradecer. Pero es más bien el cómo he llegado hasta este momento lo que me empuja a ponerles por delante en este texto. Es difícil explicar su labor, porque es difícil entender lo que hacen los padres, sólo quiero decir: ahora lo comprendo todo. No son las personas que otros creen conocer lo que inspiran estas palabras, sino ellos en su totalidad, con sus aciertos y sus fallos, siendo siempre el mejor ejemplo que conozco de vidas plenamente vividas. Gracias.

A Guaci, porque, aunque discutimos como hermanas, siempre ha ejercido de mi segunda madre. Por mucho que te diga que no lo necesito, tú sigues cuidándome que yo haré lo propio contigo. A Johnny, una gran incorporación a nuestra familia. No puedo pensar en otra persona que pudiera entendernos mejor y ayudarnos tanto. A Sophia y Sidney. Los renacuajos que llegaron en el momento preciso, alegrando nuestra existencia con la suya y continúan haciéndolo día a día.

A mis tíos y primos que nunca han dejado de querernos y que han estado para todo en todo momento.

A Milagrosa. Al parecer tengo varias segundas madres pero es que lo que has hecho por mi (nosotras) no lo haría nadie más.

A Jordan, Clara, Sonia, Rayco y Nira. Han sabido hacerme ver que van a estar ahí siempre por mucho agua que haya por medio. Si hiciera falta, volvería a caminar diez minutitos más con ustedes mil veces.

A Moi, Adri y Tony porque han sabido entender por qué me dedico a esto y su apoyo nunca faltará.

A las pisíticas: Marta, Virginia y Alba. Ustedes me enseñaron que dejar la pequeña habitación para compartir el espacio con alguien más, no era tan horrible como pensaba. Nunca necesité ese cuaderno.

A la Dra. Verónica González Núñez por su aportación en los primeros meses de mi estancia en el laboratorio.

A Fernando, simplemente por venir y escuchar o querer ser escuchado. Por las largas charlas científicas (y demás) y los buenos ratos.

A los otros amigos que no esperaba y que la ciencia me ha aportado: Seila, Myriam, Sara, Rafa, Dani, Rodri.

A los compañeros y profesores del Instituto de neurociencias. En especial, quiero agradecer al Dr. Javier Herrero Turrión su entusiasmo por nuestro trabajo y su ayuda necesaria para poder llevarlo a cabo.

Al Dr. Juan Carlos Arévalo, por todas las aportaciones científicas hechas a lo largo de estos años. Además, al Profesor Manuel Sánchez Malmierca por su constante interés y apoyo. A los dos, gracias.

A Fátima, Roger y Katty por ser el mejor ejemplo que pude tener en mis comienzos científicos.

A Adrián, por todo lo que ha aportado a este trabajo: opinando, discutiendo, pensando o, simplemente, poniendo música. Gracias. No puedo poner tu nombre en las abreviaturas.

Y aunque haya llegado hasta el final de este escrito sin mencionarla, con ella empezó todo. Así que muchas gracias a la Profesora Raquel Rodríguez por entender las circunstancias, por dejar claras las prioridades en todo momento y por, no sin mucho esfuerzo, haberme conducido hasta aquí.

Además, quiero agradecer a

- La Fundación Inés Luna Terrero**
- La Fundación D. Samuel Solórzano Barruso**
- La Universidad de Salamanca**

**La financiación otorgada para el desarrollo de este trabajo de
Tesis Doctoral.**

“El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible.”

-Ray Bradbury

Nota aclaratoria 1

Debido al uso extendido del inglés en la ciencia y en las herramientas informáticas utilizadas para el análisis de algunas de nuestras técnicas, en este trabajo se utilizan algunos términos anglosajones comunes en este entorno.

Nota aclaratoria 2

La nomenclatura de los genes y proteínas mencionados en este trabajo se adapta a las normas internacionales establecidas por bases de datos como HGNC (*Hugo Gene Nomenclature Comitee*), MGI (*Mouse Genome Informatics*) y ZFIN (*The Zebrafish Model Organism Database*). Por lo tanto, las proteínas de humano, rata y ratón se escriben con mayúsculas. Los genes de humano aparecen en mayúsculas y cursiva, mientras que los genes de modelos murinos se escriben en minúsculas y cursiva. Por último, todas las proteínas de pez cebra se escriben con la primera letra en mayúscula. Los genes de este modelo se nombran en cursiva y en minúscula.

Abreviaturas según su uso en esta memoria

AMPS: persulfato de amonio

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

ChIP: Inmunoprecipitación de cromatina

Ch11b: cell adhesion molecule like 1b

CREB: Elemento de unión en respuesta a AMPc

CT: ciclo umbral

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol

Ewsr1a: ewing sarcoma RNA binding protein 1a

Fmr1: fragil X mental retardation 1

gDNA: DNA genómico

GFP: Proteína verde fluorescente

GO: Gene Ontology

H3K27ac: Histona 3 acetilada en la lisina 27

H3K27me3: Histona 3 trimetilada en la lisina 27

Hb: rombencéfalo

Hpf: Horas post fecundación

LC: *Locus Ceruleus*

lncRNAs: RNAs no codificantes de gran tamaño

MAP: mitogen activated protein

Mb: mesencéfalo

MeCP2: Proteína de unión a citosinas metiladas 2

miRNA: MicroRNA

Mo: morfante

mRNA: RNA mensajero

Mych: myelocytomatosis oncogene homolog

Nacc: Núcleo *accumbens*

ncRNAs: RNAs no codificantes

NGF: factor de crecimiento nervioso

NT: Neurotrofina

Nx: naloxona

OPRD1: Receptor opioide delta

OPRK1: Receptor opioide kappa

OPRM1: Receptor opioide mu

ORL1: Opioid receptor like

P75NTR: receptor de neurotrofinas P75

PBS: Tampón sulfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDYN: Pro-dinorfina

PENK: Pro-encefalina

PFA: paraformaldehído

PGK: fosfoflicerato quinasa humana

PI3K: fosfatidilinositol-3 quinasa

piRNA: PIWI RNA

PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride

POMC: Proopiomelanocortina

PTU: 1-fenil-2-tiourea

RISC: complejo silenciador inducido por RNA

rRNA: RNA ribosómico

RT: temperatura ambiente

scaRNA: RNAs pequeños de cuerpos de Cajal

SDS: dodecilsulfato sódico

Seq: next generation sequencing

siRNA: RNA de interferencia

SNC: Sistema Nervioso Central

TBS: Tampón Tris salino

TEMED: tetrametiletilendiamina

TM: temperatura de anillamiento

Trk: receptor con actividad tirosina-quinasa

tRNA: RNA de transferencia

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

VTA: Área Tegmental Ventral

Índice

Introducción

La morfina	3
Receptores y ligandos del sistema opioide	5
Mecanismo de acción de los receptores opioides	6
Modulación del dolor	7
El sistema opioide y la adicción	8
Implicación del sistema opioide en el desarrollo	8
El sistema opioide del pez cebra	9
Factores epigenéticos.....	10
Modificaciones de histonas.....	10
<i>Acetilación de histonas</i>	11
<i>Fosforilación de histonas</i>	11
<i>Metilación de histonas</i>	12
Metilación del DNA.....	12
RNAs no codificantes	13
<i>microRNAs</i>	13
Neurotrofinas	16
Las neurotrofinas y sus receptores	16
Mecanismo de acción de las neurotrofinas	17
Precusores neuronales	18
Los precusores neuronales en el cerebro en desarrollo	18

Material y Métodos

Animales de experimentación	27
Exposición de los embriones de pez cebra a fármacos.....	28
Microinyección de morfolinós.....	28
Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)	30
Extracción de RNA	30
Tratamiento con DNase	31
Procesado de muestras de RNA para la determinación de miRNAs	31
<i>Reacción de poliadenilación</i>	31
<i>Retrotranscripción del RNA poliadenilado</i>	31
Procesado de muestras de RNA para la detección de <i>oprm1</i> y <i>sox2</i>	32

Diseño de oligonucleótidos.....	32
<i>Oligonucleótidos para miRNAs</i>	32
<i>Oligonucleótidos para otros genes</i>	33
Análisis por qPCR	33
Análisis estadístico	33
Western blot.....	34
Extracción de proteínas para Western Blot	34
Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford	34
Preparación de los geles para la separación de proteínas	35
Western blot.....	35
Inmunohistoquímica <i>in toto</i>	36
TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling).....	37
Cultivos primarios de neuronas	38
Inmunocitoquímica	38
ChIP-seq	39
Preparación de embriones.....	39
Pre-bloqueo de los gránulos magnéticos y unión del anticuerpo.....	39
Preparación de cromatina.....	40
Inmunoprecipitación de cromatina	41
Lavado, elución y reversión del <i>cross-linking</i>	42
Precipitación del DNA.....	42
Secuenciación	42
Análisis experimental	43
Análisis de la metilación del DNA: Conversión de bisulfitos.....	45
Extracción de DNA genómico (gDNA).....	45
Conversión de bisulfitos	45
Diseño de <i>primers</i>	45
PCR anidada (<i>Nested PCR</i>)	46
Preparación de medios y placas para el crecimiento bacteriano.....	47
Clonación.....	47
Análisis de la metilación.....	47
Ensayo de luciferasa	48
Predicciones bioinformáticas	48
Ensayo de luciferasa	48

<i>Clonación del plásmido para la validación de dianas de un miRNA</i>	48
<i>Transfección de los plásmidos</i>	49
<i>Detección de la quimioluminiscencia</i>	49
Análisis estadístico	49
<i>Time-lapse</i> de transgénicos Nestin-GFP	49

Resultados

1.Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética mediados por RNA no codificantes: cambios sobre el <i>mir212</i> y el <i>mir132</i>	53
A.Cambios en el <i>mir212</i> y el <i>mir132</i> tras la exposición a morfina	53
B.Cambios morfológicos inducidos por la exposición a morfina en el SNC	55
C.Detección de BDNF y TrkB tras la exposición a morfina	57
D.Regulación del mRNA de <i>mecp2</i> por el <i>mir212</i> y el <i>mir132</i>	59
E.Análisis de la expresión de TrkB y la agregación celular. Efectos de la morfina en un cultivo primario de neuronas.	61
2.Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética: cambios en las modificaciones de histonas H3K27ac y H3K27me3.	63
A.H3K27ac y H3K27me3 en el grupo control	63
B.Genes con las marcas H3K27ac y H3K27me3 aumentadas tras la exposición a morfina.....	65
C.Análisis funcional de los resultados obtenidos por ChIP-seq	68
3.Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética: cambios en la metilación del DNA. Efectos sobre la expresión de la proteína Nestin. .	70
A.Estudio de la metilación del DNA en el promotor distal de <i>nestin</i>	70
B.Estudio de la expresión del factor de transcripción Sox2 tras la exposición a morfina durante el desarrollo del pez cebra.....	72
C. Efecto del silenciamiento de los microRNAs 212/132 y el receptor opioide μ sobre la expresión del factor de transcripción Sox2	72
D. . Estudio de la unión de los microRNAs 212 y 132 a la secuencia del exón de Sox2	74
C.Efectos de la exposición a morfina en la expresión de Nestin	75

Discusión

1.Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética mediados por RNA no codificantes: cambios sobre el <i>miRNA 212</i> y el <i>miRNA 132</i>	87
2.Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética: cambios en las modificaciones de histonas H3K27ac y H3K27me3.	92

3.Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética: cambios en la metilación del DNAEfectos sobre la expresión de la proteína Nestin. ...	97
Conclusiones	103
Bibliografía	107
Anexos	123

Introducción

La morfina

Muchas de las propiedades farmacológicas de la morfina, que la convierten en un fármaco ampliamente utilizado en la medicina actual, son bien conocidas desde mucho antes del aislamiento de la molécula propiamente dicha. En varias civilizaciones antiguas como Sumeria, Egipto, la antigua Grecia y el Imperio Romano, los extractos de la amapola (*Papaver somniferum*) eran utilizados ampliamente en la medicina. La morfina, como ingrediente activo principal del opio, fue aislada en 1805 por el farmacéutico alemán Friedrich Wilhelm Sertürner, obteniendo su nombre del dios de los sueños en la mitología Greco-Romana, Morfeo. La morfina fue el primer alcaloide descrito y su aislamiento supuso un gran avance para la química. Desafortunadamente, la morfina y otros opioides como la heroína se encuentran entre las drogas de abuso más peligrosas en la actualidad, representando aún un serio problema para la sociedad (Bauer y cols., 2016; Peyriere y cols., 2016).

La morfina se encuentra enmarcada en la familia de los alcaloides morfínicos que incluye, además, a la codeína, la tebaína y la neopinona. Todos ellos se encuentran principalmente en plantas del género *Papaver*. La estructura de la morfina (Gulland y Robinson, 1925) consiste en cinco anillos condensados: Fenólico A, Ciclohexano B, Ciclohexenol C, N-metil-piperidina D y un anillo

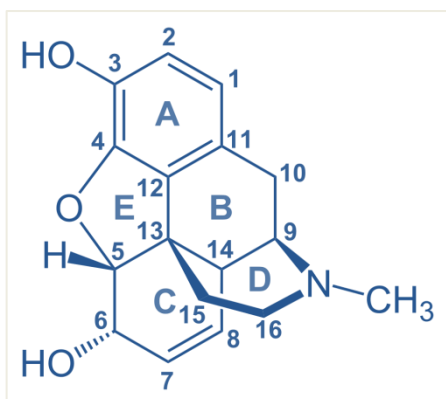


Figura 1. Estructura química de la morfina. La molécula cuenta con 5 anillos: A Fenólico, B Ciclohexano, C Ciclohexenol, D N-metil-piperidina y E furano.

de furano parcialmente saturado E (Fig. 1). Aunque esta conformación es estructuralmente bastante rígida, algunos grupos funcionales como el fenólico del C3 y el alcohol secundario del C6, permiten que la morfina sea químicamente reactiva. Debido al anillo de piperidina, la morfina es además una base débil. De hecho, el nombre del grupo “Alcaloide” refleja esta propiedad. La morfina natural es ópticamente activa mientras que su homólogo sintético (+) morfina tiene propiedades completamente distintas (Jacquet y cols., 1977).

El anillo A junto a su grupo hidroxilo es la clave estructural para la actividad analgésica de la morfina. Se ha comprobado que la eliminación de este grupo funcional reduce la actividad analgésica 10 veces (De Ruiter, 2000).

La morfina induce efectos a diferentes niveles entre los que se destacan cambios en el Sistema Nervioso Central (SNC), cambios en la expresión génica, efectos sobre varios sistemas como el respiratorio, circulatorio, gastrointestinal, musculo-esquelético y renal.

Los efectos de los opioides sobre el SNC se producen incluso a dosis mínimas. La depresión del estado mental inducida puede variar según la dosis, desde estupor hasta coma. Esta depresión puede acompañarse de convulsiones y otras manifestaciones centrales.

En relación con los cambios en la expresión de genes, varios estudios han identificado alteraciones en proteínas de numerosas regiones cerebrales reguladas por opiáceos (Nestler y Aghajanian, 1997). Algunas de estas proteínas, como el factor de transcripción CREB (Elemento de unión en respuesta al AMPc) y la tirosina hidroxilasa, parecen jugar un papel clave en las adaptaciones moleculares a la exposición crónica de opiáceos en el *locus ceruleus* (LC) o el área tegmental ventral (VTA) y otras regiones cerebrales (Walters y cols., 2003); mientras que otras proteínas parecen estar reguladas solamente en regiones específicas del cerebro (Nye y Nestler, 1996).

La depresión respiratoria puede ser inducida por mínimas dosis de opioides. Concretamente, la morfina puede causar edema pulmonar y broncoespasmos si se llega a las dosis más altas. Generalmente, aparecen de forma conjunta síntomas como cianosis, secreciones bronquiales y estertores en pacientes comatosos. Estos síntomas también están asociados con el uso intravenoso o inhalado de la heroína. Por otra parte, la ingestión de morfina conduce a una liberación de histamina con la consecuente vasodilatación que puede inducir la hipotensión ortostática. Además se reduce el tono vascular periférico. Los efectos sobre el ritmo cardiaco son variados: las náuseas y vómitos pueden estimular el tono vasovagal e inducir bradicardia, mientras que la hipotensión ortostática puede producir taquicardia. En el sistema digestivo, además de inducir la aparición de vómitos y náuseas, la morfina también reduce la motilidad gastrointestinal desencadenando efectos como el estreñimiento y la impactación fecal. Esto conduce a cambios en la absorción intestinal.

Receptores y ligandos del sistema opioide

Los opioides son sustancias bien conocidas desde la antigüedad, utilizadas como analgésicos y con fines recreativos. Además de los opioides exógenos, existen opioides endógenos, liberados ante estímulos dolorosos, capaces de inducir una respuesta analgésica en el organismo. Tanto los opioides endógenos como los exógenos, se unen a receptores específicos que forman parte del sistema opioide que se describe a continuación.

La existencia de receptores en el cerebro para las sustancias opioides fue demostrada por primera vez en 1973 por tres grupos independientes (Pert y Snyder, 1973; Simon y cols., 1973; Terenius, 1973). Años después, se identificaron numerosas regiones de unión para los opioides, confirmando que estos receptores no constituían una población homogénea (Martin y cols., 1976; Lord y cols., 1977).

Los receptores opioides fueron clasificados inicialmente en tres categorías, según el agente opioide que presentaba actividad definida en cada uno: receptor μ , por morfina, receptor κ , por cetociclazocina y receptor σ , por SKF-10047. Este último no se considera receptor opioide porque su actividad no es bloqueada por la naloxona (Waldhoer y cols., 2004). Por último, se descubrió el receptor δ (Lord y cols., 1977) cuyos ligandos sintéticos específicos son el DPDPE y el DSLET.

No fue hasta 1992 cuando se pudo clonar el primer receptor opioide, el receptor δ (OPRD1) (Kieffer y cols., 1992; Evans y cols., 1992). Posteriormente, fueron clonados el receptor μ (OPRM1) (Wang y cols., 1993; Thompson y cols., 1993) y κ (OPRK1) (Yasuda, 1993). En el año 1994 se clonó un receptor con una secuencia similar a la de los receptores opioides mencionados anteriormente que no pertenecía a ningún subtipo farmacológico descrito. Este receptor se denominó ORL1, abreviatura de *Opioid receptor like* (Mollereau y cols., 1994; Wang y cols., 1994). Todos estos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (Reisine, 1995).

También se han descrito tres precursores de péptidos opioides endógenos, proopiomelanocortina (POMC), proencefalina (PENK) y prodinorfina (PDYN), de los que derivan la β -endorfina, met-enkefalina y leu-enkefalina, dinorfinas y neoendorfinas, respectivamente (Kieffer y Gavériaux-Ruff, 2002). Los ligandos opioides endógenos

muestran diferente afinidad para cada receptor opioide. Esto es, la β -endorfina se une con mayor afinidad al receptor opioide μ que al receptor δ o al κ . La afinidad de la met-enkefalina y la leu-enkefalina por el receptor delta es 20 veces mayor que la que presenta por el receptor μ , mientras que las dinorfinas son ligandos putativos del receptor κ . Todos estos péptidos presentan un extremo N-terminal (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Leu) indispensable para activar los receptores opioides correspondientes (Akil y cols., 1997).

Los receptores opioides y sus ligandos endógenos tienen un papel crucial en el sistema de recompensa del cerebro y en la modulación de los efectos comportamentales y neuroquímicos de múltiples drogas de abuso. De esta manera, los diferentes componentes del sistema opioide endógeno están altamente expresados en áreas del SNC involucradas en la recompensa y la motivación (Mansour y cols., 1995). Es decir, los péptidos opioides y sus receptores están presentes en el VTA, el núcleo accumbens (Nacc), la corteza prefrontal, el hipotálamo y la amígdala (Delfs y cols., 1994; Mansour y cols., 1995); y participan en la modulación de los circuitos de recompensa presentes en estas áreas.

Mecanismo de acción de los receptores opioides

Los cuatro receptores opioides pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteína G, del tipo Gi/o. Tras su activación por un agonista, ya sea opioide endógeno o exógeno, la proteína G y sus subunidades se disocian desencadenando varias rutas intracelulares (Pan y cols., 2009; Trescot y cols., 2008; Trigo y cols., 2010) (Fig. 2). La subunidad α de la proteína G inhibe la síntesis del AMPc por inactivación de la adenilato ciclasa (AC) (Standifer y Pasternak, 1997; Tso y Wong, 2003). El AMPc actúa como segundo mensajero activando la proteína quinasa A (PKA) la cual puede alterar la excitabilidad eléctrica neuronal. El AMPc también puede activar el elemento de respuesta de AMPc (CREB) y mediar muchas respuestas intracelulares (Tso y Wong, 2003; Trescot y cols., 2008). Asimismo, la activación de los receptores opioides produce la apertura de los canales de potasio, lo cual se traduce en la hiperpolarización neuronal y, de esta forma, se inhibe la conducción nerviosa (Law y Loh, 1999; Tso y Wong, 2003; Trescot y cols., 2008).

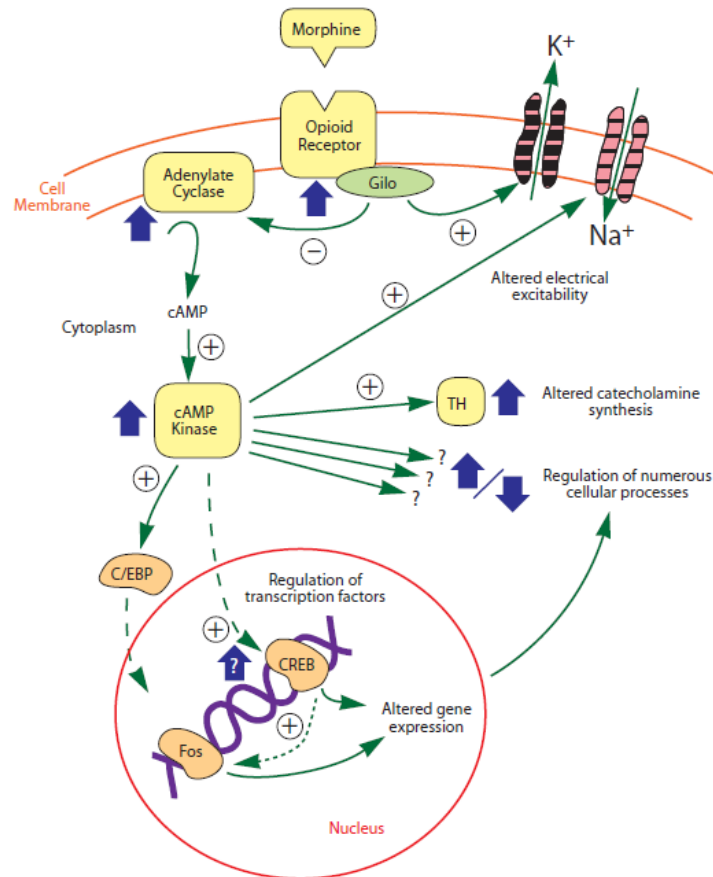


Figura 2. Mecanismo de acción inducido tras la activación del sistema opioide. Una vez activados los receptores opioides (acoplados a Proteínas Gi/o) se desencadena una señalización intracelular que incluye tanto la inhibición del AMPc y la activación de los canales de potasio como la regulación de la transcripción de genes. Tomado de Trescot y cols., 2008.

Modulación del dolor

La gran mayoría de estudios sobre los opioides está relacionada con la analgesia (Kieffer y cols., 2002; Eisinger y cols., 2005; Hanlon y cols., 2011). Se ha descrito que un daño infligido de manera continua produce la liberación de opioides endógenos aumentando sus niveles en sangre para contrarrestar el estímulo nociceptivo y el dolor.

Los modelos animales con receptores opioides mutados aportan una poderosa herramienta para el estudio de la analgesia y otros efectos fisiológicos atribuidos al sistema opioide. De esta manera, se halló la clara evidencia de que OPRM1 juega un papel crucial en relación con la analgesia. Los ratones que carecen de este receptor muestran una sensibilidad aumentada al calor y una reducción en la analgesia inducida

tras el estrés (LaBuda y cols., 2000; Kieffer y cols., 2002). Por el contrario, los ratones que carecen de receptores δ y κ no muestran ninguna alteración relacionada con la percepción del calor. Muchos de los analgésicos opioides disponibles en la actualidad ejercen su acción a través OPRM1 (Ananthan, 2006).

El sistema opioide y la adicción

La administración exógena de los clásicos compuestos opioides, como la morfina, activa el sistema de recompensa mesolímbico, principalmente por la estimulación de los receptores opioides en el VTA y el Nacc (Bozarth, 1987). De forma específica, los opioides facilitan la liberación de dopamina activando los receptores μ y δ en el Nacc (Hirose y cols., 2005; Okutsu y cols., 2006) y disminuyendo la inhibición GABA-érgica en el VTA (Bonci y Williams, 1997; Johnson y North, 1992). Los estudios con animales han demostrado que existe un papel diferenciado de los distintos receptores opioides en cuanto a su relación con la adicción. De esta manera, los agonistas opioides que tienen como diana el receptor μ poseen la mayor capacidad de desencadenar un comportamiento de abuso (Devine y Wise., 1994).

La exposición repetida a los opioides produce cambios en el sistema opioide que llevan al desarrollo de tolerancia y dependencia física. OPRM1 es el principal responsable del desarrollo de estos efectos. La menor sensibilidad del receptor y los mecanismos desencadenados *a posteriori* parecen ser los principales factores involucrados en el desarrollo de la tolerancia, dado que no hay evidencia clara que muestre una relación entre los cambios en la expresión del receptor y dicho efecto. Además, se ha descrito que los receptores opioides en el cerebro aumentan su expresión (Zadina y cols., 1989), disminuyen (Tao y cols., 1987) o no cambian (Höllt y cols 1975), tras el tratamiento crónico con diversos agonistas. Estos resultados dependen de los ligandos utilizados y las regiones cerebrales estudiadas.

Implicación del sistema opioide en el desarrollo

A finales de los años 80 se publicaron varios estudios en los que se analizaba la expresión tanto de receptores opioides como de precursores de péptidos opioides endógenos durante el desarrollo de mamíferos. Estos estudios apuntaban a la existencia de funciones específicas del sistema opioide endógeno en la formación de diversas estructuras del embrión y, de manera más específica, en el SNC, en el que la presencia y

actividad opioide es mayor y más relevante (Hauser y cols., 1987; Hauser y cols., 1989; Stiene-Martin y cols., 1991). En concreto, los receptores opioides μ y κ potencian la neurogénesis (Kim y cols., 2006), el receptor opioide κ incrementa la tasa de proliferación celular cuando es activado por la morfina (Weber y cols., 2008) y el receptor opioide δ interviene tanto en neurogénesis como en protección neuronal (Narita y cols., 2006; Zhang y cols., 2000). Además, la exposición embrionaria a sustancias opioides como la morfina, sobre todo en estadios tempranos del desarrollo, produce malformaciones del tubo neural, alteraciones de la motilidad y del comportamiento y, a elevadas dosis, muerte neuronal, así como inhibición de crecimiento axonal (Berrios y cols., 2008). Por otro lado, se desconocen los mecanismos exactos a través de los cuales el sistema opioide ejerce las funciones descritas, a pesar de los esfuerzos realizados por comprender la actividad opioide durante el desarrollo y de qué manera puede afectar a la vida adulta del individuo.

El sistema opioide del pez cebra

En el pez cebra se han identificado, clonado y caracterizado farmacológicamente los receptores opioides Oprd1a (Barrallo y cols., 1998a y 1998b; Rodríguez y cols., 2000), Oprm1 (Barrallo y cols., 2000), Oprk1 (Alvarez, y cols., 2006), Oprd1b (Pinal-Seoane y cols., 2006) y ZFORL (Rivas-Boyero y cols., 2011) y los precursores de los péptidos opioides endógenos en el pez cebra correspondientes a la proencefalina (PENK y PENK-like), proopiomelanocortina (POMC y POMC-like), prodinorfina (PDYN) y pronociceptina (PNOC) (González- Núñez y cols., 2003a,b; González-Núñez., y cols., 2007a,b).

En general, la semejanza de las proteínas del sistema opioide del pez cebra es menor al 70% respecto a las del humano. Sin embargo, la conservación de los dominios funcionales y las regiones de unión a los substratos o ligandos, es cercana al 100% entre las secuencias de humano y pez cebra. Esto señala al pez cebra como una herramienta muy valiosa para el estudio del descubrimiento de nuevos fármacos, sitios de unión y validación de fármacos (Langheinrich, 2003). En el caso específico de los receptores opioides del pez cebra, estos presentan una homología de entre 64-73% comparados con los receptores opioides del humano. El receptor Oprm1 es el que presenta una mayor homología (73%), seguido por Oprk1 (70%), Oprd1a (64%) y Oprd1b (65%). La

homología de la secuencia de los receptores opioides con respecto a las de otras especies se presenta en la tabla 1.

Homología de los receptores opioides en diferentes especies				
Pez cebra	Oprd1a	Oprd1b	Oprk1	Oprm1
Humano	64	65	70	73
Rata	63	63	67	68
Ratón	64	64	68	71

Tabla 1. Porcentaje de semejanza de los aminoácidos de los receptores opioides del pez cebra con diferentes especies de mamíferos.

Factores epigenéticos

La epigenética es un término acuñado por Waddington en 1939 englobando «las interacciones causales entre los genes y sus productos, de las cuales resulta el fenotipo» (Waddington, 1939). Hoy en día, se define como aquellos cambios heredables en el DNA e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos, que modifican la estructura y condensación de la cromatina o que afectan a la expresión génica y al fenotipo (García-Robles y cols., 2012). Los factores epigenéticos engloban tres mecanismos principales: las modificaciones de histonas, la metilación del DNA y la regulación por RNAs no codificantes.

Modificaciones de histonas

El DNA de las células eucariotas está estrechamente unido a histonas dando lugar a la formación de la cromatina. La unidad estructural básica de la cromatina es el nucleosoma que consiste en, aproximadamente, 146 pares de bases de DNA enrollado en torno a dos moléculas de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 (octámero), con una molécula de la histona H1 que compacta los nucleosomas en un nivel de organización superior.

Cada histona está compuesta de un dominio de triple-hélice y dos colas no estructuradas. Aunque las colas de las histonas no son indispensables para la formación del nucleosoma, estas se requieren para la interacción nucleosoma-nucleosoma (Luger y cols., 1997) y para establecer la cromatina transcripcionalmente inactiva o

heterocromatina. Las colas de las histonas son susceptibles de padecer numerosas modificaciones que incluyen la acetilación fosforilación y la metilación.

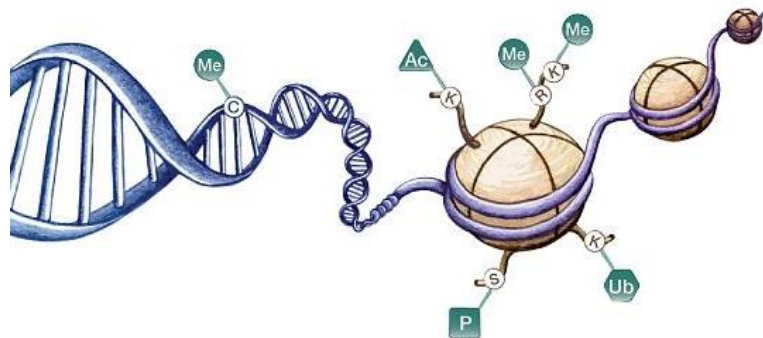


Figura 3. Modificaciones epigenéticas que afectan directamente a la estructura del DNA. Las modificaciones de las histonas como la acetilación (Ac), la metilación (Me), la fosforilación (P) y la ubiquitinación (Ub) cambian el grado de compactación del DNA junto a la modificación directa en la metilación de la secuencia del DNA dentro de las regiones CpG.

Acetilación de histonas

La cola amino terminal de las histonas que se sitúa fuera del nucleosoma es rica en lisinas y puede ser acetilada en residuos específicos (Fig. 3). La acetilación reduce las cargas positivas en la red de histonas y debilita su unión al DNA alterando también sus interacciones con otras proteínas. Esta modificación facilita la unión de los factores de transcripción al DNA del nucleosoma, indicando que la acetilación de histonas aumenta la accesibilidad de la cromatina a las proteínas de unión al DNA (Cooper, 2000). La acetilación de histonas está mediada por enzimas denominadas histona acetiltransferasas (HAT) mientras que la eliminación de los grupos acetilo la llevan a cabo las histona deacetilasas (HDAC) (Eberharter y Becker, 2002).

Fosforilación de histonas

La fosforilación de histonas tiene lugar en serinas, treoninas y tirosinas, predominantemente pero no exclusivamente (Fig.3). Los niveles de esta modificación están controlados por quinasas y fosfatasa que la añaden o eliminan, respectivamente (Oki y cols., 2007). Todas las histona quinasas identificadas, transfieren un grupo

fosfato del ATP al grupo hidroxilo del aminoácido diana. De esta manera, la modificación añade cargas negativas que, consecuentemente, modifican la estructura de la cromatina. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo por el cual una quinasa se dirige a su lugar de acción en la cromatina (Bannister y Kouzarides, 2011).

Metilación de histonas

La metilación de histonas puede ocurrir en lisinas y argininas (Fig. 3). Al contrario que la acetilación y la fosforilación, la metilación no altera la carga de las histonas. Además, presenta una mayor complejidad dada la posibilidad de encontrar lisinas mono-, di- o tri-metiladas y argininas mono- y di-metiladas simétrica o asimétricamente (Bedford y Clarke, 2009; Xhelmace y cols., 2011).

La metilación de las argininas ocurre mediante dos tipos de metiltransferasas: las de tipo I y las de tipo II. Las tipo I generan Rme1 (Arginina con un grupo metilo) y Rme2as (Arginina con dos grupos metilos asimétricos); mientras que las de tipo II generan Rme1 y Rme2s (Arginina con dos grupos metilos simétricos) (Wolf, 2009).

Metilación del DNA

La metilación del DNA también se encuentra ligada a la estructura de la cromatina. Los residuos de citosinas en el DNA de los vertebrados pueden ser modificados por la adición de grupos metilo en el carbono 5 por parte de las enzimas DNA-metiltransferasas (Cooper, 2000) (Fig. 3). El DNA se metila específicamente en las citosinas que preceden a las guaninas en la cadena (dinucleótidos CpG). Esta metilación se correlaciona con la variación en la actividad de los genes que contienen varios dinucleótidos CpG en sus promotores. La proteína de unión a citosinas metilada 2 (MeCP2) se une específicamente al DNA metilado y reprime la transcripción. Esta proteína funciona como un complejo con las histonas deacetilasas, uniendo la metilación con alteraciones en la acetilación de histonas (Kavalali y cols., 2011).

Aunque la metilación del DNA es capaz de inhibir la transcripción, su función general aún no es clara. En la mayoría de los casos la metilación del DNA es una consecuencia de la ausencia de la actividad transcripcional de un gen. Sin embargo, recientemente se ha descrito un fenómeno denominado *Imprinting* genómico que controla la expresión de algunos genes involucrados en el desarrollo de los embriones de mamíferos (Cooper, 2000).

RNAs no codificantes

Los RNAs no codificantes (ncRNAs) son moléculas de RNA involucradas en la traducción, la replicación del DNA, el *splicing* del RNA y la regulación epigenética. El grupo de los ncRNAs está formado por los RNA de transferencia (tRNA), los RNA ribosómicos (rRNA), los RNAs de interferencia (siRNA), los Piwi-RNA (piRNA), los microRNA (miRNA), Y-RNA y los RNAs pequeños de cuerpos de cajal (scaRNA) (Huttenhofer y cols., 2005; Christov y cols., 2006; Kishore y cols., 2006; Zhu y cols., 2015; Zhang y cols., 2011).

La idea de que los ncRNAs son vestigios evolutivos está bien extendida (Kung y cols., 2013). En el genoma humano los genes que codifican los ncRNAs son 5 veces más numerosos que los que codifican proteínas. Los ncRNAs pueden ser transcritos en regiones intergénicas o solapadas con genes que codifican otras proteínas (Kapranov y cols., 2007). Además, las mutaciones en estos genes pueden inducir el desarrollo de diversas enfermedades. Especialmente los RNAs de mayor tamaño (lncRNAs) y los miRNAs tienen un gran potencial terapéutico, pudiendo introducirse en la célula mediante vectores virales o por transfección mecánica (Taucher y cols., 2016).

microRNAs

Los microRNAs representan un subgrupo de los ncRNAs de 19-25 nucleótidos que regulan post-transcripcionalmente la expresión de un gen mediante un proceso conocido como interferencia del RNA (Ambros, 2004; Bartel, 2004, Taucher y cols., 2016). Los miRNAs están evolutivamente bien conservados y afectan al 60% de genes de los mamíferos, convirtiéndose en temas centrales de investigación en los últimos años (Tanzer y Stadler, 2004; Axtell y Bartel, 2005; Chen y Rajewsky, 2007; Friedman y cols., 2009; Fkih y cols., 2015). La biogénesis de los miRNAs se lleva a cabo mediante el procesamiento de los RNAs transcritos por la RNA polimerasa II y de los pre-miRNAs con morfología en horquilla a miRNAs maduros por las enzimas Drosha y Dicer en el núcleo y el citoplasma, respectivamente (Lund y Dahlberg, 2006; Prodromaki y cols., 2015) (Fig. 4A). Los miRNAs de cadena sencilla se asocian a la proteína argonauta para formar el complejo silenciador inducido por RNA (RISC) que se une de manera complementaria al RNA mensajero (mRNA) para bloquear el inicio de su traducción o iniciar su degradación (Wang y cols., 2004).

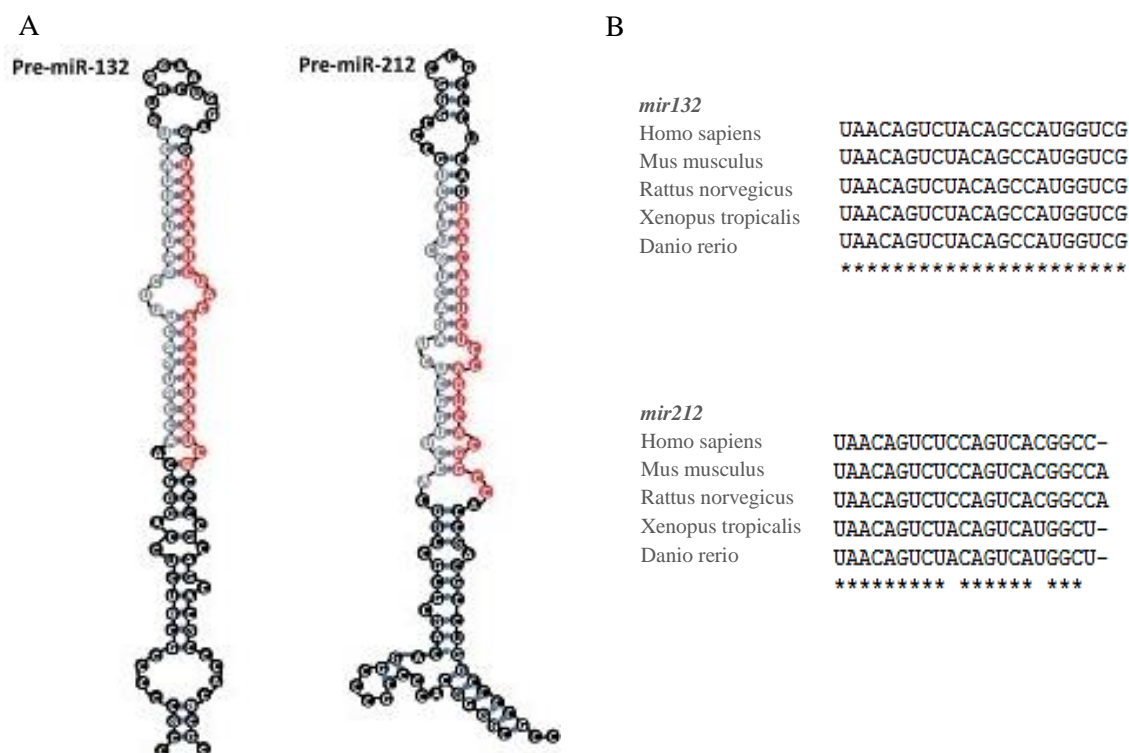


Figura 4. Precursores de los miRNAs 212 y 132 de humano (A) y homología de las secuencias de los *mir132* y *mir212* de varias especies (B). Los precursores de estos miRNAs cuentan con la típica estructura en horquilla. El grado de semejanza del *mir132* entre diversas especies es del 100%, incluso al comparar con la secuencia del pez cebra. El *mir212* difiere en dos bases en anfibios y teleosteos. Imagen modificada de Wanet y cols., 2012.

En mamíferos la unión entre un miRNA y su mRNA diana es generalmente imperfecta, lo que conduce al bloqueo de la traducción del mRNA (Bazzini y cols., 2012). Por otra parte, la complementariedad perfecta entre ambas cadenas conduce a la degradación del mRNA (Eulalio y cols., 2009). A pesar de la existencia de estos dos tipos de unión, la región semilla o *seed* de un miRNA, que representa una región de unos 2-8 nucleótidos de longitud en el extremo 5', requiere que la unión al mRNA sea perfecta para poder llevar a cabo al menos la función de bloqueo de la traducción. Algunos miRNAs presentan regiones semilla complementarias con varios mRNAs (Lewis y cols., 2003). Por tanto, un solo miRNA puede inhibir la expresión de cientos de genes mientras que un gen puede estar regulado por numerosos miRNAs.

En relación con su función, algunos miRNAs han sido denominados onco-miRs por promover la agresividad tumoral. Aquellos miRNAs que presentan la función contraria se denominan miRs-supresores-tumorales. Los Onco-miRs pueden inhibir la traducción de genes supresores de tumores como PTEN, mientras que los miRs-supresores-

tumorales inhiben la traducción de oncogenes como KRAS, como se ha demostrado en relación a los miR-217 y miR-21, respectivamente (Zhao y cols., 2010).

microRNAs 212 y 132

Los *mir212* y *mir132*, codificados en el mismo *locus*, fueron descritos por primera vez como un transcrito del primer intrón de la región no codificante DQ223059, del cromosoma 10 de rata y en el primer intrón de la región AK006051 del cromosoma 11 de ratón (Vo y cols., 2005; Remenyi y cols., 2010). En humanos también comparten el mismo transcrito primario, estando localizados en una región intergénica en el cromosoma 17p13.3. Los *mir212* y *mir132* presentan secuencias maduras que comparten la misma región semilla (Fig. 4B), por tanto, deben tener como dianas los mismos mRNAs. No obstante, esa dualidad en relación con las dianas solo se ha demostrado para unos pocos mRNAs hasta ahora, así que es posible que estos miRNAs repriman dianas específicas para cada uno. Además el *mir132* es, de manera general, el principal producto de la maduración del *locus mir212/132*.

Los *mir212* y *mir132* están regulados por los factores de transcripción CREB y REST (Factor de transcripción de silenciamiento de RE-1), por tanto, dada la estrecha relación de estas proteínas con el desarrollo neuronal, la mayoría de las funciones de estos miRNAs está incluida en este contexto. En cultivos de fibroblastos de ratón se ha comprobado que el *mir132* aumenta en relación con la expresión de una forma negativa dominante de REST (Conaco y cols., 2006). De manera similar, el papel de CREB en el control de la transcripción de este *locus* se demostró por primera vez en neuronas corticales de rata estimuladas con neurotrofinas (Vo y cols., 2005).

Por otra parte, el *mir132* parece inducir el crecimiento de las neuritas y modular la morfología dendrítica en neuronas inmaduras corticales e hipocampales, tras la inhibición de la proteína P250GAP (Wayman y cols., 2008). Además el *mir132* también modifica la plasticidad dendrítica controlando la expresión de MeCP2 (Klein y cols., 2007) que, además de modular la metilación del DNA, es esencial para la correcta maduración neuronal y la formación de sinapsis (Fukuda y cols., 2005). Por tanto, las evidencias que surgen de los estudios *in vivo* demuestran los efectos del *mir132* en la morfogénesis neuronal.

Además la supresión del *locus mir212/132* está asociada con una disminución de la densidad de espinas y una menor longitud y arborización dendrítica en el hipocampo de ratón adulto (Magill y cols., 2010). Esta relación directa con la formación de las dendritas parece contraponerse a la inhibición ejercida por el *locus mir212/132* sobre MeCP2. Sin embargo parece ser que el *mir132* controla la expresión de varios genes con funciones opuestas, como sucede con P250GAP y MeCP2.

Neurotrofinas

Las neurotrofinas son importantes reguladores de la supervivencia, desarrollo y plasticidad neuronal (McAllister y cols., 1999; Sofroniew y cols., 2001, Arevalo y Wu, 2006). Estas moléculas se liberan de manera dependiente de la actividad neural, siendo inicialmente generadas como precursores o pre-neurotrofinas. Cada producto génico tiene que sufrir una proteólisis para dar lugar a la proteína madura. La regulación de la actividad se basa en un importante control post-transcripcional que da mayor especificidad a sus acciones (Chao, 2003). La producción de las neurotrofinas ocurre a una distancia considerable del cuerpo celular en tejidos periféricos o neuronas, que están conectados por axones con las neuronas sensibles a neurotrofinas (Thoenen, 1995). Durante el desarrollo se establece un flujo retrógrado de neurotrofinas transportando dichas proteínas a través del terminal axónico hasta el cuerpo celular (Ginty y cols., 2002). Las neuronas que establecen este flujo sobreviven a los periodos de muerte celular mientras que aquellas que no cuentan con dicho flujo degeneran. Una vez que el flujo se establece debe continuar durante la vida de la neurona para mantener el estado funcional diferencial de la célula.

Las neurotrofinas y sus receptores

Hasta el momento, se han aislado seis neurotrofinas: Factor de crecimiento nervioso (NGF), Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), Neurotrofina 3 (NT-3), Neurotrofina 4 (NT-4) (también conocida como NT-5), Neurotrofina 6 (NT-6) y Neurotrofina 7 (NT-7). Todas ellas han surgido de diversas duplicaciones del genoma de un cordado ancestral (Hallbook, 1999). En concreto, los genes que codifican NT-6 y NT-7 sólo han sido descritos en pez y probablemente no existen ortólogos en mamíferos o aves (Nilsson y cols., 1998). Las neurotrofinas generalmente funcionan como homodímeros asociados no covalentemente pero algunas subunidades son capaces de

formar heterodímeros con otras. NGF, NT-6 y NT-7 parecen actuar de manera muy similar y probablemente en las mismas poblaciones neuronales. Por otra parte, BDNF y NT-4 también comparten dianas muy similares (Ip y cols., 1993). Según esto, las neurotrofinas pueden dividirse en varias clases según las poblaciones neuronales que tienen como diana y todas las especies de vertebrados deben contar con, al menos, una neurotrofina de cada grupo. Además, la estructura de las neurotrofinas es similar a la de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y el factor de crecimiento transformante β (McDonald y Chao, 1995; Robinson y cols., 1999).

Las neurotrofinas interactúan con dos tipos de receptores de características muy diferentes: los receptores con actividad tirosina-quinasa (Trks) y el receptor de neurotrofinas p75 (p75NTR). Cada receptor Trk cuenta con un dominio transmembrana que termina en el citoplasma estando el dominio con actividad tirosina-quinasa rodeado de varios residuos de tirosina que sirven como lugares de unión dependientes de fosforilación para adaptadores y enzimas. Las neurotrofinas dimerizan sus correspondientes receptores Trk activándolos a través de la fosforilación del dominio citoplasmático. Se cree que la especificidad de la actividad de cada neurotrofina se debe en parte a la selectiva unión entre los receptores Trk y cada una de estas proteínas. De esta manera, NGF se une a TrkA (Kaplan y cols., 1991; Klein y cols., 1991a), TrkB une a BDNF y NT-4/5 (Klein y cols., 1991b; Squinto y cols., 1991) y TrkC une a NT-3 (Lamballe y cols., 1991); con mayor afinidad. El receptor p75 pertenece a la superfamilia del receptor TNF- α y estructuralmente se asemeja a otros miembros de esa familia (Vilar y cols., 2006).

En pez cebra se han descrito las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5, NT-6 y NT-7 con los respectivos receptores TrkA, TrkB, TrkC (Heinrich y Lum., 2000), todas ellas con similar analogía, momentos de aparición y áreas de expresión respecto a sus homólogos en mamíferos, pudiendo sugerir una importancia equivalente a la que tienen estas moléculas en otras especies.

Mecanismo de acción de las neurotrofinas

La activación de los receptores Trk es estimulada por la dimerización de las neurotrofinas y la trans-autofosforilación. Estos receptores sólo son estimulados por las formas maduras de las neurotrofinas. Es decir, las proteasas que controla el procesado

de las neurotrofinas también controlan la respuesta de los receptores Trk. La mayoría de las rutas activadas incluyen las cascadas de Ras, con la consiguiente activación de las MAP quinasas (mitogen-activated protein), fosfatidilinositol-3 kinasa (PI3K), la fosfolipasa C γ (PLC γ) y sus efectores posteriores, promoviendo la transcripción génica (Zampieri y Chao, 2006; Reichardt, 2006). La trans-activación entre los receptores de tipo tirosina-quinasa y los receptores acoplados a proteína G se incluye en la actualidad como otro mecanismo de señalización que permite a la célula responder a una gran variedad de estímulos extracelulares.

Precursores neuronales

Los precursores neuronales tienen la capacidad de auto-renovarse y producir los tres tipos principales de células del SNC. Aunque varios estudios habían apuntado a la posible existencia de estos precursores, Reynolds y cols. (1992a y 1992b) demostraron este hecho, probando que estas células podían ser aisladas del SNC de ratones adultos y sus embriones y propagarse en cultivos en presencia del factor de crecimiento epidermal, formando grandes agregados de células que denominaron “neuroesferas”. Estas neuroesferas poseían las características de neuronas y de células gliales pero expresaban la proteína de filamento intermedio Nestin, previamente asociada con células neuroepiteliales. Además, demostraron que una neuroesfera podía ser generada a partir de una única célula y a partir de su disociación obtener nuevas neuroesferas. Por tanto, quedaba claro que estos agregados poseían las características de las células madre: auto-renovación y multipotencia. Además, en 1993, los estudios paralelos de Luskin y cols., (1993) y Lois y Alvarez-Buylla (1993), demostraron la proliferación de células en la zona subventricular de roedores adultos, que daban lugar a nuevas neuronas del bulbo olfatorio.

Los precursores neuronales en el cerebro en desarrollo

Los precursores neuronales presentes en el desarrollo cerebral muestran grandes diferencias con los del cerebro adulto. Durante el desarrollo, las células que cumplen algún criterio de ser precursor neuronal pueden ser cultivadas partiendo de cualquier estadio embrionario tras la formación del tubo neural; esto no ocurre con los precursores neuronales del cerebro adulto. No existen evidencias claras de que exista un nicho quiescente y de división lenta de precursores neuronales durante el desarrollo temprano

del cerebro (Kornblum, 2007). Sin embargo, se sabe que los precursores neuronales tienen la capacidad de cambiar sus características durante el desarrollo. En cultivos, se ha demostrado que los precursores extraídos de estadios tempranos de la gestación dan lugar a más neuronas que aquellos que proceden de tiempos posteriores (Qian y cols., 2000). Estas propiedades, sin embargo, pueden manipularse. La proteína de filamento intermedio Nestin se expresa en células neuroepiteliales del tubo neural (Lendahl y cols., 1990). Las células positivas para esta proteína, contactan con la superficie ventricular y tienen procesos radialmente orientados que contactan con la superficie pial. Estas células forman la glía radial que interviene en los procesos de migración de las neuronas. Las células de la glía radial, funcionan como precursores neuronales dando lugar a neuronas, glía y otros precursores neuronales (Malatesta y cols., 2003; Anthony cols., 2004).

Teniendo en consideración lo anteriormente expuesto, en este trabajo se analiza el papel de los factores epigenéticos en los efectos que la morfina desencadena, a través de la activación del receptor opioide μ , durante el desarrollo del SNC. El pez cebra representa el principal modelo experimental de este estudio en el que se analizan las modificaciones de histonas, la metilación del DNA y los cambios en miRNAs.

Hipótesis y objetivos

La morfina es en la actualidad el tratamiento de primera línea para el dolor crónico y para el dolor padecido por pacientes terminales (Bauer y cols., 2016). Además, junto a otros opioides, como la heroína, causa problemas en el desarrollo temprano del SNC. Estos daños son comunes dado que la exposición prenatal a opioides es muy frecuente en relación al alto número de mujeres gestantes que los consumen (Kremer y Arora, 2015). Con el fin de controlar estos efectos, es necesaria una clara comprensión de sus mecanismos de acción que, entre otras consecuencias, inducen cambios en la expresión génica de proteínas esenciales para el sistema nervioso central.

Teniendo en cuenta la estrecha relación de la morfina con el sistema opioide endógeno y los cambios en la expresión génica, nos planteamos la hipótesis de que los efectos desencadenados por la morfina en el SNC puedan estar regulados por varios factores epigenéticos ligados al desarrollo, vinculándose, además, con un sistema clave para la formación del SNC, como el de las neurotrofinas. La regulación epigenética propuesta podría ser intermediaria tanto en neuronas maduras como en precursores neuronales.

Este estudio se realiza tomando como modelo principal el SNC de embriones de pez cebra, partiendo de los siguientes objetivos con el fin de corroborar esta hipótesis:

1. Estudiar el efecto de la morfina, a través de la activación del receptor opioide μ , en la expresión de los miRNAs 212/132.
 - a. Estudiar el papel de los miRNAs 212/132 en los efectos de la morfina sobre la proliferación celular y la apoptosis de las células del SNC de embriones de pez cebra.
 - b. Analizar el efecto de la morfina sobre la expresión de Bdnf y TrkB en embriones de pez cebra.
 - c. Estudiar el efecto de la morfina y su relación con las neurotrofinas en cultivos primarios de neuronas de pez cebra.
2. Determinar la posible regulación ejercida por los miRNAs 212/132 y el receptor opioide μ en la expresión de Bdnf y TrkB del pez cebra.
3. Conocer el efecto de la morfina en marcas epigenéticas asociadas a modificaciones de histonas en estadios anteriores a las 48 horas post fecundación (hpf).

- a. Estudiar el efecto de la morfina sobre la acetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27ac) a las 24 hpf.
 - b. Estudiar el efecto de la morfina sobre la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3) a las 24 hpf.
4. Estudiar en un pez transgénico (Nestin-GFP) los cambios inducidos *in vivo* por la exposición a morfina en los precursores neuronales.
 5. Conocer las alteraciones inducidas por morfina en la metilación de los promotores de genes asociados al desarrollo temprano del SNC en embriones de pez cebra.

Material y métodos

Animales de experimentación

Para la obtención de embriones se utilizaron peces cebra (*Danio rerio*) de la cepa AB que han sido criados hasta la etapa adulta en nuestro laboratorio. El hecho de trabajar con una estirpe determinada presenta una serie de ventajas sobre los estudios realizados con peces cebra *wild type* o salvajes, como la homogeneidad obtenida en los resultados de los experimentos o el control de mutaciones. La estirpe AB está libre de mutaciones letales y es la más utilizada en los laboratorios que trabajan con este animal como modelo experimental. Todos los animales se mantienen en un sistema de peceras que utiliza filtro de carbón activo (Fig. 5). El agua tiene las condiciones ideales para albergar estos animales, con una temperatura de 27°C y pH 7 (Nüsslein-Volhard y Dahm, Zebrafish, 2002). El sistema de cría establecido consiste en la cría natural en parideras con una hembra y dos machos para que la fecundación de los huevos sea más eficaz. La cría natural está basada en el fotoperiodo de estos animales, de manera que la puesta se realiza durante la primera exposición a la luz del día, lo que permite controlarla.



Figura 5. Sistema de peceras para peces adultos utilizados en este trabajo. En estas peceras los peces adultos están distribuidos según su fecha de nacimiento y sexo.

Los embriones se recogen en un tamiz y se depositan posteriormente en una placa Petri con medio de crecimiento E3 (5,0 mM NaCl, 0,17mM KCl, 0,33mM CaCl, 0,33mM MgSO₄, 0,05% de azul de metileno, disueltos en agua destilada) de manera que haya

pocos embriones por placa para que crezcan mejor. Los huevos que no se hayan fecundado se eliminan ya que pueden inducir la muerte de los que estén en su proximidad. Los embriones en desarrollo se mantienen en una incubadora a 28,5°C, la temperatura establecida para su correcto crecimiento, hasta el momento de sacrificarlos para proceder a realizar los estudios pertinentes. La determinación exacta de los distintos estadios utilizados se realizó según las características descritas por Kimmel y cols. (1995). En todos los experimentos se tomaron medidas adecuadas para minimizar el dolor y el estrés de los animales que fueron manejados según las directrices del Consejo de la Unión Europea 2010/63/UE y la legislación española vigente para el uso y cuidado de animales RD 53/2013 así como la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio adoptada y promulgada por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos.

Exposición de los embriones de pez cebra a fármacos

Para el estudio de los efectos de la morfina sobre el desarrollo de los embriones de pez cebra, se ha utilizado un protocolo de tratamiento bien establecido en nuestro laboratorio (Sanchez-Simon, 2010a). Los embriones fueron expuestos a morfina y al antagonista opioide, naloxona. Los fármacos fueron añadidos directamente al medio de crecimiento E3. Las concentraciones finales utilizadas para la morfina y naloxona fueron 10nM y 1 µM, respectivamente.

Microinyección de morfolidos

Los morfolidos son oligonucleótidos modificados químicamente que mantienen la capacidad de unirse a una región del mRNA por complementariedad de bases. Mediante la unión a la región diana del transcrito se impide el avance de la maquinaria de traducción y, de esta manera, se silencia la expresión (knockdown) y, por tanto la función, de la proteína (Nasevicius y Ekker, 2000) en los embriones microinyectados o morfantes. La inyección de morfolidos (adquiridos en Gene Tools, Philomath, Oregon), se ha realizado según la metodología desarrollada por Nasevicius y Ekker (2000). Para ello se ha empleado un sistema de microinyección y micromanipulación diseñado especialmente para la inyección de embriones de pez cebra (Eppendorf), acoplado a un estereoscopio (Zeiss Discovery V8).

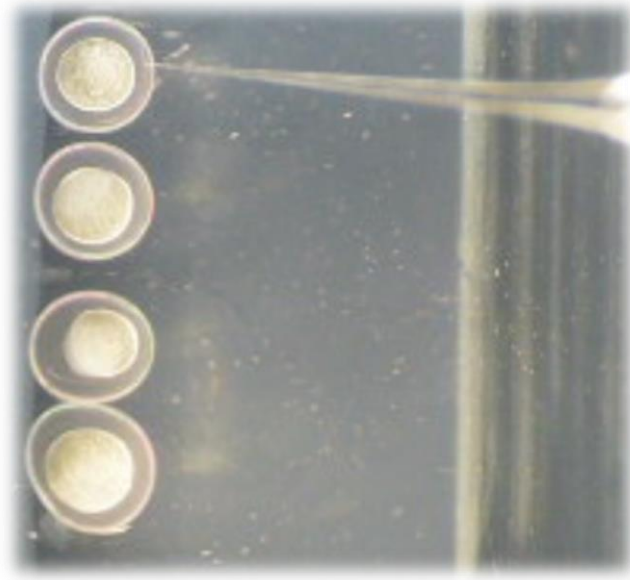


Figura 6. Microinyección de embriones de pez cebra en el estadio de una célula. La microinyección de las secuencias de morfolinós se realiza preferentemente en el vitelo para evitar posibles daños en el embrión

En primer lugar se debe determinar la concentración a la cual se van a inyectar los morfolinós. Para ello se pulsa el microinyector 10 veces, a un tiempo de 10 ms por pulso, en un microcapilar 1-1, es decir, con una capacidad total de 1 ml y una longitud de 33 mm, por lo que 1 mm representa 30 nl de solución. Se mide la cantidad de solución que se ha introducido con los 10 pulsos en el capilar y se calibran los parámetros de presión y tiempo de pulso adecuados al volumen inyectado, calculando que en cada pulso se inyectan 3 nl de solución en el embrión. Una vez determinada la concentración que se está empleando, se analiza la supervivencia embrionaria y posibles malformaciones que den lugar a resultados falseados. Para evitar esta situación, se inyectan diferentes concentraciones, hasta encontrar aquella que, produciendo el menor daño posible, provoque el mayor efecto en el gen que se quiere estudiar. Los embriones se inyectan entre los estadios de 1 a 4 células, preferentemente en el vitelo (Fig. 6), para así evitar la disrupción celular y disminuir el porcentaje de muerte embrionaria. Los embriones inyectados se mantienen en las mismas condiciones que los no inyectados, es decir a 28,5 °C y en medio E3. En este estudio todos los morfolinós (Tabla 2) fueron microinyectados a una concentración de 0,3 μM .

Gen diana	Secuencia del morfolino
<i>oprml</i>	AATGTTGCCAGTGTTTTCCATCATG
<i>mir132</i>	ACAGTAACAATCTAATGCCACGGTC
<i>mir212</i>	AGCCATGACTGTAGACTGTTACTGT

Tabla 2. Secuencias de morfolino para el silenciamiento de *oprml*, *mir132* y *mir212*.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

La técnica de PCR cuantitativa requiere de varios pasos previos para un correcto desarrollo de la misma. Estos pasos son detallados a continuación.

Extracción de RNA

Los embriones son congelados en nitrógeno líquido y conservados en 1 ml de Trizol (TRIZOL® LifeTechnologies), por cada 50-100 mg de tejido, a -80 °C para evitar que el RNA se degrade. El homogeneizado se realiza utilizando un Polytron o jeringuilla, según el tamaño del embrión, manteniendo la muestra en hielo para evitar que el aumento de temperatura degrade el RNA. Una vez homogeneizada la muestra se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir una completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se añaden 0,2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol agitando fuertemente los tubos para mezclar ambos líquidos durante 15 segundos. Se dejan reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugan 15 minutos a 12000 x g y a 4°C. Tras la centrifugación la solución se separa en tres fases: en la inferior o fase orgánica, de color rosado, permanecen el DNA genómico y las proteínas; la interfase, en la que quedan componentes lipídicos y la fase superior acuosa en la que se encuentra exclusivamente el RNA. La fase acuosa se transfiere a otro tubo para precipitar el RNA, proceso que se realiza añadiendo isopropanol (0,5 ml por ml inicial de Trizol). Se incuban las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se centrifugan a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C. El RNA precipitado forma un *pellet* de consistencia tipo gel transparente, se lava con etanol al 70% (1 ml etanol por ml de Trizol) y se centrifuga a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante y se deja evaporar para que el *pellet* no contenga restos de etanol. Por último, se resuspende en 30 µl de agua libre de RNAsas utilizando un termobloque a 60°C.

Tratamiento con DNAasa

Los RNA obtenidos de las muestras son tratados con DNasa I (Roche) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Aproximadamente 10-15 µg de RNA en 20,5 µl de RNA total, se tratan con 1 µl de DNasa I 10 U/µl y 2,5 µl de tampón de DNasa I 10X (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂; pH 7.9). Esta reacción se incuba a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, con la finalidad de disminuir la actividad de la endonucleasa se añade 1 µl de EDTA 0,2M (agente quelante que inhibe la actividad enzimática) y para inactivarla completamente se incuba la reacción durante 10 minutos a 75°C.

Procesado de muestras de RNA para la determinación de miRNAs mediante qPCR

Dada la naturaleza de los miRNAs, su pequeño tamaño y la dificultad de su detección, es necesario establecer un protocolo concreto de trabajo para estas moléculas. Para ello se adaptó el protocolo de Balcells y cols., (2011) que consiste en la adición de una cola de poli-Adenina antes de la retrotranscripción de la secuencia que, además, se realiza utilizando como molde el oligonucleótido derecho o *primer reverse* diseñado para la qPCR de las secuencias estudiadas.

Reacción de poliadenilación

La elongación de los extremos 3' de las moléculas de RNA comienza con la adición de 1µl de PoliA Polimerasa de E.coli (NEB) al RNA obtenido, además de 1µL de ATP 10mM y 2µl del tampón de reacción 10X, para un volumen final de 20µL. Los ciclos del termociclador son de 10 minutos a 37°C (reacción de poliadenilación) y 20 minutos a 65°C (inactivación de la enzima).

Retrotranscripción del RNA poliadenilado

Para la síntesis de cDNA a partir del RNA poliadenilado se emplea el kit comercial M-MuLV RT (NEB). Para ello, se parte de 2µg de RNA poliadenilado, 2µL del *Primer Reverse* 40µM y 4µL del mix de dNTPs (2,5 mM cada uno de ellos) y agua bi-destilada (ddH₂O) hasta un volumen final de 16µL. Esta primera mezcla se calienta durante 5 minutos a 65°C. Después, se mantiene la mezcla en hielo y se añade 2µL de tampón

10X, 1µl de M-MuLV RT y 1µL de un inhibidor de RNAsas. Una vez mezclado se incubaba a 42°C durante 1 hora, seguido de una inactivación a 90°C durante 10 minutos.

Procesado de muestras de RNA para la detección de *oprm1* y *sox2*

La retrotranscripción de los genes *oprm1* y *sox2* se realizó con el kit High Capacity Reverse Transcription Kit (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 2 µg de RNA se diluyen en un volumen final de 10 µl junto a 2 µl de tampón de Rt 10X, 0,8 µl de dNTP mix 25X, 2 µl de 10X random primers, 1 µl, de Multiscribe Reverse transcriptase (enzima), 1 µl RNasa inhibitor (inhibidor de RNAsas) y 3,2 µl de agua libre de nucleasas.

La reacción de retrotranscripción (Volumen final 20 µl) se lleva a cabo en un termociclador con las siguientes condiciones: 25°C 10 minutos, 37°C 120 minutos, 85°C 5 minutos y un ciclo final de 4°C.

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (*primers*) utilizados en el análisis por qPCR se muestran en la tabla 3.

Gen diana	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>mir132</i>	AGTAAACAGTCTACAGCCATG	TCCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTCG
<i>mir212</i>	CGCAGTAACAGTCTACAGTC	CCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCCAT
<i>sox2</i>	TGGACCAACGGAGGCTAC	CGTTCAAACCTCGGGTGCT

Tabla 3. Secuencias de los *primers* utilizados en la técnica de qPCR.

Oligonucleótidos para miRNAs

El diseño de los oligonucleótidos para la qPCR de miRNAs se realizó siguiendo las indicaciones descritas por Balcells y cols. (2011) en el que se tiene especial cuidado en la secuencia del extremo 3' del oligonucleótido. Brevemente: se descartan todas las adeninas del extremo 3' de la secuencia del miRNA. Se elige el *primer forward* más

largo posible (entre 12 y 18 bases) dejando por lo menos 4 bases en el extremo 3' para el diseño del *primer reverse*. Las 5 últimas bases del extremo 3' del *primer forward* deben incluir 2-3 residuos de adenina o timina. Además, las 3 últimas bases de este mismo extremo deben incluir 1-2 adeninas o timinas. Si la temperatura de anillamiento (TM) del *primer reverse* es menor a 50°C se añaden las siguientes bases: G, A, C, G, C en el extremo 5', hasta lograr la TM deseada. Elegir la mayor secuencia de *primer reverse* posible (4-8 bases) que no sea complementaria con el extremo 3' del *primer forward*. Diseñar el *primer reverse* de acuerdo a los pasos anteriores. Añadir 15 timinas al extremo 5' del *primer reverse*. Comprobar su TM añadiendo las siguientes bases hasta conseguir la TM requerida: G, A, C, C, T, G, G, A, C.

Oligonucleótidos para otros genes

Los oligonucleótidos utilizados en las qPCRs de *oprml* y *sox2* fueron obtenidos de la base de datos Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche).

Análisis por qPCR

Para la medida de los niveles relativos de expresión de los microRNAs y otros genes se utiliza el fluoróforo SYBR®Green (LifeTechnologies), un agente intercalante que emite fluorescencia cuando se une al DNA de doble cadena. El SYBR®Green Master Mix contiene la DNA polimerasa AmpliTaq Gold y los nucleótidos, de manera que sólo hay que añadir los oligonucleótidos, que determinan la secuencia a amplificar, el cDNA (1 µl del producto de retrotranscripción) y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final de 20 µl. Programa que se emplea en el termociclador: primer paso de activación de la enzima 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos: desnaturalización, 3 segundos a 95°C, anillamiento y extensión, 30 segundos a la temperatura de anillamiento de los oligonucleótidos utilizados.

Análisis estadístico

El análisis inicial de los resultados se realiza con el programa SDS 1.31 (Applied Biosystems). Para el cálculo de la eficiencia y el análisis de la PCR cuantitativa relativa se usa el programa REST 2009 (Pfaffl y cols., 2002). Para el análisis estadístico y la construcción de gráficas y tablas de datos, se emplea el programa Prism V. 5.01 (GraphPad).

Western blot

Extracción de proteínas para Western Blot a partir de embriones de pez cebra

Antes de extraer las proteínas es necesario descorionar y quitar el vitelo a los embriones menores de 72 hpf. Para ello se sigue el siguiente proceso:

Se descorionan los embriones a mano o usando 1 mg/ml de pronasa disuelta en medio E3, pipeteando arriba y abajo. A continuación se lava a los embriones decorionados 3 veces con solución Ringer fría. Se desvitelan los embriones a mano o transfiriéndolos a una solución de PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0.3 mM (30 μ l de PMSF 100 mM, previamente disuelto en isopropanol, en 10 ml de Ringer) y se quita el vitelo aspirando con una pipeta Pasteur cuya punta tenga el diámetro aproximado del vitelo. Se lavan los embriones 3 veces con solución Ringer fría y se congelan los embriones con nitrógeno líquido para evitar la degradación de las proteínas. En este punto los embriones pueden almacenarse durante un tiempo prolongado a -80°C .

Para realizar la extracción de proteínas se añaden 200 μ l del tampón de extracción de proteínas RIPA (10 mM tris pH 7.4, 2% triton X 100, 1 mM PMSF, 1 μ l/ml de inhibidores de proteasas [sigma]). Para romper el tejido se aspiran los embriones con jeringuillas (1 ml) y se centrifuga durante 10 minutos a 4°C y 10000 G. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo para proceder a cuantificar las muestras.

Cuantificación de proteínas mediante el método Bradford

Primeramente, es necesario preparar el estándar mediante diluciones seriadas de BSA (Albúmina sérica de bovino) a partir de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), estas muestras serán medidas en primer lugar por el espectrofotómetro Nanodrop 2000C (ThermoFisher). Además hay que realizar un blanco con NaCl (15 μ l NaCl 0.9% más 500 μ l 1x Quick Start Bradford (Biorad) incubado, por lo menos, 5 minutos). Las muestras se preparan diluyendo 15 μ l de cada una (dilución inicial 1:10 recomendada según la cantidad de embriones usados en la extracción y si la absorbancia es alta) e incubándolas durante el mismo tiempo que el blanco. A continuación se puede proceder a leer su absorbancia a 595 nm.

Preparación de los geles para la separación de proteínas: Separador (*Resolving gel*) y concentrador (*Stacking gel*)

Los reactivos utilizados en cada uno de estos geles varían en su concentración según el tipo de muestra estudiada. A continuación, se presentan estos reactivos con las concentraciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio:

Resolving gel. Para una concentración final de acrilamida del 15% en 10 ml, las cantidades necesarias de reactivos son las siguientes: H₂O 1,1 ml, Acrilamida (30% [29:1]) 5 ml, Tris-HCl (pH 8.8) 1M 3,75 ml, SDS (dodecilsulfato sódico) 10 % 100 µl, AMPS 10 % (Persulfato de amonio) 50 µl, TEMED (Tetrametiletilendiamina) 5 µl.

Stacking gel. Para una concentración final de acrilamida al 4% en 5 ml, las cantidades necesarias de los reactivos son las siguientes: H₂O 3,6 ml, Acrilamida (30% [29:1]) 664 µl, Tris-HCl (pH 6.8) 1M 630 µl, SDS 10 % 50 µl, AMPS 10 % 25 µl, TEMED 5 µl.

Para la detección de Bdnf la concentración del *resolving gel* utilizado fue del 15% mientras que para TrkB se utilizó una concentración final del 10% debido al mayor peso molecular de esta proteína.

Western blot

Previamente, es necesario elegir la concentración deseada de proteínas, en nuestro caso 40 µg totales, y mezclarlas con el tampón de carga (SDS 10% 600 µl, Glicerol 600 µl, β-mercaptoetanol 150 µl, Tris-HCL 1M pH: 6.8 120 µl y azul de bromofenol 30 µl) al 1x. Además se hierven y sonicán las muestras durante 5 minutos.

Las muestras se cargan en el gel junto con un marcador de peso molecular (Biorad). La electroforesis de proteínas se lleva a cabo con el tampón Laemmli 1X (pH: 8.3) [Tris-base 25 mM (15,14 g), Gly 192 mM (71,1 g), SDS 10% 50 ml (0,1%) ddH₂O hasta 500 ml]. La cubeta de electroforesis se conecta a una fuente que permita utilizar un voltaje de 120 V siendo la duración aproximada del proceso de 2 horas.

La electrotransferencia de las proteínas a la membrana se lleva a cabo usando los casetes de transferencia en los que se debe emplear la presión necesaria para un correcto paso de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa. Este proceso se realiza a

80V durante 2 horas y media, aproximadamente, utilizando un tampón de transferencia (Tris-base 25 mM [15,14 g], Gly 192 mM [71,1 g], ddH₂O Hasta 500 ml).

Para comprobar que el proceso ha ido bien, se procede a una tinción con el colorante rojo Ponceau a una dilución del 0,1%, que puede ser fácilmente lavado con el tampón TBS-tween (Tampón Tris Salino-tween). Para la detección de la proteína de interés, la membrana deberá ser previamente bloqueada con una solución de leche y TBS-tween al 5%. Este bloqueo dura una hora a temperatura ambiente y termina con lavados sucesivos con TBS-tween. La temperatura y tiempo de incubación con el anticuerpo primario, disuelto en solución de anticuerpos, varían según la proteína estudiada. Para la detección de este anticuerpo, es necesario realizar una última incubación con un anticuerpo secundario unido a una peroxidasa de rábano (Santa Cruz) a una concentración de 1:10000 durante dos horas. Tras lavar con TBS los restos de anticuerpo secundario se puede proceder al revelado de la membrana gracias al reactivo ECL al que se le añade 1 µl por cada 5 ml de agua oxigenada (H₂O₂). La reacción puede detectarse con un equipo de quimioluminiscencia.

En este estudio, los anticuerpos primarios monoclonales de ratón (BDNF y TrkB) fueron utilizados a una dilución 1:500. El anticuerpo de BDNF fue aportado por el Dr. Juan Carlos Arévalo (Instituto de Neurociencias de Castilla y León). Este anticuerpo fue sintetizado a partir de los clones de hibridoma (BDNF mAb #9, *Developmental studies hybridoma bank*) obtenidos por Kolbeck y cols. (1999). El anticuerpo de TrkB (BD Biosciences) fue una generosa aportación de la Profesora Aránzazu Tabernero Urbieta (Instituto de Neurociencias de Castilla y León).

Inmunohistoquímica *in toto*

Para realizar las técnicas inmunohistoquímicas sobre embriones, éstos deben ser previamente tratados con 1-fenil-2-tiourea (PTU) al 0,003%, con el fin de inhibir la pigmentación que aparece antes de las 24 hpf. La PTU inhibe a la enzima tirosinasa uniéndose a los iones de cobre e interaccionando con las cadenas laterales de su sitio activo (Klabunde y cols., 1998). Además, los embriones deben ser descorionados a la edad a la cual se vayan a sacrificar. Teniendo en cuenta nuestros estudios previos, en este trabajo se eligió el estadio de 48 hpf para analizar tanto proliferación neuronal como apoptosis, ya que en este estadio el SNC ya está formado. Una vez descorionados,

los embriones se fijan con una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (Tampón fosfato salino) 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM NaHPO, 2mM KHHPO en agua destilada) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavan tres veces en PBS 1X y se guardan en metanol a -20°C al menos 24 horas. Pasado este tiempo, los embriones se rehidratan, lavándolos con soluciones que aumentan progresivamente la concentración de PBS, disminuyendo la de metanol: 1) 75% metanol-25% PBS; 2) 50% metanol-50% PBS; 3) 25% metanol-75% PBS. 4) PBS 1X-0,1% Tween 20 (detergente). Para facilitar la penetración del anticuerpo, se realiza una digestión con proteinasa K cuya duración dependerá de la edad de los embriones utilizados. La reacción de digestión se para con PBS-tween y termina con una fijación de los embriones en PFA al 4%. Tras bloquear, por lo menos, dos horas con una solución preparada a base de PBS-tween 0,1%, 10% de suero normal de caprino y 10% de DMSO, se puede proceder a la incubación con el anticuerpo disuelto en esta misma solución a la concentración deseada. El tiempo y temperatura de incubación varían según el anticuerpo elegido. Se añade entonces el anticuerpo secundario, utilizando como solución la de bloqueo, dejándola incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.

En este caso el anticuerpo primario de elección fue el de Histona 3 fosforilada (AbCam) a una concentración de 1:1000. Como anticuerpo secundario se utilizó Alexa-Fluor-594 (ThermoFisher) a una dilución 1:1000. Para la contratinción de núcleos se realizó una incubación con DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) a una dilución 1:000 al mismo tiempo que el anticuerpo secundario.

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)

La técnica empleada para determinar la apoptosis se realizó mediante la utilización del kit ApopTag Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection kit (Millipore), siguiendo el protocolo del fabricante y modificado para embriones de pez cebra enteros. Al igual que en la inmunohistoquímica los embriones se descorionan, se fijan y se almacenan en metanol absoluto a -20°C. Luego se rehidratan en diluciones sucesivas de metanol/PBS, se permeabilizan con proteinasa K (10µg/ml) y se fijan con PFA. A continuación se procede a la permeabilización con 0,1% Tritón X-100 (en el 0,1% de citrato de sodio recién preparada) durante 1 hora a temperatura ambiente. La Solución enzimática y del

marcaje se mezcla a una razón de 1:5. Esta mezcla de la reacción TUNEL, se introduce en el eppendorf que contiene a los embriones y se incuba en oscuridad durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se realizan tres lavados de 5 minutos (cada uno) en PBS. Finalmente, se añade la solución de sustrato y un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fluoresceína (Roche, 1:500).

Cultivos primarios de neuronas

Los cultivos primarios fueron obtenidos de embriones de pez cebra de 42 hpf según el protocolo establecido por Chen y cols. (2013). Brevemente: los embriones se esterilizan durante 5 segundos en etanol al 70% y se transfieren a medio E3. Se elimina el corion y se extraen los cerebros usando jeringuillas de insulina para obtener el tejido. Para cada grupo experimental es necesario extraer por lo menos 10 cerebros. Las muestras se transfieren a un medio de disociación (NaCl 115 mM, KCl 2,5mM, EDTA 0,4 mM, Hepes 8 mM, Tripsina 0,05% pH 7.5) en el que se mantienen a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se transfieren las muestras a un tubo con 5 μ l de medio de cultivo (Medio Leibovitz [GIBCO] al 85,9%, suero fetal bovino 2%, penicilina/estreptomicina al 0,4% y solución salina al 12,5%). Mediante pipeteo suave se disgrega el tejido y se procede a su cultivo en placas. Para este trabajo, las células obtenidas se incubaron durante 48 horas a 28°C en presencia en medio de cultivo, o medio de cultivo con morfina (1nM) y/o BDNF recombinante (50 ng/ μ l).

Inmunocitoquímica

El análisis inmunocitoquímico de las células obtenidas del cultivo primario se realizó según las condiciones descritas por Chen y cols. (2013). En resumen: las neuronas se fijaron en PFA al 4% durante 20 minutos y fueron bloqueadas con tampón de anticuerpos y suero caprino al 5%. Para la detección de TrkB se utilizó una dilución 1:250. Además se utilizó To-PRO como marcador de núcleos (1:1000, ThermoFisher) y Alexa fluor 594-faloidina para marcar somas celulares (1:10, ThermoFisher). Las imágenes de los cultivos primarios fueron tomadas utilizando un microscopio de célula viva (Zeiss).

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) acoplada a secuenciación de alto rendimiento (*next generation sequencing*)

El protocolo de ChIP-seq fue adaptado a las muestras utilizadas partiendo de numerosos protocolos previamente establecidos. Sin embargo el referente fundamental en nuestro estudio fue el protocolo descrito por Bogdanović y cols. (2013). Este protocolo fue reajustado según las aportaciones tomadas de Lindeman y cols. (2009), Aday cols. (2011) y Lindeman y Collas (2012). Además a la luz de los resultados que se obtuvieron hemos hecho modificaciones propias que incluyen tiempos de sonicación e incubación diferentes y el uso de jeringuillas para la obtención del DNA.

Preparación de embriones

Para el presente estudio se emplearon 500 embriones descorionados en cada grupo experimental. Para realizar el *crosslinking* celular o unión de las proteínas a las regiones del ADN se utilizan 4.6 ml E3 y 4 ml de PFA fresco al 4% sobre los embriones manteniéndolos en agitación durante 15 minutos.

Posteriormente se añaden 1,074 µl de glicina 1M (Filtrada) y se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT). A continuación se elimina el sobrenadante y se resuspenden los embriones en PBS 1x frío (3 veces). Estos embriones pueden ser congelados en este punto a -80°C o ser utilizados en el paso de lisis celular.

Pre-bloqueo de los gránulos magnéticos y unión del anticuerpo

En este protocolo es necesaria la preparación previa de los gránulos magnéticos (Dynabeads Protein G, LifeTechnologies) utilizados para la precipitación. Esta preparación debe hacerse en todo momento en hielo. Para ello se mezclan los gránulos magnéticos, cogiendo 125 µl (por cada anticuerpo) y lavando en 1 ml de solución de bloqueo (0.5% BSA en 1x PBS). A continuación se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos. Se deben realizar dos lavados posteriores con 1,5 ml de solución bloqueo, resuspendiendo bien tras cada lavado. Posteriormente, se precipitan los gránulos con el imán y se descarta el sobrenadante. Para realizar la incubación con el anticuerpo se debe resuspender los gránulos en 125 µl de solución de bloqueo y añadir el anticuerpo. Por último se incuba el anticuerpo a 4° C mínimo 4 horas durante al menos 16 horas

(*overnight*) en agitación. Las cantidades de los anticuerpos utilizados por cada grupo experimental se muestran en la tabla 4.

Anticuerpos	Cantidad
Anti-H3K27me3	10 μ l
Anti-H3K27ac	25 μ l

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para las modificaciones de histonas estudiadas y cantidades empleadas en cada grupo experimental.

Tras realizar la incubación de los anticuerpos se puede proceder a recoger los gránulos magnéticos con el imán y eliminar el sobrenadante. Se lava en 1,5 ml de solución de bloqueo y se repite este paso dos veces más. Por último se resuspenden los gránulos con el anticuerpo en 135 μ l de solución de bloqueo.

Preparación de cromatina

En este paso es muy importante añadir inhibidores de proteasas a todos los tampones de lisis justo antes de usarlos (Stock de Complete 50X, Roche: 1 tableta/ml PBS 1X; Se puede almacenar a -20°C). Los pasos seguidos en este punto son los siguientes: se resuspenden los embriones en 2 ml de tampón de lisis celular (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM NaCl, IGEPAL al 0,5%. Disolver en PBS 1X con inhibidores de proteasas). Se homogeneizan los embriones con jeringuilla para que el homogeneizado tenga mejor calidad. Se mantienen en hielo durante 15 minutos y se re-homogeneizan cada 5 minutos. Se transfiere la muestra a un falcon de 15 ml y se centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C (Precipitación nuclear). Se resuspende el *pellet* obtenido en 1 ml de tampón de lisis nuclear (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, SDS al 1%. Se disuelve en PBS 1X con inhibidores de proteasas) Se pipetea para romper los núcleos y se incuba la muestra en hielo durante 10 minutos. Se añaden dos volúmenes (2 ml) de solución de inmunoprecipitación (16,7 mM Tris-HCl pH 7,5, 167 mM NaCl, 1,2 mM EDTA, SDS 0.01%. Disolver en PBS 1X con inhibidores de proteasas.) Posteriormente, se dividen las muestras en eppendorfs de 2 ml (1,5 ml de muestra en cada uno). Se prepara un baño de agua helada y se procede a sonicar: Se realizan ciclos de 30'' ON / 30'' OFF durante 20' para cada uno de los eppendorfs obtenidos. El paso de sonicación puede variar según el tipo de muestra utilizada y es necesario estandarizarlo. A continuación, se añaden 120 μ l de Triton X-100 a cada eppendorf sonicado. Se

centrifuga a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se combinan los sobrenadantes de ambos tubos (3ml) en falcon de 15 ml. Se guardan 50 µl de cada muestra como control y se congelan a -20°C. Los sobrenadantes obtenidos con el DNA fragmentado pueden ser almacenados a -80°C. Antes de congelar es necesario comprobar que los fragmentos obtenidos tienen el tamaño y la calidad deseada. Para ello 10 µl de las muestras se corren en un gel de agarosa al 1,5% y se analiza de tal forma que la mayor parte del genómico obtenido se encuentre en el tamaño deseado (aproximadamente 200-600 pares de bases [pb] es un tamaño óptimo) (Figura 7). Este paso puede realizarse antes de la adición del Triton con el fin de continuar con la sonicación si es necesario.

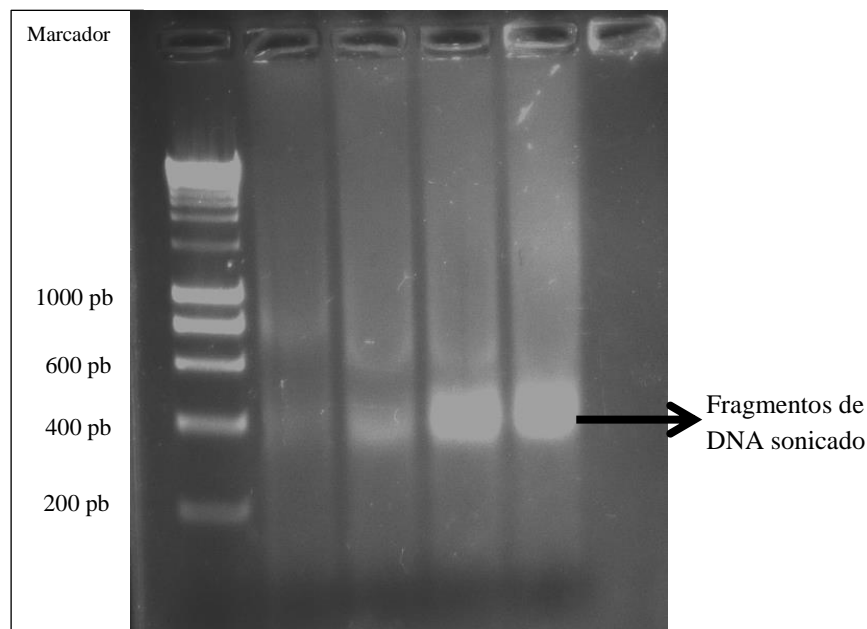


Figura 7. Fragmentos obtenidos tras la sonicación del DNA para la técnica de inmunoprecipitación de cromatina. Se puede observar que la mayor parte del DNA sonificado se ha fragmentado hasta un tamaño homogéneo de 400 pb. Las bandas blancas a lo largo son restos de DNA insuficientemente fragmentados. El primer carril muestra el marcador de peso molecular.

Inmunoprecipitación de cromatina

Para la inmunoprecipitación de cromatina se dividen los 3 ml obtenido tras sonicar en 5 tubos de 1,5 ml (0,6 ml en cada). Se añaden 25 µl del anticuerpo unido a los gránulos a cada tubo y se deja incubar *overnight* en rotación a 4°C.

Lavado, elución y reversión del *cross-linking*

En este paso es necesario precipitar los gránulos magnéticos de cada tubo con el imán y eliminar el sobrenadante. Tras esto se añade 1 ml de tampón RIPA y se agita con cuidado para resuspender los gránulos. Posteriormente, se vuelven a precipitar los gránulos con el imán y se elimina el sobrenadante. Este paso se repite 4 veces. A continuación se lava con TBS 1X, se precipitan los gránulos magnéticos eliminando el sobrenadante, se resuspenden en 200 µl de TBS 1X y se realiza un pool con los gránulos de los 5 tubos. Tras esto, se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos y aspira cualquier resto de TBS. A este precipitado se le añaden 660 µl de tampón de elución. Seguidamente, se separan los complejos proteína-DNA de los gránulos magnéticos durante 10-15 minutos a 65°C dando pequeños vórtex cada 2 minutos. Se centrifuga a 14000 rpm durante 1 minuto y se transfieren 650 µl del sobrenadante a un tubo de 1,5 ml. Por último se añaden 34 µl de NaCl 4M y se revierte el *crosslinking* durante 6 horas u *overnight* a 65°C. En este punto se debe incluir la muestra control (guardada tras el sonicado).

Precipitación del DNA

Con el fin de obtener el DNA que ha quedado tras la inmunoprecipitación (DNA que estaba asociado a las modificaciones estudiadas) es necesario realizar una precipitación mediante el uso de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (1 volumen incubado durante 5 minutos). Esta precipitación se favorece añadiendo 20 µl de glucógeno. Se añade 1/10 del volumen de NaAc 3 M y 2 volúmenes de etanol al 100%. Se precipita centrifugando a 14000 rpm durante 10 minutos. Se lava el *pellet* con etanol al 75% y tras dejar que se evapore el etanol se resuspende el *pellet* en 70 µl de Tris-HCl 10 mM, pH 8.

Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca utilizando la plataforma: Illumina HiSeq 2500 y el tipo de secuenciación Pair-end (100 x 2). Para ello fue necesario preparar las librerías de DNA a partir de las muestras obtenidas de la técnica de CHIP cuyo control de calidad se muestra en la tabla 5.

Nombre de la muestra	Concentración (ng/ μ l)	Volumen tras QC (μ l)	Cantidad (μ g)
CTRL_UNT	11,70	54,00	0,63
H3K27MeUNT	0,23	54,00	0,01
H3K27AcUNT	0,53	58,00	0,03
CTRL_MORP	2,25	53,00	0,12
H3K27MeMORP	0,30	57,00	0,02
H3K27AcMORP	1,05	56,00	0,06

Tabla 5. Control de calidad de DNA total en el que se cuantificó la concentración de cada muestra y la cantidad de DNA total en μ g obtenida. CTRL_UNT: DNA no inmunoprecipitado procedente de embriones no tratados con morfina. H3K27MeUNT: DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo H3K27me3 procedente de embriones no tratados con morfina. H3K27AcUNT: DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo H3K27Ac procedente de embriones no tratados con morfina. CTRL_MORP: CTRL_UNT: DNA no inmunoprecipitado procedente de embriones tratados con morfina. H3K27MeMORP: DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo H3K27me3 procedente de embriones tratados con morfina. H3K27AcMORP: DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo H3K27Ac procedente de embriones tratados con morfina.

Análisis experimental

El análisis bioinformático de las muestras se realizó en el servicio de bioinformática de la Universidad de Salamanca (NUCLEUS). Las gráficas de calidad de las muestras se realizaron con el programa FASTQC (Andrews, 2010) (Figura 8). Este análisis permitió determinar la correcta calidad de las muestras secuenciadas aunque se descartaron las primeras 5 bases de cada lectura puesto que su calidad era menor en comparación a la del resto. El alineamiento se hizo sobre la versión del genoma GRCz10/danRer10, con el programa Bowtie2 v2.1.0 (Langmead y Salzberg, 2012), con los parámetros “-N 1 -5” que permitían una base errónea en el alineamiento. Solo se emplearon las lecturas concordantes con su pareja y que solo se alinean en una localización del genoma. La búsqueda de picos se realizó con el programa MACS2 v2.0.9 (Zhang y cols., 2008) en modo *peak* y modo *broad*. Finalmente, los resultados fueron representados con el paquete de R RJSplot y se realizó su estudio ontológico (Gene ontology: Ashburner y cols., 2000).

Una vez recibidos estos resultados en nuestro laboratorio, se estudiaron los genes obtenidos en cada modelo de búsqueda de picos y finalmente se optó por el modo *peak* debido a su mayor especificidad. A continuación se realizó el estudio inicial de todos los genes tanto en situación control como en aquellos que mostraban un enriquecimiento (sobre-expresión) de las marcas epigenéticas estudiadas tras la exposición a morfina. Además, se estudiaron las regiones adyacentes a cada uno de los genes que presentaban dichos enriquecimientos con el fin de determinar una posible regulación sobre promotores de genes cercanos (Ensembl/ Promo-Transfac V. 8.3). Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos tras la secuenciación, se recurrió a los siguientes trabajos: Huang y cols., 2009; Tipney y Hunter, 2010; Huntley y cols., 2014; Chen y cols., 2015).

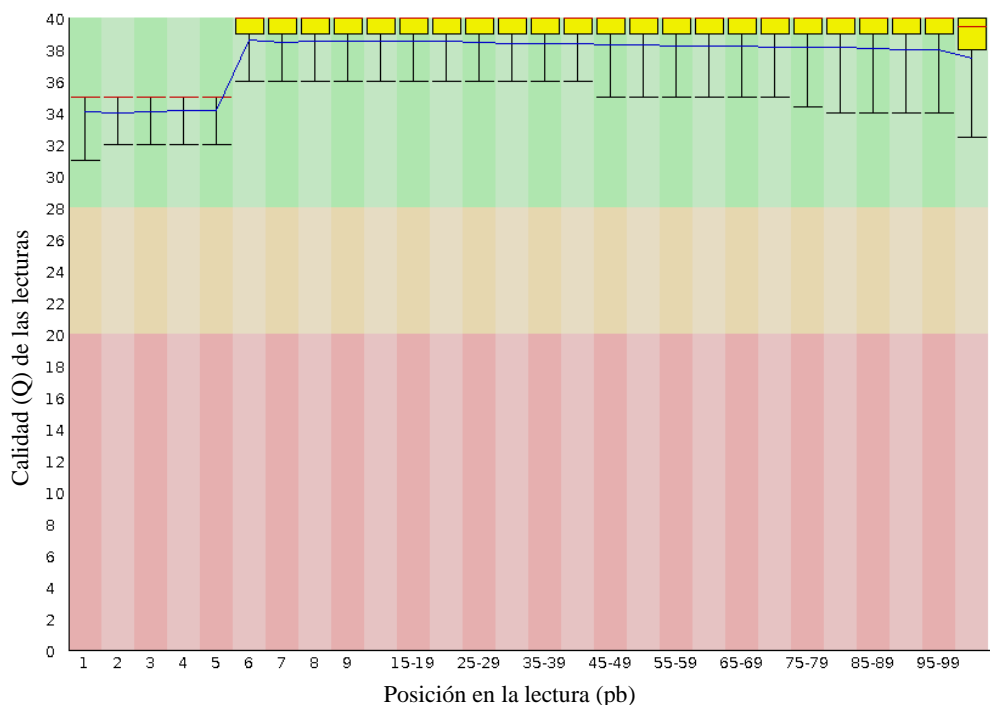


Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes de que muestra la distribución de los valores de calidad (Q) para cada base secuenciada de la lectura total. Todas las muestras pasaron satisfactoriamente el control de calidad (Zona Verde). Se estableció eliminar las primeras 5 bases (1-5) de las lecturas en el alineamiento, ya que como se observa en la imagen las primeras lecturas mostraban una calidad peor (Cercana a la zona amarilla) en comparación con el resto. En la zona roja se sitúan las muestras de peor calidad. En nuestros experimentos no aparecieron muestras con una calidad tan baja.

Análisis de la metilación del DNA: Conversión de bisulfitos

Extracción de DNA genómico (gDNA)

La obtención de gDNA se realizó con el kit PureLink genomic DNA (ThermoFisher) siguiendo las indicaciones del fabricante. La cuantificación y pureza del gDNA obtenido se midieron con el Nanodrop 2000c.

Conversión de bisulfitos

En esta técnica se utiliza la propiedad del bisulfito de convertir citosinas no metiladas en uracilos. Por tanto, tras el proceso de tratamiento con bisulfito la citosinas metiladas quedarán no aparecen alteradas con respecto a la secuencia de DNA original.

La técnica de conversión de bisulfitos se realizó según el protocolo establecido por el kit EZ DNA methylation kit (Zymo Research).

Diseño de *primers*

Los *primers* fueron diseñados teniendo en cuenta los requisitos necesarios para este tipo de oligonucleótidos debido a las características de las muestras a analizar (Darst y cols., 2010). Este diseño se realizó con ayuda de la herramienta informática Bisulfite Primer Seeker. Los *primers* utilizados para la determinación de *nestin* mediante PCR anidada se muestran en la tabla 6.

Gen diana	Forward	Reverse
<i>nestin</i> (Fragmento externo)	AATGAAGATGTATGGTGTGT ATGTTTTTAA	ACTATACAAAACCTTCGACCCTCCAAA ATTAAAT
<i>nestin</i> (Fragmento interno)	TGTTGGTTTTTTTTTTTTTTTT TATTTTAGTAAGTTG	ATACCATTCTCTACTCTACCCAAACC

Tabla 6. Secuencias de los *primers* utilizados en la técnica de PCR anidada para la detección de secuencias de gDNA convertidas con bisulfito.

PCR anidada (*Nested PCR*)

En la PCR anidada se someten las muestras a dos rondas de amplificación usando dos pares de *primers* uno de los cuales está diseñado dentro de la secuencia amplificada por el primero. En nuestros experimentos, no vimos diferencia entre usar producto purificado de PCR y 1µl de la PCR directamente sobre añadido sobre el mix de la segunda amplificación. Por tanto, debido a la mayor sencillez del proceso se escogió esta última opción.

Para la consecución de un correcto amplicón en la PCR anidada de muestras procedentes de la conversión de bisulfitos, fue necesario utilizar la enzima ZymoTaq de comienzo en caliente (95°C). Además, la concentración y TM de los *primers* utilizados tuvo que estandarizarse hasta obtener los productos de PCR con la calidad requerida (Fig. 9). La amplificación óptima de *nestin* tras la conversión de bisulfitos se obtuvo utilizando todos los *primers* con una TM de 50°C y a una concentración final de 1µM. El programa de PCR utilizado fue: 95°C 11 minutos, 35 ciclos de 95°C 30 segundos, 50°C 35 segundos y 72°C 1 minutos y, por último, 72°C 7 minutos. En la figura se muestran las bandas obtenidas tras la segunda amplificación de *nestin*.

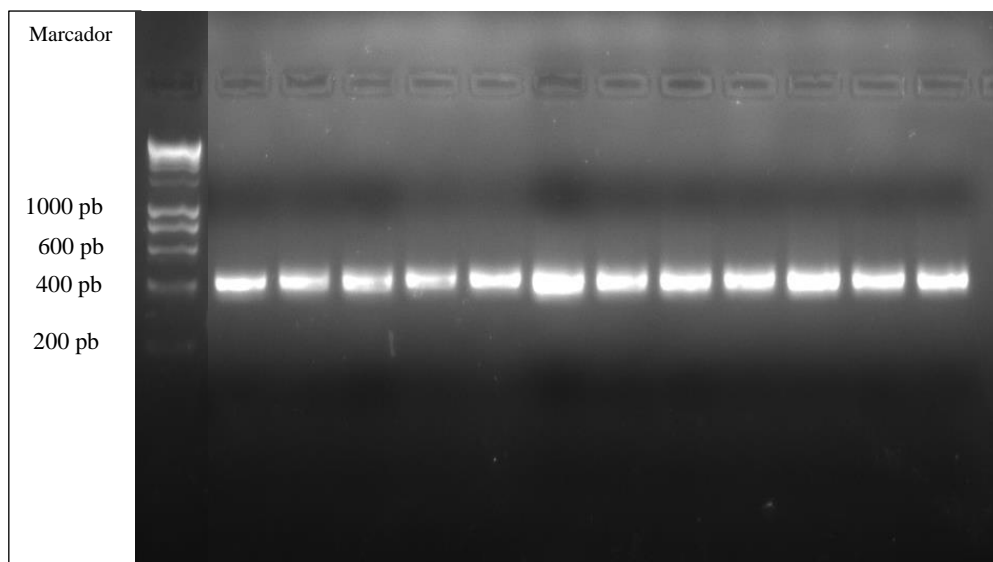


Figura 9. Producto de 12 PCR anidadas obtenido para el gen *nestin* (400 pb). A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular.

Preparación de medios y placas para el crecimiento bacteriano

Utilizamos distintos tipos de medios para el crecimiento bacteriano, por un lado medio sólido para el aislamiento de colonias y medio líquido para el crecimiento de una colonia. El medio LB sólido se prepara a partir de 5 g NaCl, 5 g triptona, 2.5 extracto de levadura 7.5 g agar enrasando a 500 ml con agua bidestilada (pH a 7.4) y esterilizando en autoclave. Posteriormente se añade el antibiótico ampicilina (500 µg/ml). El medio líquido LB se prepara sin agar. Los medios y las placas se mantuvieron a 4°C hasta su utilización comprobando periódicamente la posible aparición de contaminaciones.

Clonación

El producto de PCR se extrae con el kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Los fragmentos extraídos se ligan al vector de clonación pGEM-T® (Promega) con el kit de ligación correspondiente al plásmido, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reacción de transformación se utilizan bacterias de la cepa Top10F' de E. Coli (Invitrogen) según el protocolo establecido por la casa comercial, sembradas con los reactivos X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) e IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) para la posterior selección por color. De esta manera, las colonias con inserto son blancas, mientras que las que no lo han incorporado son azules debido al 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, producto de la degradación del X-gal. Las colonias seleccionadas se crecen en 4 ml de medio LB con ampicilina (50µg/ml) en agitación a 37°C durante 16 horas. Tras centrifugar el cultivo y descartar el sobrenadante, se realiza la extracción de los plásmidos con el QIAprep Spin miniprep kit (Qiagen) y se analizan las colonias seleccionadas para comprobar la presencia del inserto mediante PCR de las colonias. Los plásmidos se extraen con el kit Plasmid midiprep kit (Sigma) tras un segundo día de incubación de las colonias seleccionadas (con inserto) en 30ml de medio LB. Para determinar los cambios en la metilación, las muestras obtenidas de la extracción de *midiprep* se secuencian con la técnica Sanger.

Análisis de la metilación

El análisis de las secuencias obtenidas para cada clon estudiado se realiza partiendo del cromatograma observado con la herramienta informática Chromas (Technelysium). Una vez estudiada la calidad de la secuencia, el análisis estadístico para determinar las

diferencias en el grado de metilación de las muestras se lleva a cabo con el software BiQanalyzer.

Ensayo de luciferasa

Predicciones bioinformáticas

Las predicciones bioinformáticas para el estudio de los posibles sitios de unión de los miRNAs al mRNAs de las secuencias analizadas en este trabajo, se realiza con la herramienta informática M-Fold (Zuker, 2003). La finalidad de este análisis previo es determinar la estabilidad de dicha unión y el posible efecto fisiológico de la misma mediante el estudio de la unión en la región semilla (*seed*) del miRNA.

Ensayo de luciferasa

Clonación del plásmido para la validación de dianas de un miRNA

Para la clonación del extremo 3'UTR del mRNA que suponemos que es diana un miRNA emplearemos pmirGLO Vector (Promega), gracias al gen *luc2* (luciferasa de luciérnaga). Este constructo permite, mediante medidas de la quimioluminiscencia, detectar si un miRNA actúa sobre el mRNA diana. Para la clonación es necesario obtener un producto de PCR previo que será ligado dentro del vector de luciferasa. En este trabajo se han realizado dos ensayos de luciferasa ambos relacionados con exones (Exón 3 de *mecp2* y único exón de *sox2*). Los *primers* utilizados para amplificar mediante PCR convencional las secuencias de *mecp2* y *sox2* se muestran en la tabla 7. El protocolo de clonación es idéntico al descrito para la técnica de conversión de bisulfitos.

Gen diana	Forward	Reverse
mecp2 (tercer exón)	CTAGCTAGGTACCTAGTGCTGA GAGACATTGTTTCG	TCGACGAACAATGTCTCTCAGCACTA GGTACCTAG
sox2 (exon)	CTAGCTAGGTACCTAGGTGGC CTGTACGCAGTTGAAG	TCGACTTCAACTGCGTACAGGCCACC TAGGTACCTAG

Tabla 7. Secuencias de los *primers* utilizados en la técnica de PCR convencional para la clonación de las secuencias de *mecp2* y *sox2*.

Transfección de los plásmidos

Las células HEK293 se transfectan con los plásmidos wild-type usando Lipofectamina 2000®. Para ello, 300 ng del constructo se diluyen en 25µl de DMEM en combinación con *mimics* (Ambion) para los miRNAs 212 y 132 hasta una concentración final de 20nM. Estos miRNAs sintéticos actúan del mismo modo que los sintetizados por la propia célula, permitiendo evaluar si existe un descenso en la quimioluminiscencia. Ésta solución se combina con 25µl de DMEM y Lipofectamina (1,5µl/pocillo), y la transfección se lleva a cabo durante 48 horas en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂.

Detección de la quimioluminiscencia

Para la detección de quimioluminiscencia se emplea el Dual-luciferase® Reporter Assay (Promega). Primeramente, se añade a las células HEK293 (resuspendidas en 1x PBS) las siguientes cantidades de reactivos, teniendo en cuenta que se usan placas de 96 pocillos: 20µL 1XPLB (tampón de lisis). Dejar 15 minutos en agitación.

Para la detección de la luciferasa de luciérnaga se añaden 100mL de LAR II (sustrato para la luciferasa) a los 20mL del lisado. Posteriormente, se usan 100mL de Stop&Glo® Reagent, y se medirá la actividad de la luciferasa de *Renilla*. La relación entre ambas luciferasas indica si el miRNA se ha unido al mRNA clonado en el vector pmirGLO.

Análisis estadístico

El análisis de los resultados del ensayo de luciferasa se realiza partiendo de la relación entre las dos quimioluminiscencias emitidas por los dos tipos de luciferasas presentes (luciérnaga y *renilla*). Estos resultados se relativizan frente al grupo control y posteriormente se realiza su análisis estadístico con el software Prism V.5.

Time-lapse de transgénicos Nestin-GFP

La técnica de *time-lapse*, consistente en la toma de imágenes de un mismo foco durante un periodo continuado de tiempo, se realiza con un microscopio de célula viva (Zeiss, Cell Observer) que, además, permite la toma de imágenes de varios focos en un mismo experimento. En esta técnica se utilizaron embriones transgénicos Tg[-3.9nestin:GFP]

(Lam y cols., 2009). Los animales transgénicos fueron amablemente cedidos por el Doctor Bruce Appel (Universidad de Colorado) y transportados a nuestro laboratorio por D. Fernando León Lobera. Los embriones fueron colocados en posición dorsal o lateral con ayuda de un estereoscopio y analizados desde las 16 hpf hasta las 48 hpf tomando imágenes cada 5 minutos durante dos horas de desarrollo. Los estadios que mostraron los principales cambios fueron 18 hpf y 22 hpf. Durante el desarrollo de este trabajo se observaron tanto embriones control como tratados con morfina 10 nM, todos ellos expuestos a PTU, para inhibir su pigmentación, y anestesiados con triclaína al 0.02%. Durante los experimentos los embriones fueron mantenidos en placas de Petri con fondo estrecho que contenían medio E3 y triclaína para los embriones control y, además, morfina 10 nM para los embriones previamente tratados con este fármaco. La fijación de los embriones a la placa se realizó con ayuda de una gota de agarosa de bajo punto de fusión al 1%.

Resultados

Para su mejor comprensión, los resultados de este trabajo han sido divididos en tres bloques según los mecanismos epigenéticos estudiados en cada caso. De esta manera, el efecto de la morfina en el desarrollo del SNC se estudia en la primera parte a través de la regulación ejercida por los miRNAs 212 y 132. En la segunda parte se incluyen las modificaciones inducidas por la exposición a este fármaco sobre marcas epigenéticas asociadas a histonas (H3K27ac y H3K27me3). En el último apartado se describen los resultados asociados a los cambios inducidos por la morfina en la metilación del DNA del gen *nestin* y en la expresión de Sox2, uno de los principales factores de transcripción asociados a *nestin*. En este último punto, también se analizan las consecuencias de la exposición a morfina sobre la expresión *in vivo* de Nestin en un transgénico Nestin-GFP. La cuantificación de los resultados mostrados en las gráficas de estos apartados se muestra en el anexo 1.

1. Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética mediados por RNA no codificantes: cambios sobre el *mir212* y el *mir132*.

Los trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación, han mostrado la importancia de miRNAs como el miR-133b, el miR-128 y el miR-let-7d en los cambios inducidos por la morfina y la cocaína (Barreto-Valer y cols., 2012; Lopez-Bellido y cols., 2012; Gonzalez-Nunez y cols., 2014). Además, varios autores han relacionado al *cluster* formado por el *mir212* y el *mir132* con los efectos desencadenados por el consumo de cocaína (Wanet y cols., 2012) y el desarrollo del SNC. Estos antecedentes condujeron al objetivo propuesto en esta primera parte del estudio: analizar los cambios de la morfina sobre ambos miRNAs y los efectos desencadenados sobre el SNC en formación.

A. Cambios en el *mir212* y el *mir132* tras la exposición a morfina

Con el fin de determinar la expresión de los miRNAs 212 y 132 y los cambios ejercidos en ambos tras la exposición a morfina y la activación del receptor opioide mu, se realizó un estudio en embriones de pez cebra de 48 hpf. En este estadio la formación del SNC se ha completado permitiendo un buen estudio de los posibles efectos desencadenados por diversas drogas en este punto del desarrollo. Se analizaron cuatro grupos

experimentales: embriones control, embriones tratados con morfina, embriones tratados con naloxona y embriones tratados simultáneamente con morfina y naloxona. En el grupo control los embriones crecieron en un medio libre de morfina mientras que los embriones tratados fueron expuestos a morfina 10nM, naloxona 1 μ M o ambas, desde las 5 hpf hasta las 48 hpf.

Los resultados de qPCR (Fig. 10) mostraron cambios detectables en los niveles de expresión del *mir212* y *mir132* a las 48 hpf, demostrando un claro efecto del tratamiento con morfina sobre dicha expresión. En el caso de los embriones expuestos a morfina los niveles del *mir212* disminuyeron al compararlos con el grupo control. Por el contrario, la exposición a morfina 10 nM produjo un aumento en la expresión del *mir132*. La incubación con naloxona, antagonista opioide, indujo el efecto opuesto al desencadenado por el tratamiento con morfina. Esto es, un aumento en la expresión del *mir212* y disminución del *mir132*. Además, el tratamiento con ambos fármacos de manera simultánea no indujo ningún cambio en los niveles de expresión de los miRNAs estudiados. Estos resultados demuestran que la morfina, cuando modifica la expresión de los *mir212* y *mir132*, lo hace mediante la activación del receptor opioide mu.

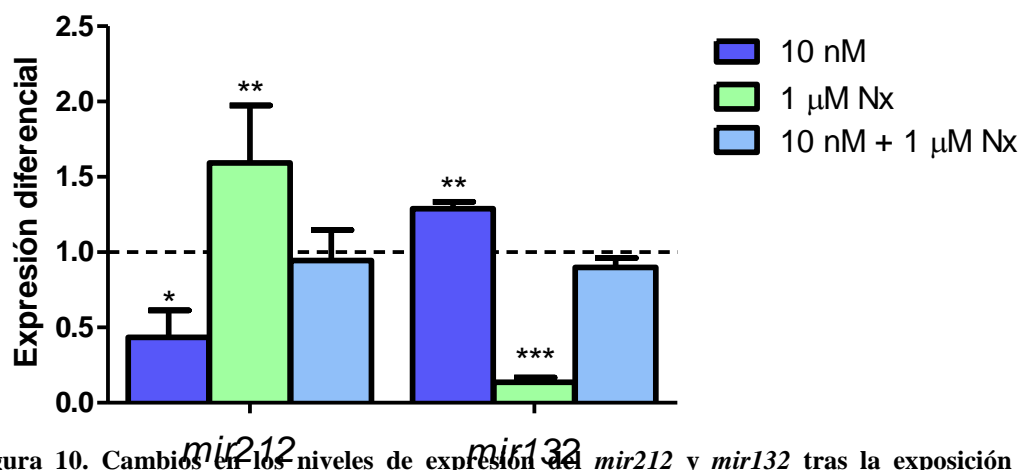
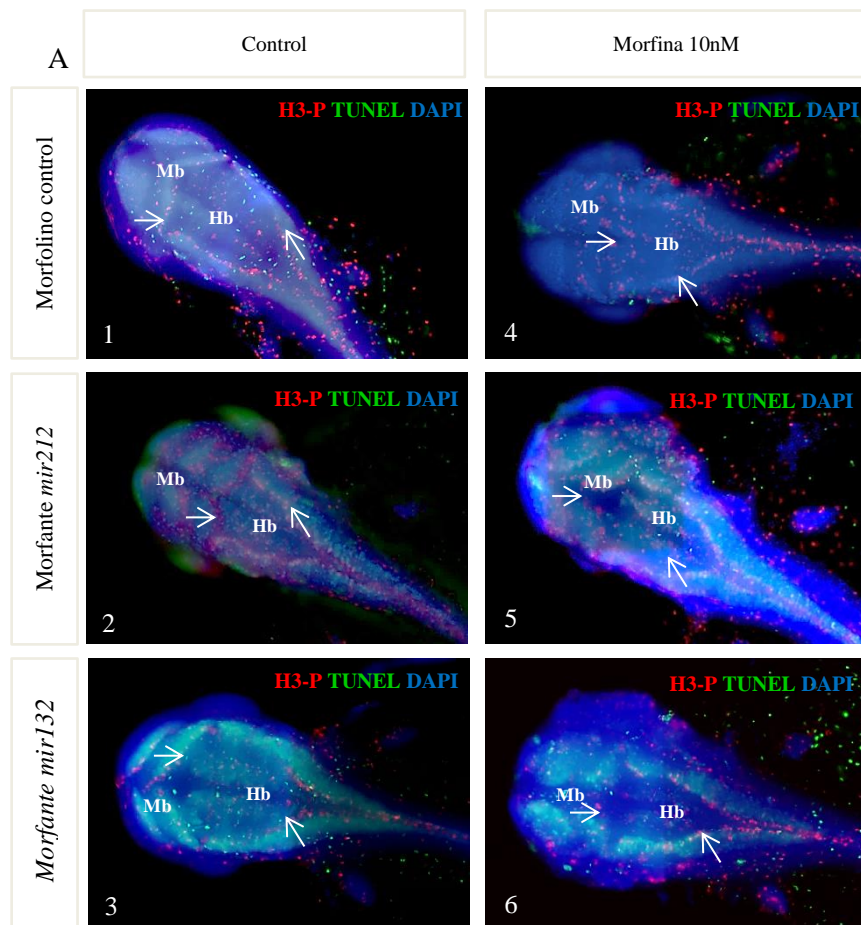


Figura 10. Cambios en los niveles de expresión de *mir212* y *mir132* tras la exposición a morfina 10 nM, naloxona 1 μ M o ambas simultáneamente. Se observaron cambios significativos en ambos miRNAs. Los niveles del *mir212* disminuyeron tras la exposición a morfina 10nM. La expresión del *mir132* fue mayor comparada con el *mir212* y grupo control. En el grupo de embriones tratados con naloxona se observó el efecto contrario al inducido por la morfina. No se encontraron cambios tras la incubación con ambos fármacos. Los cambios en la expresión relativa se muestran comparando los grupos de embriones tratados frente a los controles a 48 hpf (línea punteada). Los resultados se presentan con la media \pm SEM (n=3). *: Diferencia estadística; * p < 0.05, ** p < 0.01. *** p < 0.001. 10 nM: tratamiento con morfina 10 nM. 1 μ M Nx: tratamiento con naloxona 1 μ M. 10 nM +1 μ M Nx: Tratamiento con morfina 10 nM y naloxona 1 μ M incubadas al mismo tiempo en medio E3.

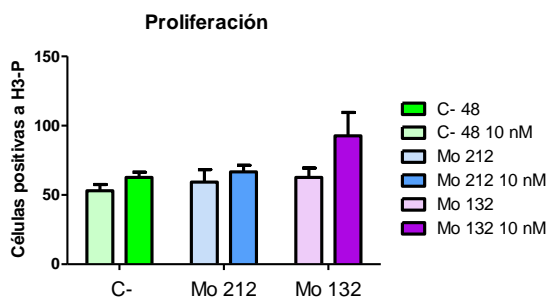
B. Cambios morfológicos inducidos por la exposición a morfina en el SNC

Considerando los resultados descritos anteriormente, se analizaron las consecuencias morfológicas de los eventos estudiados. Dado que los efectos de la morfina sobre la división celular y la apoptosis han sido ampliamente descritos (Willner y cols., 2014; Bimonte y cols., 2015), se realizó un estudio de proliferación y un ensayo TUNEL. En estos experimentos se incluyeron embriones *knock-down* (denominados morfantes) obtenidos mediante la microinyección de secuencias de morfolidos dirigidas contra el *mir212* y el *mir132*. Los resultados obtenidos (Fig. 11A) mostraron cambios en las células en proliferación en torno al área periventricular las cuales cambiaban su posición hacia la línea media tras la exposición a morfina (Fig. 12 1-2). Estos efectos no se observaron en los morfantes del *mir212*. Por el contrario, cuando los morfantes del *mir212* fueron expuestos a morfina, la correcta localización de las células en proliferación fue alterada en las áreas estudiadas (Fig. 12 3-4).

El bloqueo de la expresión del *mir132* indujo efectos similares a los observados en el grupo control tras el tratamiento con morfina. La morfina no indujo ningún cambio considerable al comparar con los morfantes no tratados en la localización de las células proliferativas en los morfantes de este miRNA (Fig. 12 5-6). Con el fin de determinar si los efectos observados habían sido inducidos por el aumento o disminución en el número de células apoptóticas o proliferativas, se cuantificaron las células positivas al marcador histona 3 fosforilada (Fig. 12 1-6) y al ensayo de TUNEL en torno al área periventricular (Fig. 12 1'-6'). Como se muestra en la figura 11 (B-C), esta cuantificación no presentó cambios estadísticamente significativos en ninguno de los grupos estudiados.



B



C

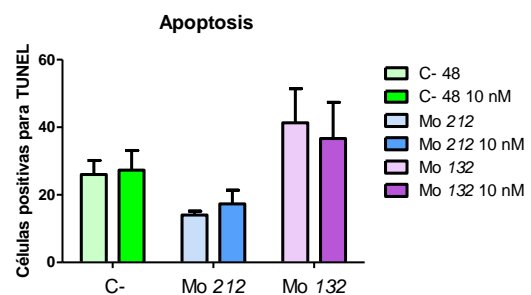


Figura 11. Cambios en la división celular y la apoptosis tras la exposición a morfina y el silenciamiento del *mir212* y *mir132*. El marcador mitótico histona-3 fosforilada (H3-P) (Rojo) y la técnica TUNEL (verde) se usaron para determinar si el tratamiento con morfina 10 nM altera la proliferación y la apoptosis en el SNC. Se observaron cambios en el patrón de aparición de las células proliferativas (Flechas) entre los embriones control (A: 1-3) y los tratados (A: 4-6) a 48 hpf y entre los morfantes del *mir212* y *mir132*. Las células positivas para el marcador mitótico y la técnica de TUNEL fueron cuantificadas en torno al área periventricular y el límite meséncéfalo-rombencéfalo (B-C) (n=3). Los núcleos celulares fueron marcados con DAPI (azul). Los embriones están orientados con la parte anterior a la izquierda y la posterior a la derecha. Mb: mesencefalo. Hb: rombencéfalo. Mo: morfante.

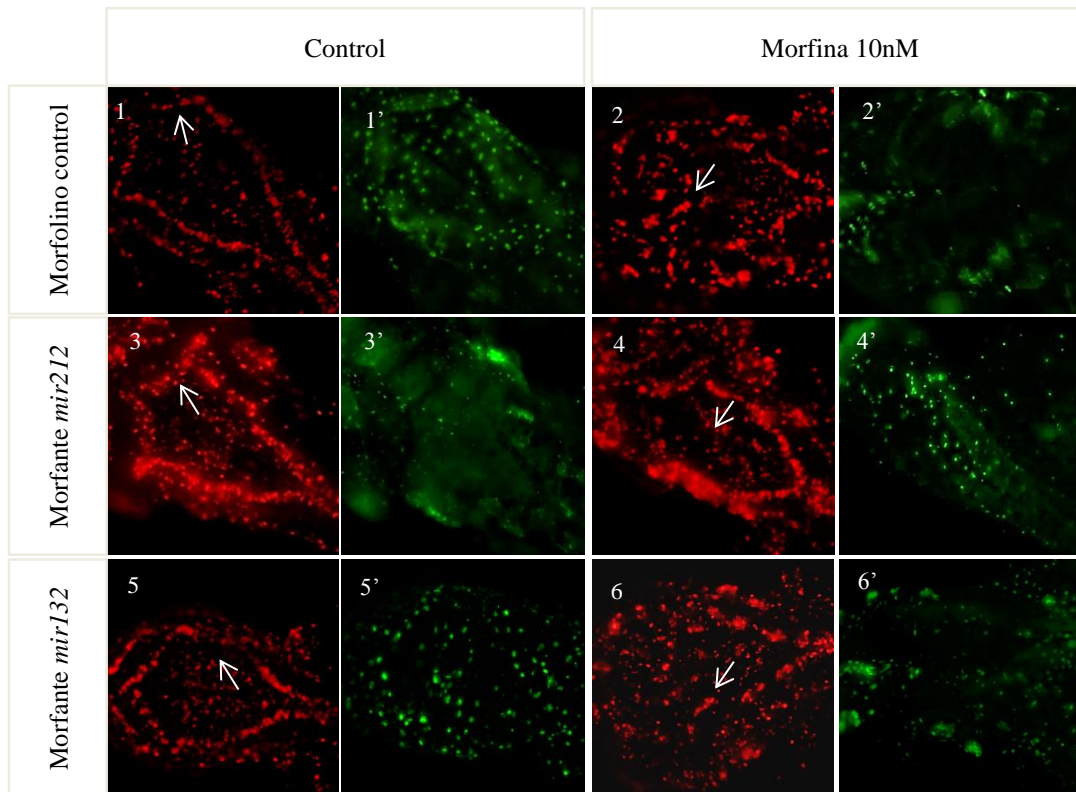


Figura 12. Cambios en la división celular y la apoptosis tras la exposición a morfina (Imagen ampliada). El marcador mitótico histona-3 fosforilada (H3-P) (Rojo) y la técnica TUNEL (verde) se usaron para determinar si el tratamiento con morfina 10 nM altera la proliferación y la apoptosis en el SNC. Se observaron cambios en el patrón de aparición de las células proliferativas entre los embriones control y los tratados a 48 hpf y los morfantes del *mir212* y *mir132*.

C. Detección de BDNF y TrkB tras la exposición a morfina en morfantes de los miRNAs 212 y 132 y del receptor opioide μ

La modificación inducida por la morfina en la localización de las células mitóticas a las 48 hpf apuntaba a un posible papel de las neurotrofinas en los efectos de la morfina. En este sentido, el siguiente punto del estudio se centró en el análisis de BDNF, la neurotrofina más importante en el SNC, y su receptor, TrkB. A pesar de la baja expresión observada, los resultados de *western blot* revelaron que la exposición a morfina incrementó de manera significativa los niveles de dichas proteínas (Fig. 13). Dado que el clúster *mir212/132* ha sido previamente relacionado con la expresión de BDNF (Wanet y cols., 2012), se estudió la expresión de *Bdnf* y *TrkB* en morfantes del *mir212* y *mir132*. Además, se incluyó en el análisis un grupo de embriones morfantes para el receptor opioide μ con el fin de determinar si *Oprm1* es uno de los posibles efectores de los cambios inducidos por la morfina en la expresión de *Bdnf*. En todos los

grupos seleccionados, se encontró una disminución significativa de la expresión de Bdnf (Fig. 14). La expresión de Trkb no cambió en ningún grupo excepto en los morfantes del *mir212* (Fig. 15). El único grupo de morfantes en que se observaron diferencias entre embriones no tratados y tratados en la expresión de Bdnf y TrkB fue el de los morfantes de *mir212* (Fig. 14 y 15).

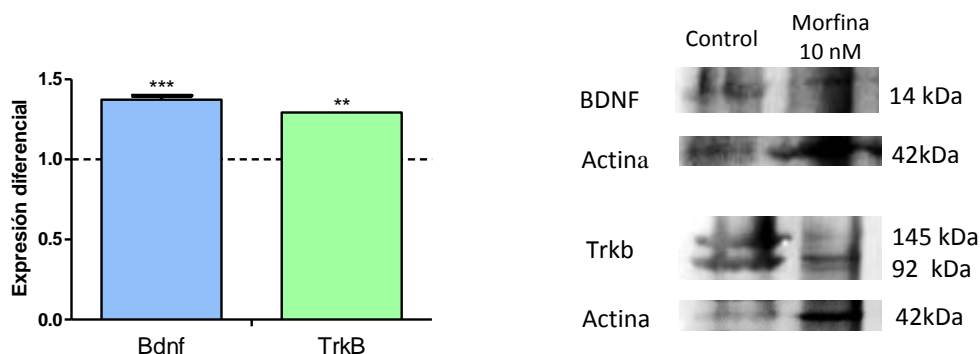


Figura 13. Expresión de las proteínas Bdnf y TrkB a 48 hpf en embriones control y tratado con morfina 10 nM. Los efectos de la morfina en la expresión de Bdnf y TrkB fueron medidos mediante *western blot*. Los niveles de ambas proteínas aumentaron cuando los embriones de pez cebra fueron expuestos a morfina (10nM) tras comparar con el grupo control no tratado (Línea punteada). La proteína Bdnf fue detectada a la altura de 14 kDa y TrkB a 92 y 145 kDa. Se utilizó actina como control de carga. Los resultados se muestran como la media \pm SEM (n=5). *: Significancia estadística; **p< 0.01, *** p< 0.001.

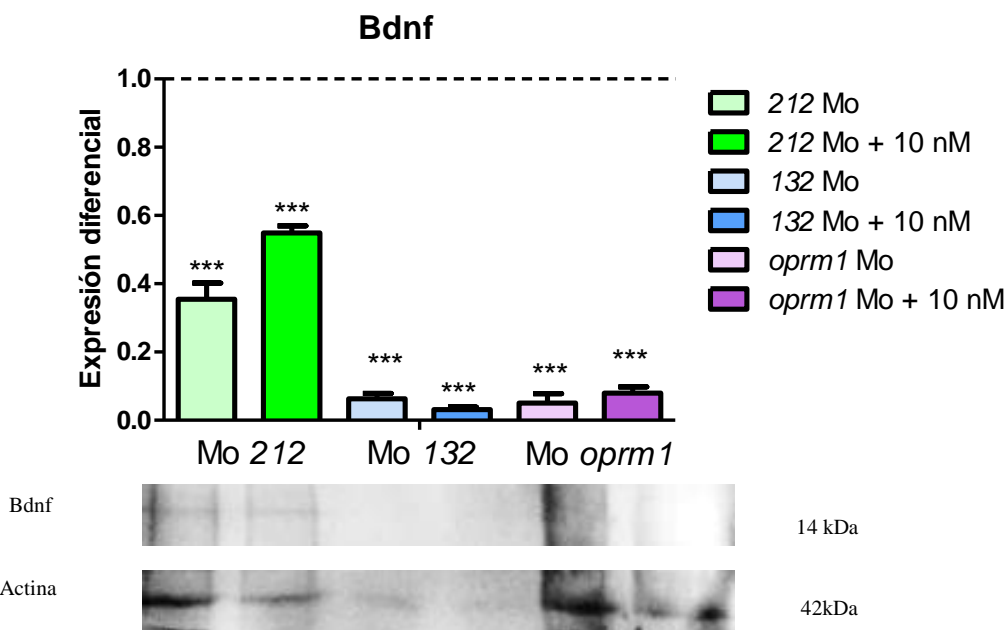


Figura 14. Expresión de la proteína Bdnf a 48 hpf en embriones de pez cebra morfantes para el *mir212*, *mir132* y *oprm1*. Los efectos de la morfina y la microinyección de morfolinios dirigidos contra el *mir212*, *mir132* y *oprm1* fueron medidos mediante *western blot* y comparados con el grupo control (Línea punteada). La expresión de Bdnf disminuyó tras silenciar ambos y miRNAs y *oprm1*. La proteína Bdnf fue detectada a la altura de 14 kDa. Se utilizó actina como control de carga. Los resultados se muestran como la media \pm SEM (n=5). *: Significancia estadística; *** p< 0.001. Mo: morfante. Mo + 10 nM: Embriones morfantes tratados con morfina 10 nM.

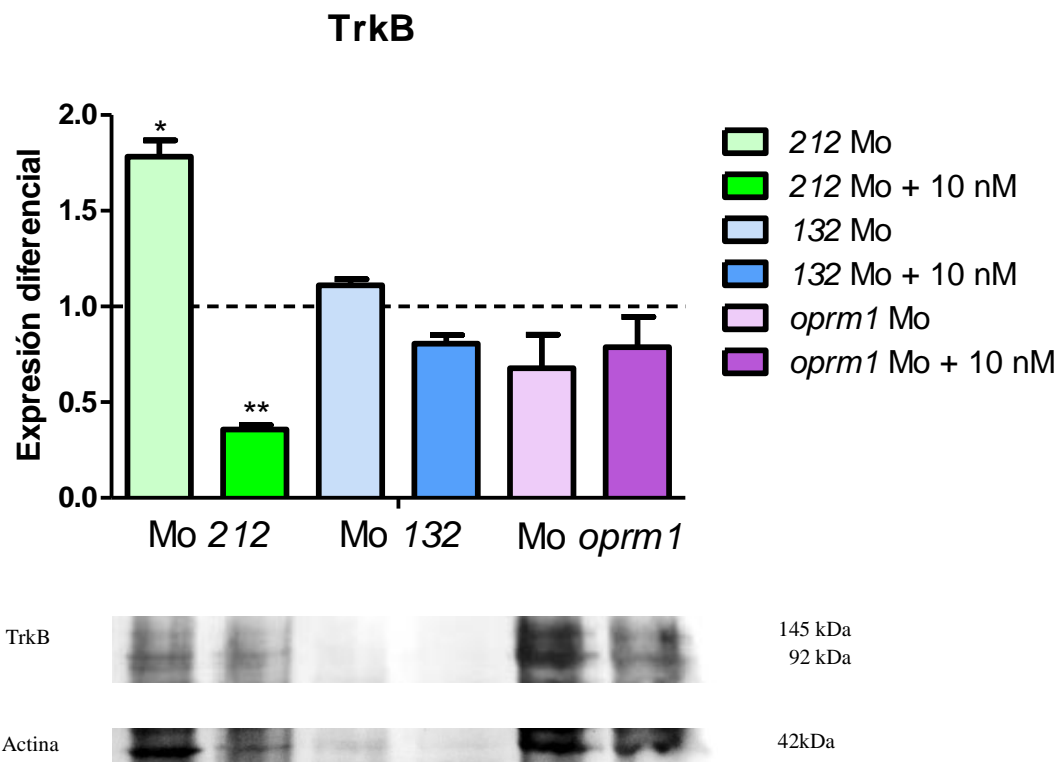


Figura 15. Expresión de la proteína TrkB a 48 hpf en embriones de pez cebra morfantes para el *mir212*, *mir132* y *oprm1*. Los efectos de la morfina y la microinyección de morfolinós dirigidos contra el *mir212*, *mir132* y *oprm1* fueron medidos mediante *western blot* y comparados con el grupo control (Línea punteada). Los niveles de TrkB fueron mayores comparados con el grupo control en los morfantes de *mir212* no tratados. Los embriones morfantes para el *mir212* tratados con morfina 10 nM demostraron una disminución en dicha proteína. La proteína TrkB fue detectada a la altura de 92 y 145 kDa. Se utilizó actina como control de carga. Los resultados se muestran como la media \pm SEM (n=5). *: Significancia estadística; *p<0.05, **p< 0.01. Mo: morfante. Mo + 10 nM: Embriones morfantes tratados con morfina 10 nM.

D. Regulación del mRNA de *mecp2* por el *mir212* y el *mir132*

A pesar de los cambios observados en Bdnf tras el silenciamiento del *mir212* y *mir132*, nuestros estudios *in silico* no mostraron sitios de unión posibles para estos miRNAs en la secuencia de *bdnf* de pez cebra. No obstante, la expresión de Bdnf es inhibida por MeCP2, que fue inicialmente identificado como un factor epigenético capaz de unirse al DNA metilado, evitando su transcripción (Hollander y cols., 2010).

Predicciones bioinformáticas posteriores mostraron una región de unión para ambos miRNAs en el tercer exón de la secuencia de *mecp2* (Fig. 16). Dado que este sitio de unión no había sido experimentalmente probado, se realizó un ensayo de luciferasa con el fin de confirmar la posible regulación de *mir212* y *mir132* sobre la expresión del gen *mecp2*. Un grupo de células HEK 293 fue transfectado con un plásmido que contenía la secuencia diana de *mecp2* (Fig. 17A) mientras que dos grupos adicionales contenían la secuencia de *mecp2* junto a secuencias *mimic* del *mir212* y *mir132* que se transfectaban con el fin de sobre-expresar cada miRNA. Cuando el ensayo de luciferasa fue analizado, se encontró una disminución significativa de la quimioluminiscencia emitida por los grupos de células que habían sido transfectadas con los *mimics* de los miRNAs en comparación con el grupo control (Fig. 17B). Esta disminución en la quimioluminiscencia en los grupos que contenían los *mimics* prueba que los *mir212* y *mir132* se unen a la región predicha de la secuencia diana incluida en el plásmido de luciferasa.

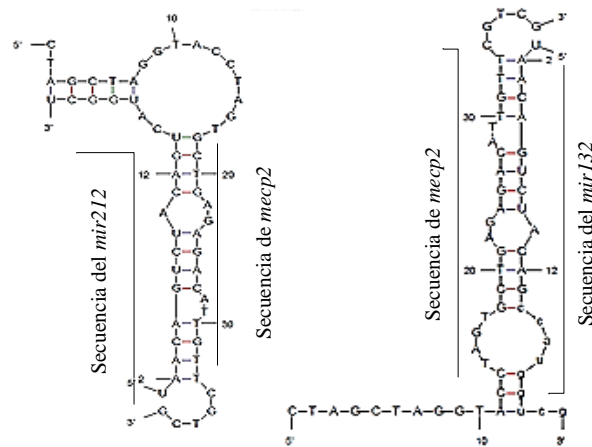


Figura 16. Unión del *mir212* y el *mir132* al tercer exón de *mecp2* estudiada mediante predicciones bioinformáticas. Representación esquemática de los elementos de la secuencia predicha para la unión del *mir212* y *mir132* en el fragmento de *mecp2*. La unión de los miRNAs fue estudiada mediante un análisis con la herramienta Mfold hybridization.

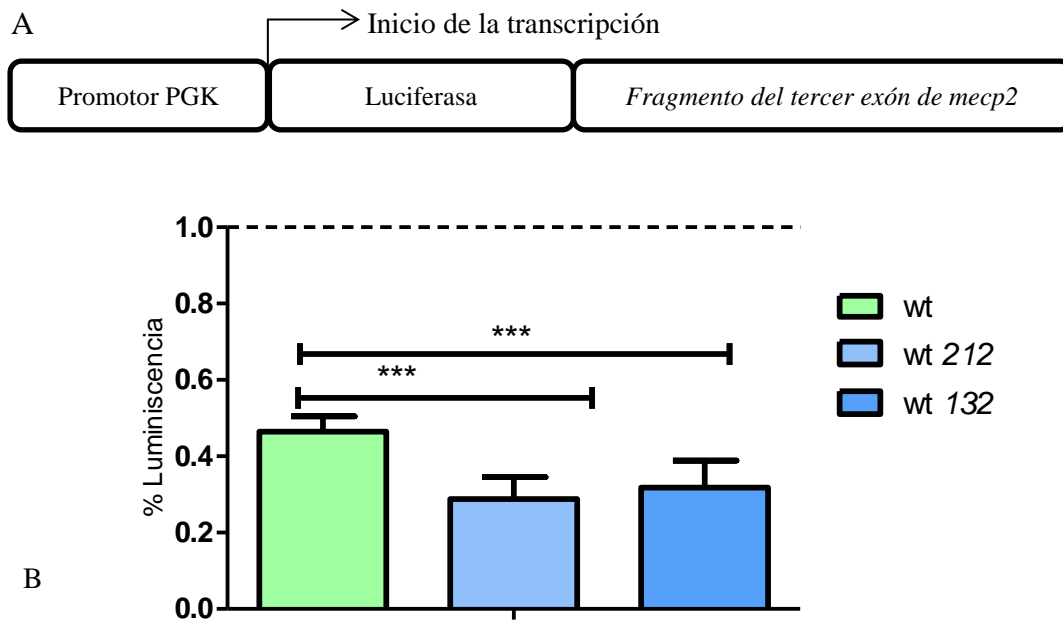


Figura 17. Regulación de la secuencia de *mecp2* de pez cebra por el *mir212* y *mir132*. Diagrama de la construcción utilizada en el ensayo de luciferasa transfectada en células HEK 293 (A). El ensayo de luciferasa fue realizado para confirmar la unión de los miRNAs a la región predicha (B). Se encontraron cambios significativos entre los grupos control, conteniendo la secuencia no mutada de *mecp2* y los grupos con las secuencias del *mir212* y *mir132* transfectadas. No se encontraron cambios significativos entre las secuencias mutadas y no mutadas. La quimioluminiscencia emitida se muestra en relación con la emisión de un grupo de células control transfectadas con un plásmido vacío (línea punteada). Los resultados se muestran como la media \pm SEM (n=5). *: Significancia estadística; *** p < 0.001. PGK: fosfoglicerato quinasa humana; Wt: secuencia *wild-type* de *mecp2* transfectada en células HEK 293; Wt 212: secuencia *wild-type* de *mecp2* transfectada junto al *mimic* del *mir212*; Wt 132: secuencia *wild-type* de *mecp2* transfectada junto al *mimic* del *mir132*.

E. Análisis de la expresión de TrkB y la agregación celular tras el tratamiento con morfina y la exposición a BDNF. Efectos en un cultivo primario de neuronas.

Los resultados mostrados hasta este punto están relacionados con cambios en el SNC en general. Debido a la gran variedad de poblaciones celulares que forman el SNC, se obtuvo un cultivo primario de neuronas de embriones de pez cebra para verificar que los efectos observados tras la exposición a morfina, tenían lugar específicamente en las neuronas (Fig. 18). Las células fueron estudiadas en medio control y enriquecido con BDNF (50 ng/ μ l). Ambos grupos fueron además expuestos a morfina 1 nM. La inmunocitoquímica contra TrkB reveló cambios en su expresión bajo estas condiciones. Esta proteína estaba expresada en áreas más restringidas del soma neuronal en las células tratadas con morfina 1nM (Fig. 18B) comparadas con el grupo control (Fig.

18A). El medio enriquecido con BDNF indujo el aumento de TrkB en torno al soma (Fig. 18C). Además, la exposición a morfina facilitó el efecto desencadenado por BDNF, incrementando la expresión de TrkB y la agregación neuronal (Fig. 18D). Estos datos confirman que los cambios observados en la localización celular (Fig. 11A) y en la expresión de TrkB (Fig. 15) están relacionados con los efectos producidos por el tratamiento con morfina sobre las neuronas.

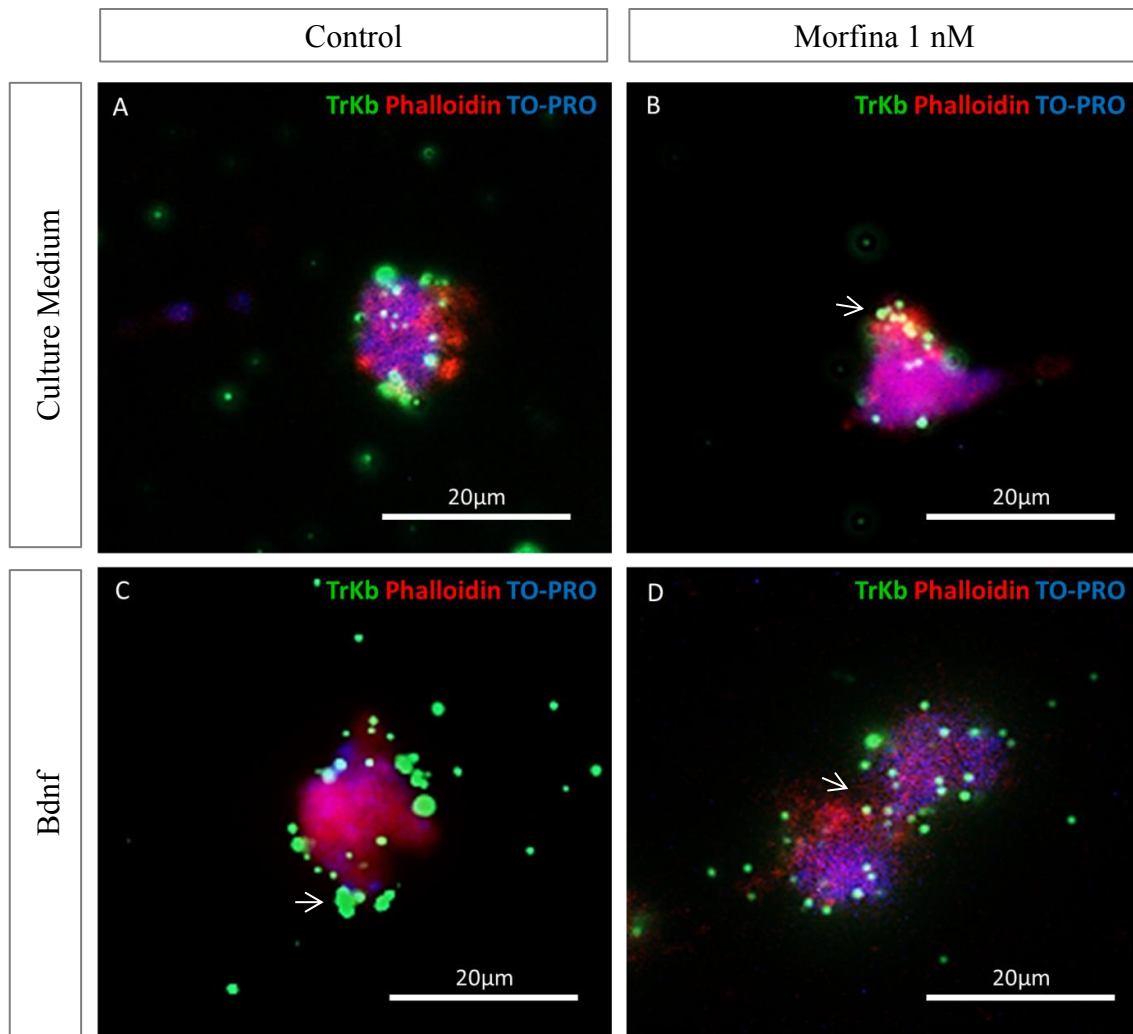


Figura 18. Efectos de la morfina y BDNF en cultivo primario de neuronas de pez cebra. La inmunocitoquímica contra TrkB confirmó la expresión de este receptor en el cultivo primario de neuronas de pez cebra. La exposición a morfina (1 nM) indujo la formación de agregados entre las células de manera similar a la observada tras la exposición de las neuronas a BDNF (50 ng/μl). TrkB (verde) fue encontrado en los somas neuronales (Rojo) en los grupos tratados solo con medio de cultivo. La exposición a BDNF y morfina aumento la expresión del receptor TrkB en comparación con el grupo control (Flechas). Alexa 594 faloidina (rojo) se usó para marcar los somas celulares. Los núcleos se visualizaron con el marcador TO-PRO (azul).

2. Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética: cambios en las modificaciones de histonas H3K27ac y H3K27me3.

Tras observar los cambios inducidos por la exposición a morfina en la expresión de reguladores post-transcripcionales como los miRNAs 212 y 132, se estudiaron los posibles efectos sobre otros factores epigenéticos como las histonas y sus modificaciones asociadas. En este caso se seleccionó la histona 3 trimetilada o acetilada en la lisina 27, dada su estrecha relación con el desarrollo (Filipescu y cols., 2013).

A. H3K27ac y H3K27me3 en el grupo control

El estudio del efecto de la morfina a nivel pre-transcripcional se realizó analizando algunas modificaciones asociadas a la histona 3, concretamente la acetilación y la trimetilación de la lisina 27. Para ello se puso a punto la técnica de inmunoprecipitación de cromatina asociada a secuenciación de alto rendimiento, utilizando anticuerpos específicos para las modificaciones elegidas. El análisis bioinformático de los resultados de ChIP-seq en el grupo control se realizó con el objeto de aportar datos para conocer la regulación de varios genes relevantes en el desarrollo del SNC a las 24 hpf. Algunos de estos genes resultaron ser claves para este estudio. Entre los 29650 resultados hallados en el grupo control para la modificación H3K27ac se seleccionaron 23 genes (Tabla 8) asociados con el presente estudio que estaban regulados pre-transcripcionalmente por esta modificación en una situación control. Entre estos genes figuran factores reguladores de la transcripción como CREB y su proteína de unión, REST1, coREST 3, coREST1, AP-4, POU 6 y POU 2b, varias proteínas de unión a citosinas metiladas (MeCP2, MBD6, MBD5, MBD3a, MBD1b), el miRNA 212, los genes codificantes para la variante 3 de la Histona 3 y la Histona 1, así como la Histona deacetilasa 4. En el último grupo de genes seleccionados, figuran la metionina-encefalina, el gen codificante para la proteína Argonauta 1 y los receptores neurotróficos con actividad tirosinaquinasa 2b y 3a. Entre los 1703 resultados para la modificación H3K27me3, 2 de ellos resultaron ser relevantes para este trabajo (Tabla 9). En este último grupo de resultados cabe destacar la aparición del receptor opioide mu y el receptor similar al receptor para el factor de crecimiento opioide 2.

Modificación	Gen	Localización
H3K27ac	cAMP responsive element binding protein 1b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-050417-355]	inside
	H3 histone, family 3B.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-050417-65]	inside
	cAMP responsive element binding protein 1a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-750]	inside
	transcription factor AP-4 (activating enhancer binding protein 4) [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-090810-1]	inside
	methyl-CpG binding domain protein 6 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-041027-3]	inside
	CREB binding protein a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-050208-439]	inside
	POU class 6 homeobox 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-980526-530]	inside
	methyl-CpG binding domain protein 5 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-070209-125]	upstream
	REST corepressor 3 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-050208-371]	inside
	POU class 2 homeobox 1b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-2422]	Inside
	huntingtin interacting protein 1 related a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040718-71]	upstream
	methyl-CpG binding domain protein 3a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-9077]	inside
	REST corepressor 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-050506]	Inside
	methyl-CpG binding domain protein 1b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-6318]	Inside
	opioid growth factor receptor [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-377]	inside
	argonaute RISC catalytic component 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-110606-3]	inside
	RE1-silencing transcription factor [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-080415-1]	inside
	H1 histone family, member 0 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-337]	inside
	histone deacetylase 4 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-061013-95]	upstream
	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-010126-2]	inside
	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-010126-3]	inside
methyl CpG binding protein 2 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-7190]	Inside/upstream	
dre-mir-212 [Source:miRBase;Acc:MI0003385]	upstream	

Tabla 8. Selección de genes hallados entre los enriquecimientos observados en el análisis de la marca H3K27ac en grupo control a 24 hpf. Se indica la localización *upstream* (aguas arriba) y/o *inside* (dentro de la secuencia del gen) del enriquecimiento determinado.

Modificación	Gen	Localización
H3K27me ₃	opioid growth factor receptor-like 2 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030616-523]	inside
	opioid receptor, mu 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-010125-1]	inside

Tabla 9. Selección de genes hallados entre los enriquecimientos observados en el análisis de la marca H3K27me₃ en grupo control a 24 hpf. Se indica la localización *upstream* (aguas arriba) y/o *inside* (dentro de la secuencia del gen) del enriquecimiento determinado.

B. Genes con las marcas H3K27ac y H3K27me₃ aumentadas tras la exposición a morfina

Al comparar las modificaciones halladas en los grupos control y tratamiento se obtuvieron 79 genes en los que la marca H3K27ac aumentó de manera estadísticamente significativa (Ver Anexo 2) y 59 genes en el caso de la marca H3K27me₃ (Ver Anexo 3). Estos resultados fueron estudiados revisando la bibliografía relacionada con cada uno de ellos, con el fin de determinar su relevancia asociada a los objetivos del trabajo.

En el caso de la marca H3K27ac la morfina aumentó esta modificación en varios genes ligados al desarrollo como *mych* y *ewsr1a*, por sus siglas en inglés *Myelocytomatosis Oncogene Homolog* y *Ewing Sarcoma RNA Binding Protein 1* a, respectivamente. Por otra parte, la marca H3K27me₃ fue aumentada por la morfina en el gen *fmr1*, por sus siglas en inglés *Fragil X Mental Retardation 1* y en el gen *ch11b*, por sus siglas en inglés *Cell Adhesion Molecule Like 1b*; ambos profundamente relacionados con el correcto desarrollo del SNC.

Para completar el estudio de los genes afectados por las modificaciones estudiadas tras la exposición a morfina, se analizaron las regiones adyacentes de cada uno de los picos estadísticamente significativos obtenidos tras la secuenciación (Ver Anexos 2 y 3). Con este análisis se pretendía determinar si dichos picos correspondían a regiones promotoras de otros genes, delimitando esta región en 20Kb a izquierda y derecha de la modificación observada. Estos resultados revelaron que varios promotores podían tener estas marcas asociadas o su número podía haber aumentado tras la exposición a morfina. Entre estos resultados, la modificación H3K27ac hallada dentro del gen *gpatch4* se encontraba en una región cercana al gen *nestin* (Fig. 19), íntimamente ligado al desarrollo y la formación de precursores neuronales (Park y cols., 2010). Esta

secuencia fue analizada mediante el software de predicción de lugares de unión de factores de transcripción Promo (Transfac V. 8.3) determinándose que formaba parte del promotor distal del gen *nestin* (Fig. 20) según los criterios establecidos por Sahlén y cols, 2015.

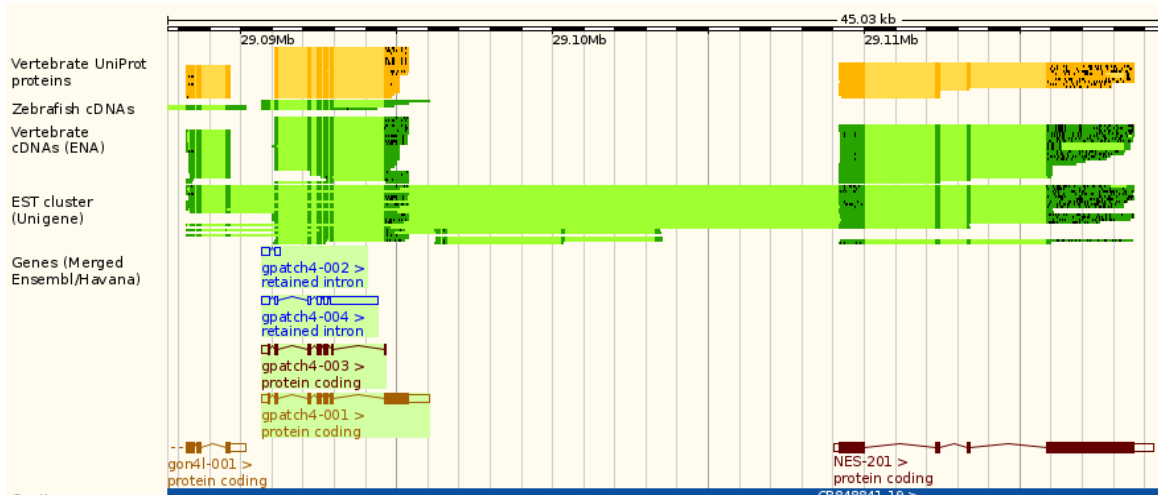


Figura 19. Área del enriquecimiento hallado para la modificación H3K27ac en el gen *gpatch4* en el genoma del pez cebra. La región adyacente incluida en las 20Kb de limitación, correspondía al gen codificante para la proteína Nestin. Las secuencias del genoma han sido determinadas con la base de datos Ensembl.

GCCGGTGTGCATGCCTGCTCTCTTGCTGAGCGCGTGGTAGCGATTGTTGGTCTTTTCCCTTCTTT
 TTATTTTAGTAAGCTGTTACGATTTACAGAAGTAAACAGCTAAAATACTCAGAATTAACGAATA
 TTGTCAATGTGCAGTTGGCTGATGTGTTTTACCTTCATATTCGAGTGCAGAGTTAAGAATTCA
 TGGCAGAAACGGTCCAAGAAAAGAGTACAGGACTAAAG**TTGCTGAGGAGCAGCTTCTACGACA**
CGGATGGGAAAAGGGTAAAAGCACGATATATTTGTTGTGCTCATGATTCATCACAACTCATGG
CAGATATGATTGATTATGACGCTTCGTCGCCATAGACGGACCAATCCTCACTGGTGTGTTATG
GTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTGTAGGTAAAGGTCTGGGCAGAGCAGAGAATGGCATTTCAG
AGGCGATTAAAGTCAAAGTTAAATGTGATAAAGGAGGGGTGAGTGACAAAACGATTTTTATTAA
 GATCTCTATTTTGCCTGCAACATGTGGGTAGTTGACAACACGGGCAAGACGTTTTATGTTGTTG
 CAGGTTACAAACCATAGAACAGGGGTGTCAAACCTCAATTCCTGGAGGGCCGAAGCCCTGCACA
 GTTTAGTTTCCAAC**CTGCTCCAACACACTTAC**TTGTAGGTTTCAAACAAGCCTGAAGGACTCA
 ATTAGTTTGATCAGGTGTGTTTAATTAGGGTTGGAATAAAGTGCAGAGCTGCGGCCCTTTTGA
 AACTGAGTTTGACACCTGTGCCATTGAAGGTGTCATTAATTTGATACAAATAAAATGGAAGTCT
 ATGAAATATCCTCACCAAGACATGAAAACAAATGTTTGTGTTATTTGTAAGCTTTAGAAATTTG
 TTTAAAAAAAACCTGTGTGTGCTTAAATTTAAAGACGTCATCAAGAGTGCACCTTAAACAT
 TTCTACTATCTTTCTAATAAGTTGAGCCAGAGATTTGAGCCTAAAGCTCTGATTACCATTCTTG
 TTCAATTCGTAACATTGCTTCTGAACTTTGGCAAAGCTATTATTGATAGTCTGTGTATGTAA
 AATCAGAACCTAATTAATAATTATGTGCAAAAACCTGTTCTCTAATTAGGGGACACAGCC
 TGTATATCTTTTATATGGTATTGTTATGTATGATTTTATTACGATTTTTTTCTTTATTAAAGAA
 AATGCTAAATGAACTCAAGTACAATTATTGTTATATTTTTTTATTCCAGTACATTTATTTCATA
 TAATTATTTGTCTAGGTTTGACCACAAAGAACCAAACATAACTTTAAAATGAACTACAACAATA
 TTATTATTACAATGAAAAGTGTATAATAATTCTACATGATTTACTTCCAAAAGCTGTTTTAGAT
 AAAGTACAGCATTGTAGGTCTAATCAAAGTCTTAAATGTATATTTTGTGTTTTATTTCATGTAT
 CATTTGTCTTCAGATGGGCCATAAGCAAGGAGAGCAGTTTAGTTTCCACTGGTGGGACCATGTT
 TTTAACAAAGCCTCGTCTGGTCTGGTAGTGGAATCGGGCAGGTAAGGAATGAGGAGGATTGAA
 TGCAATTTTACAATGTCCAAAAAGTGTCTATGGTTTATTTATTTATTTTCTCAAACAGT
 CTGGATCTTTAAGTGAATACTAAAAAATGTTGGCATAGAGTTGGTTTGTGTAATATGCAGCAT
 GTTGTAGTTTGTAAATGCGGGCTCATTGATGTTGTTTATTATGCGTCAGAATGGTGTGATGGTG
 AAGAAATCAGATGACAGCAGTGTGACTGATCTCCAACAAGAAGCCACGCAAAGCTCAGCAAG
 CCAAGTCCATGCTCTATGGATGTTTTGTCAAGGTACAAAACCAAACAGCACAAATAATAAAT
 GGAAAAAATACAATTCAGTTGATTTTTCAAGAAGCATGTGTGAATGAATGAATGTTTTAAAAAT
 CTGTTTCTCTGTTAGTCTGCTACGCTACTGTGAGGAGAAGAACAGCCAGAGAAAATCAGTGAT
 GCAGAAGACGACAGCAGCAGCTCTTCTGAAGACGAGGACCAGAACTCGACC

Región enriquecida para H3K27ac

Promotor Distal de *nestin*

Figura 20. Estudio de la secuencia del promotor distal de *nestin*. La región adyacente al gen *gpatch4* observada en el análisis de ChIP-seq corresponde al promotor distal del gen *nestin*. En esta secuencia se incluye el enriquecimiento observado para la modificación H3K27ac (Azul) y una región de unión predicha con la herramienta Promo para el complejo de factores de transcripción Oct4/Sox2/Nanog (Verde).

C. Análisis funcional de los resultados obtenidos por ChIP-seq

El estudio funcional de los cambios inducidos por la morfina en las regiones afectadas por las marcas H3K27ac y H3K27me3 se realizó a varios niveles. A nivel más general se analizaron los grupos experimentales estudiados comparándolos entre sí. La finalidad de este primer acercamiento era conocer la similitud entre dichos grupos (Fig. 21). Al comparar mediante el test de F-Fisher los datos obtenidos para las modificaciones H3K27ac y H3K27me3, los resultados dan un valor de -1, indicando que son contrarios tanto en los grupos de embriones no tratados como en aquellos expuestos a morfina. Además, entre los picos observados para la modificación H3K27ac en los grupos experimentales estudiados hay una diferencia de resultados aunque estos no llegan a oponerse, dando un valor más cercano 0. Esto mismo ocurre cuando se analiza la modificación H3K27me3 en estos mismos grupos.

De manera más concreta, se estudió la ontología de los genes que presentaban un enriquecimiento de las marcas epigenéticas analizadas, tras la exposición a morfina. Para ello se utilizó la base de datos *gene ontology* (GO). El análisis GO se realiza en base a las tres principales áreas de clasificación establecidas: función molecular, componente celular y procesos biológicos. En este análisis, se comparan los resultados para la técnica ChIP-seq frente al genoma del modelo estudiado concluyendo qué genes es esperable encontrar en una situación fisiológica frente a los observados tras la exposición a morfina, cuando estos son seleccionados al azar. En relación a la función molecular se puede observar que para la marca H3K27ac hay un aumento de los genes observados frente a los esperados (Ver Anexo 4). Este fenómeno vuelve a aparecer al estudiar los genes observados desde el punto de vista del componente celular, excepto para aquellos genes constituyentes de membranas donde hay una clara disminución de los genes observados frente a los esperados (Ver Anexo 5). En relación con los procesos biológicos (Ver Anexo 6) en los que los genes estudiados en el ChIP-seq están involucrados, hubo un aumento de los observados frente a los esperados salvo en el caso de aquellos involucrados con el transporte transmembrana, el transporte iónico, la proteólisis, la señalización acoplada a proteína G y la transducción de señales.

Los genes enriquecidos con la marca H3K27me3 tras la exposición a morfina también muestran un efecto similar al de H3K27ac en el caso de la función molecular, donde aparece un aumento generalizado de observados frente a esperados (Ver Anexo 7). En

cuanto al componente celular (Ver Anexo 8) sólo se muestra un aumento de los genes esperados frente a los observados en aquellos que forman parte del citoplasma, mientras que en los procesos biológicos (Ver Anexo 9) solo fueron mayores los genes esperados relacionados con la señalización acoplada a proteína G y la transducción de señales, coincidiendo con lo obtenido para la marca H3K27ac.

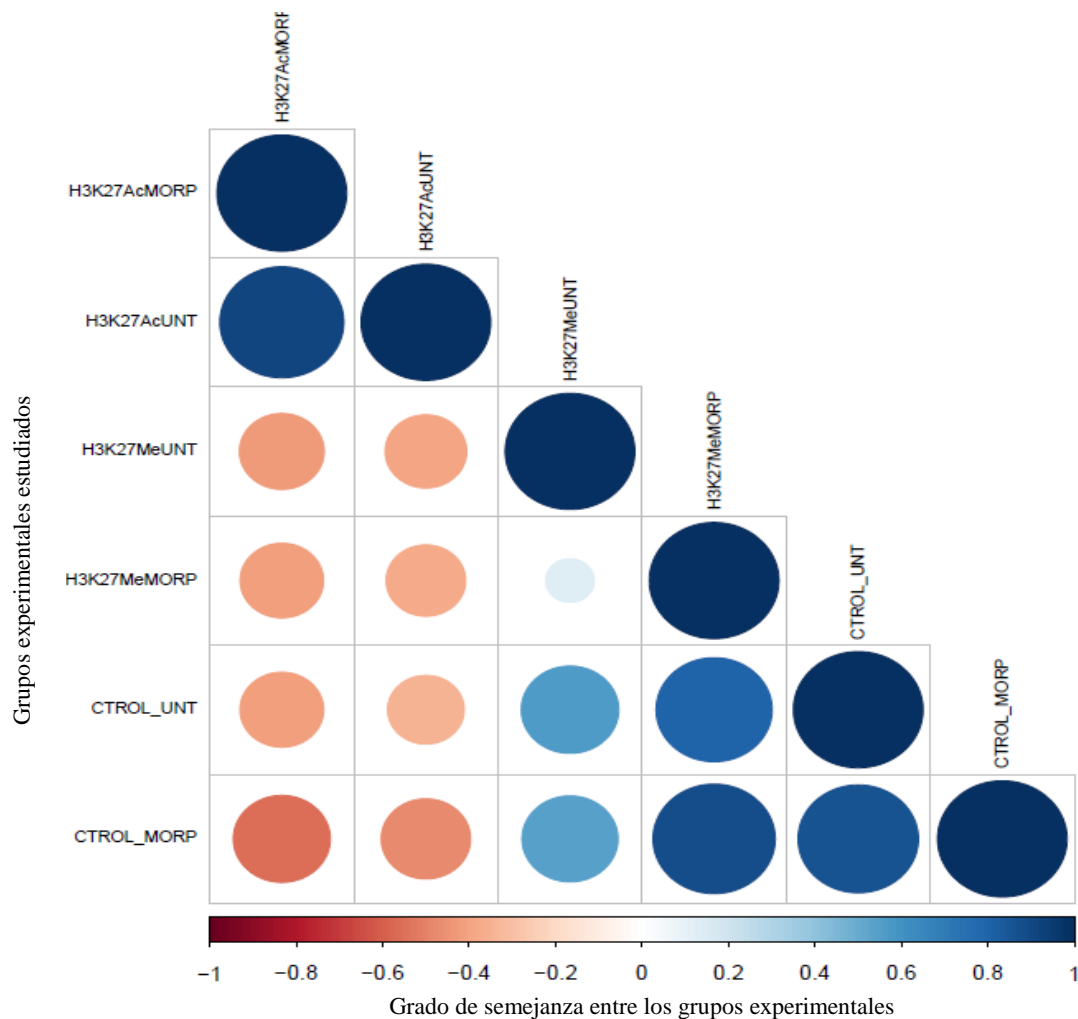


Figura 21. Comparación a gran escala de los resultados observados para los grupos experimentales incluidos en el estudio ChIP-seq. Los resultados obtenidos en cada uno de los grupos secuenciados fueron comparados entre sí para determinar el grado de homogeneidad y la similitud entre los mismos. Los datos más cercanos al valor 1 (Azul) corresponden a los más similares. Los datos más cercanos al valor -1 (Rojo) representan aquellos opuestos entre sí. CTRL_UNT: DNA no inmunoprecipitado procedente de embriones no tratados con morfina. H3K27MeUNT: DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo H3K27me3 procedente de embriones no tratados con morfina. H3K27AcUNT: DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo H3K27Ac procedente de embriones no tratados con morfina. CTRL_MORF: CTRL_UNT: DNA no inmunoprecipitado procedente de embriones tratados con morfina. H3K27MeMORF: DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo H3K27me3 procedente de embriones tratados con morfina. H3K27AcMORF: DNA inmunoprecipitado con el anticuerpo H3K27Ac procedente de embriones tratados con morfina.

3. Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética: cambios en la metilación del DNA. Efectos sobre la expresión de la proteína Nestin.

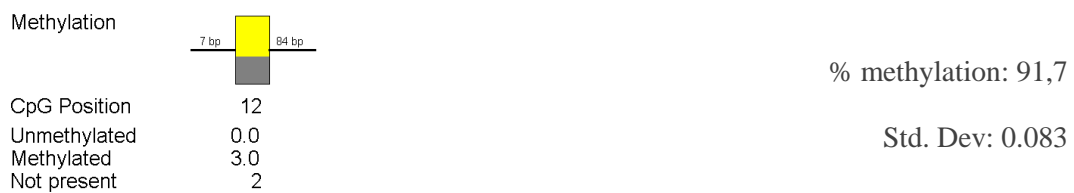
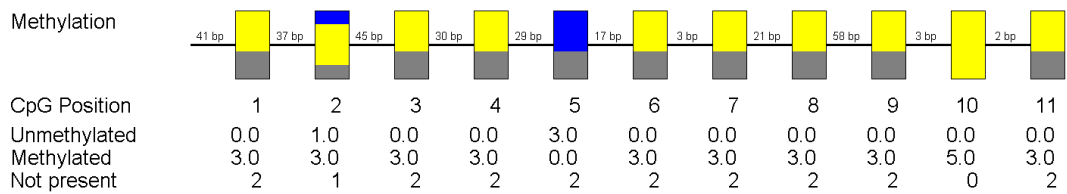
El efecto de la morfina sobre la marca H3K27ac apuntó al papel activador de este fármaco sobre la expresión de Nestin ya que se observa una menor condensación de la cromatina en su promotor distal. Dado que existe otro mecanismo de regulación epigenética que afecta a la transcripción, la metilación de DNA, se planteó la posibilidad de que el promotor del gen *nestin* contara con una regulación más compleja tras la exposición a morfina, presentando ambos tipos de control epigenético.

A. Estudio de la metilación del DNA en el promotor distal de *nestin*

Mediante la técnica de conversión de bisulfitos acoplada a secuenciación tipo *Sanger*, se determinó el grado de metilación de parte del promotor distal de *nestin*. En este caso, la región estudiada contó con un tamaño de 400 pb en la que se incluía la zona afectada por la marca epigenética H3K27ac determinada en el estudio de *ChIP-seq*.

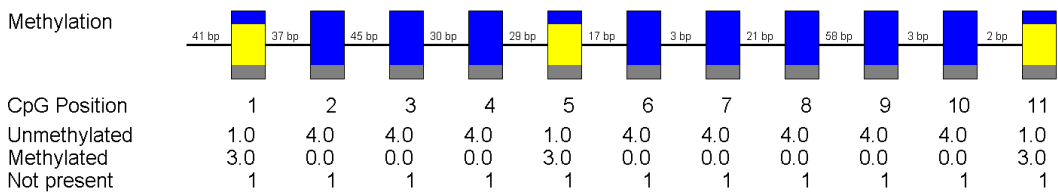
Los resultados obtenidos indicaron que la secuencia estudiada se encuentra metilada en un 91,7% en situación control (Fig. 22A). Sin embargo, el tratamiento con morfina redujo este porcentaje hasta el 33,3% (Fig. 22B). Esta reducción de la metilación se encontró en las secuencias CpG centrales del fragmento de DNA estudiado. Cabe destacar que la región CpG en posición 5 dentro de la secuencia analizada no se encontraba metilada en el grupo control, pero sí tras el tratamiento con morfina, al contrario de lo que sucedió con el resto de regiones CpG.

A



Legend: ■ unmethylated ■ methylated ■ not present

B



Legend: ■ unmethylated ■ methylated ■ not present

Figura 22. Estudio de metilación del DNA en el promotor distal de *nestin*. El análisis del porcentaje de DNA metilado en el promotor distal de *nestin* se realizó en embriones de pez cebra a las 24 hpf no tratados (A) y tratados con morfina 10 nM (B). Para este estudio se escogió la técnica de conversión de bisulfitos acoplada a secuenciación de tipo *Sanger*. Las regiones CpG se muestran a lo largo de la secuencia estudiada representadas en forma de bloques. En el grupo control el porcentaje de secuencias CpG metiladas (Amarillo) representó un 91,7%, mientras que en el grupo de embriones expuestos a morfina 10 nM se cuantificó un 33,3% de regiones metiladas. Las secuencias no metiladas se representan en azul. En gris quedan representadas las regiones con fallos de lectura en la secuenciación. La secuenciación se realizó partiendo de cinco clones distintos para cada grupo experimental. Cada clon mostró una identidad de, al menos, el 90% con respecto a la secuencia original. Análisis de las secuencias, estadístico y diagrama realizados con el software BiQanalyzer.

B. Estudio de la expresión del factor de transcripción Sox2 tras la exposición a morfina durante el desarrollo del pez cebra

Los efectos de la exposición a morfina sobre la expresión de *sox2* se estudiaron en varios estadios del desarrollo (8 hpf, 16 hpf, 24 hpf y 48 hpf) con el fin de determinar un posible periodo de mayor impacto del tratamiento. Los resultados de qPCR (Fig. 23) muestran cambios en todos los estadios estudiados salvo a 48 hpf, donde la expresión de *sox2* en los embriones tratados con morfina 10 nM se mantiene similar a la de los controles. En los embriones de 8 y 16 hpf se observa un aumento de más del doble en la expresión de este gen. Sin embargo, el incremento más pronunciado se produce a las 24 hpf. En los embriones expuestos a morfina en este estadio, la expresión de *sox2* alcanza valores cercanos a 10 veces la situación control indicando que el mayor efecto de la exposición a morfina tiene lugar en este punto del desarrollo del pez cebra.

C. Efecto del silenciamiento de los microRNAs 212/132 y el receptor opioide μ sobre la expresión del factor de transcripción Sox2

Una vez determinado el efecto ejercido por la morfina sobre la expresión de *sox2*, se estudió el posible papel regulador de los miRNAs 212 y 132 y el receptor opioide μ sobre la expresión de este factor de transcripción. Para ello, se silenció la expresión de los miRNAs 212 y 132 y del gen *oprm1* mediante la técnica de microinyección de morfolino (Fig. 24).

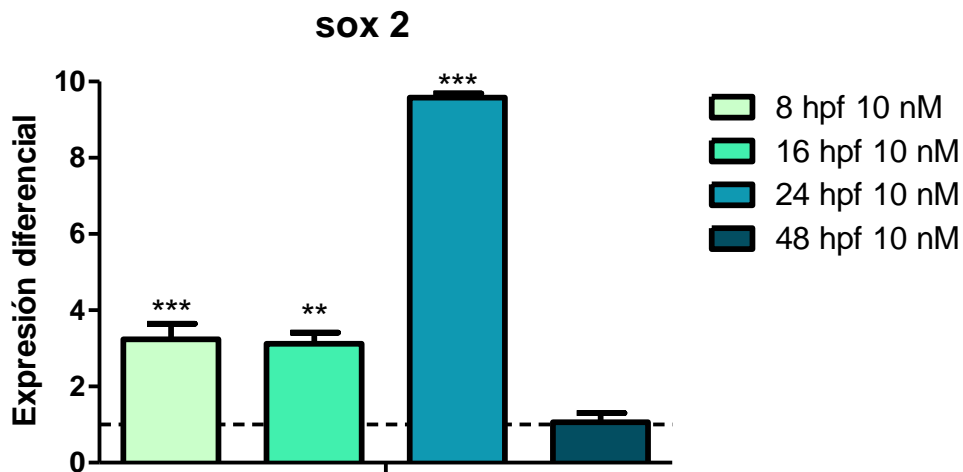


Figura 23. Cambios en los niveles de expresión de *sox2* tras la exposición a morfina 10 nM durante el desarrollo del pez cebra. La expresión de *sox2* fue determinada a las 8, 16, 24 y 48 hpf tras la exposición a morfina desde las 5 hpf. El tratamiento con morfina sobre-expresó *sox2* en todas las edades estudiadas excepto a las 48 hpf. Los cambios en la expresión relativa se muestran comparando los grupos de embriones tratados frente a los controles de los diversos estadios (línea punteada). Los resultados se presentan con la media \pm SEM (n=3). *: Diferencia estadística; **p< 0.01. ***p< 0.001. 10 nM: tratamiento con morfina 10 nM.

La expresión de *sox2* disminuye tanto a 8 como a 16 hpf tras el silenciamiento de los miRNAs y el receptor opioide. No obstante, el efecto observado en estos estadios se revierte en edades posteriores. A las 24 hpf, la expresión de *sox2* aumenta en los morfantes del *mir132* y *oprm1*, mientras que se mantiene en niveles cercanos a los observados en embriones control en los morfantes del *mir212*. Este efecto sobre la expresión de *sox2* es constante hasta las 48 hpf. Además, los morfantes para el *mir212* muestran una sobre-expresión del factor de transcripción *sox2*.

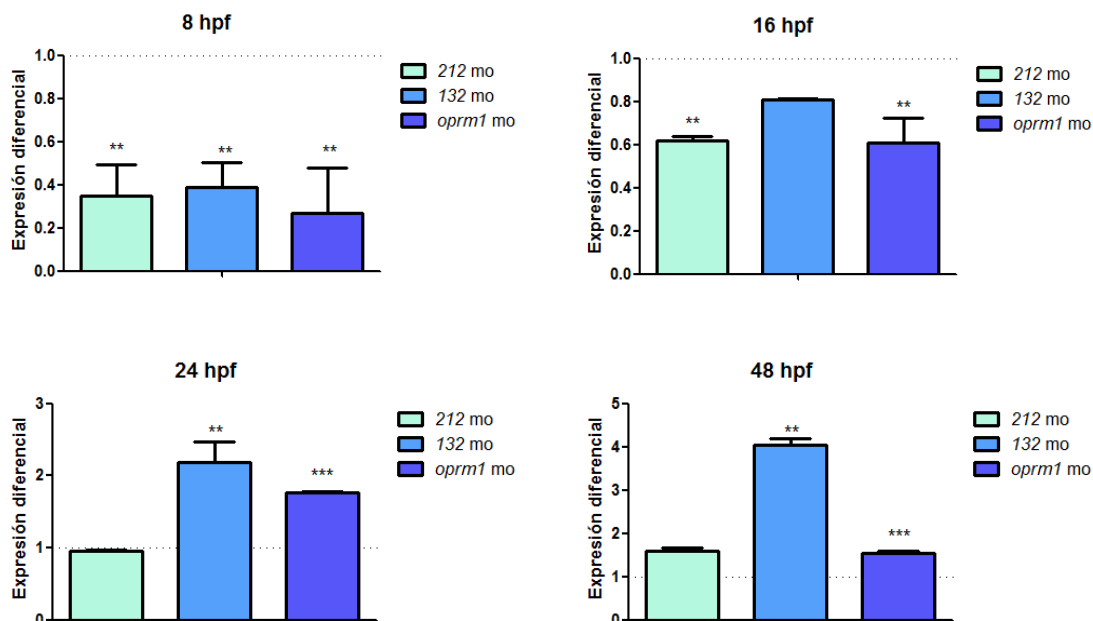


Figura 24. Cambios en los niveles de expresión de *sox2* tras el silenciamiento del *mir212*, *mir132* y *oprm1* en distintos estadios del desarrollo del pez cebra. La expresión de *sox2* fue determinada a las 8, 16, 24 y 48 hpf tras el silenciamiento de los genes *mir212*, *mir132* y *oprm1*. La expresión de este factor de transcripción decreció en todos los grupos estudiados a 8 y 16 hpf mientras se mantuvo cercana a los niveles control o aumentó a las 24 y 48 hpf. Los cambios en la expresión relativa se muestran comparando los grupos de embriones morfantes frente a los controles de los diversos estadios (línea punteada). Los resultados se presentan con la media \pm SEM (n=3). *: Diferencia estadística; **p< 0.01. ***p< 0.001. 212 mo: embriones morfantes para el *mir212*. 132 mo: Embriones morfantes para el *mir132*. Oprm1 mo: Embriones morfantes para *oprm1*.

D. Estudio de la unión de los microRNAs 212 y 132 a la secuencia del exón de Sox2

Los cambios observados en la expresión de *sox2* tras el silenciamiento del *mir212* y el *mir132* a las 24 y 48 hpf, apuntaron a una posible regulación de estos miRNAs sobre *sox2*. Para determinar dicho efecto se realizó un análisis bioinformático de la secuencia de *sox2* estudiando las posibles regiones de unión para los *mir212* y *mir132* existentes. Las predicciones con la herramienta *m-fold* concluyeron que existía una posible región de unión dentro del único exón de *sox2* para ambos miRNAs (Fig. 25A y B). Sin embargo, esta unión parecía ser inespecífica debido al tipo de estructura formada entre los miRNAs y la secuencia del exón de *sox2*. Esta estructura presentaba varios bucles y una escasa unión de la región semilla de los miRNAs al mRNA del exón. La comprobación experimental de esta unión predicha se realizó mediante un ensayo de

luciferasa (Fig. 25C). Este ensayo determinó que la unión predicha no era fisiológicamente activa dado que la quimioluminiscencia emitida por los grupos de células transfectadas con la secuencia diana y *mimics* de los miRNAs no cambió con respecto a la emitida por las células transfectadas con el plásmido vacío.

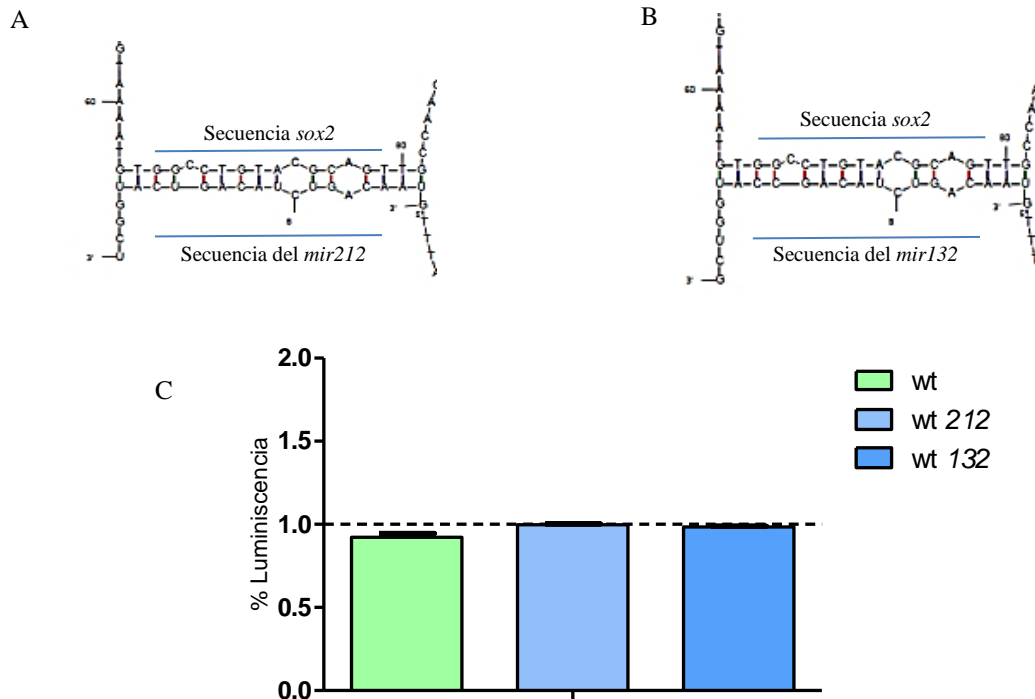


Figura 25. Estudio de la unión del *mir212* y *mir132* a la secuencia de *sox2*. Predicción bioinformática de la unión del *mir212* y el *mir132* al exón de *sox2* (A y B). El tipo de estructura mostrada indica una unión imperfecta entre los miRNAs y la secuencia estudiada. La unión predicha se corroboró mediante un ensayo de luciferasa (C). La quimioluminiscencia emitida por todos los grupos estudiados fue igual en todos los casos, indicando que los miRNAs 212 y 132 no se regulan directamente la expresión de *sox2*. Los resultados se muestran como la media \pm SEM (n=3). Wt: secuencia de *sox2* transfectada en células HEK 293. Wt 212: secuencia de *sox2* transfectada junto al *mimic* del *mir212* en células HEK 293. Wt 132: secuencia de *sox2* transfectada junto al *mimic* del *mir132* en células HEK 293.

C. Efectos de la exposición a morfina en la expresión de Nestin

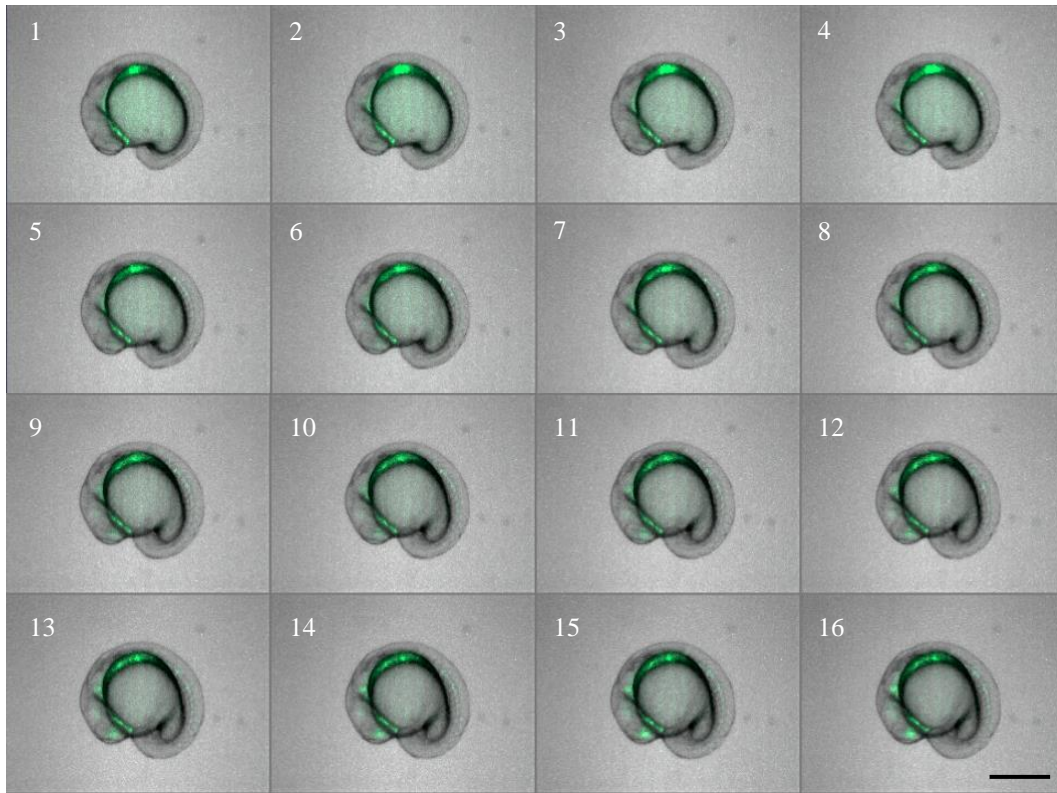
Los resultados relacionados con la regulación epigenética del promotor distal de *nestin* apuntaban a una posible sobre-expresión de la proteína que codifica para este gen. Teniendo en cuenta estos hallazgos, se analizó la expresión de Nestin en embriones transgénicos (Tg[-3.9nestin:GFP]) en situación control y tras la exposición a morfina. Este modelo permitió el análisis *in vivo* de la expresión de Nestin. Dicho estudio se realizó mediante el seguimiento de la proteína verde fluorescente (GFP por sus siglas en inglés) con la técnica de *time-lapse*. Para ello se seleccionaron varios estadios del desarrollo del pez cebra aunque los mayores cambios se observaron a las 18 hpf y en las

horas cercanas al fin de la formación del SNC (24 hpf). Debido a las condiciones óptimas de desarrollo requeridas por los embriones, la toma de imágenes se prolongó durante 2 horas, realizándose por separado con el fin de mantener a los embriones tratados con morfina constantemente expuestos a este fármaco durante el experimento.

Durante las primeras horas de su expresión (18 hpf) las células positivas para la proteína Nestin comienzan a aparecer desde la región ventral del embrión y se desplazan dorsalmente en la región de la médula espinal (Fig. 26A 1-7). Posteriormente, se dirigen hacia la región prosencefálica y mesencefálica (Fig. 26A 8-16). En la vista coronal de los embriones control se puede observar la gran extensión de células que expresan Nestin (Fig. 26B 1'-6') que, durante este tiempo de desarrollo, forman focos más localizados a medida que ascienden a la región encefálica (Fig. 26B 7'-16'). El tratamiento con morfina aumentó la expresión de Nestin en las regiones observadas, expresándose con mayor intensidad que en los embriones control en la médula espinal, prosencefalo y mesencefalo, desde las 18 hpf (Fig. 27A 1-16). Este mismo efecto se observó en la vista coronal de los embriones expuestos a morfina 10 nM (Fig. 27B 1'-16').

Al analizar la expresión de Nestin en estadios más avanzados (24 hpf) se observó un gran aumento de la proteína en el encéfalo y la médula espinal (Fig. 28A-B y Fig. 29). Esta expresión es mucho más intensa tras la exposición a morfina principalmente en las regiones del mesencefalo, rombencefalo y médula espinal (Fig. 30A -B y Fig. 31).

A



B

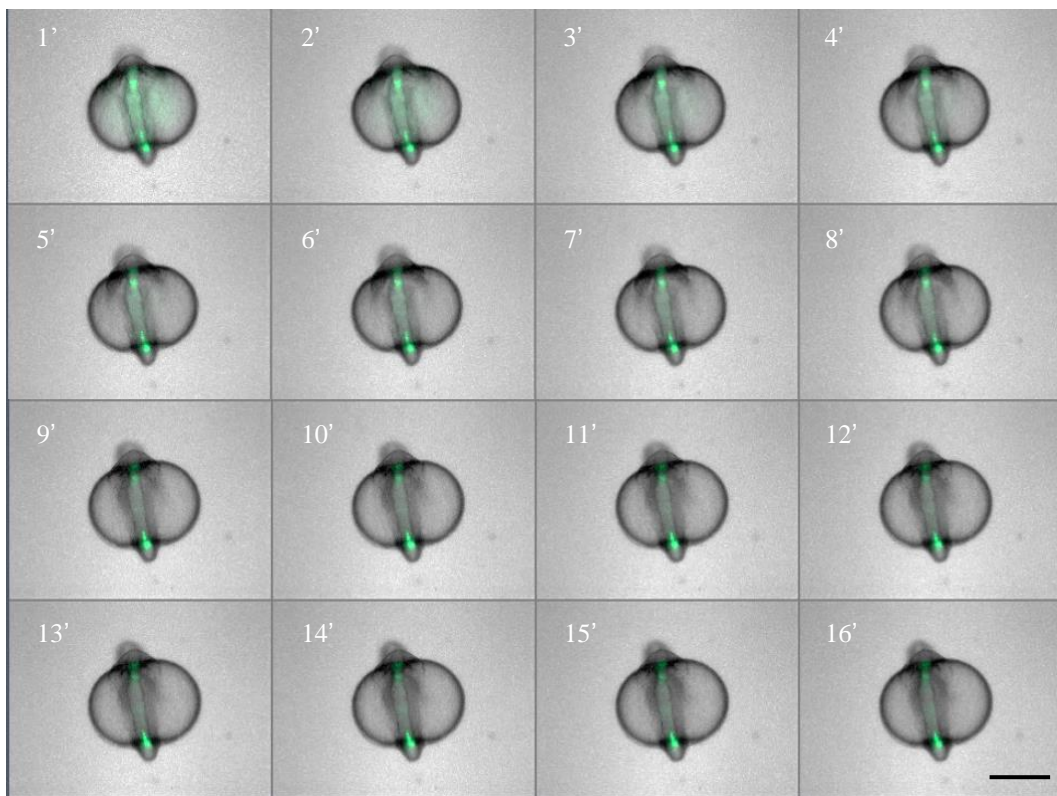
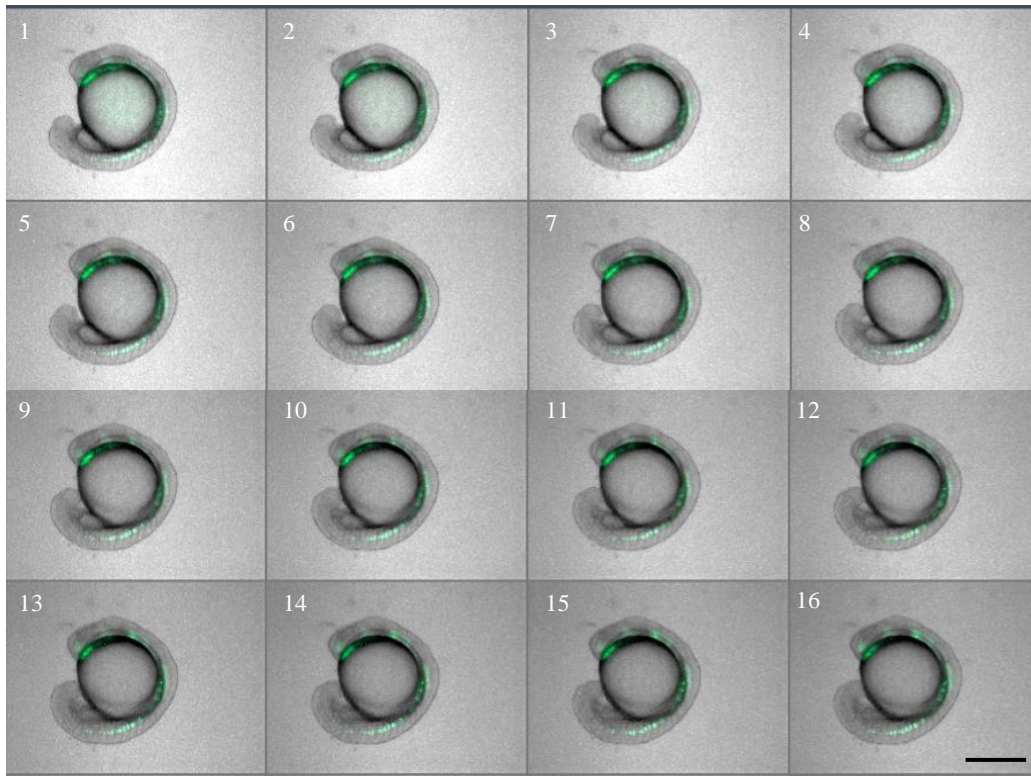


Figura 26. Expresión de Nestin durante del desarrollo del pez cebra (18-20 hpf) en embriones control. Vista lateral (A) y coronal (B). Selección de imágenes tomadas cada 5 minutos entre las 18 y las 20 horas de desarrollo de embriones transgénicos para Nestin (verde). Barra de escala: 200 μ m.

A



B

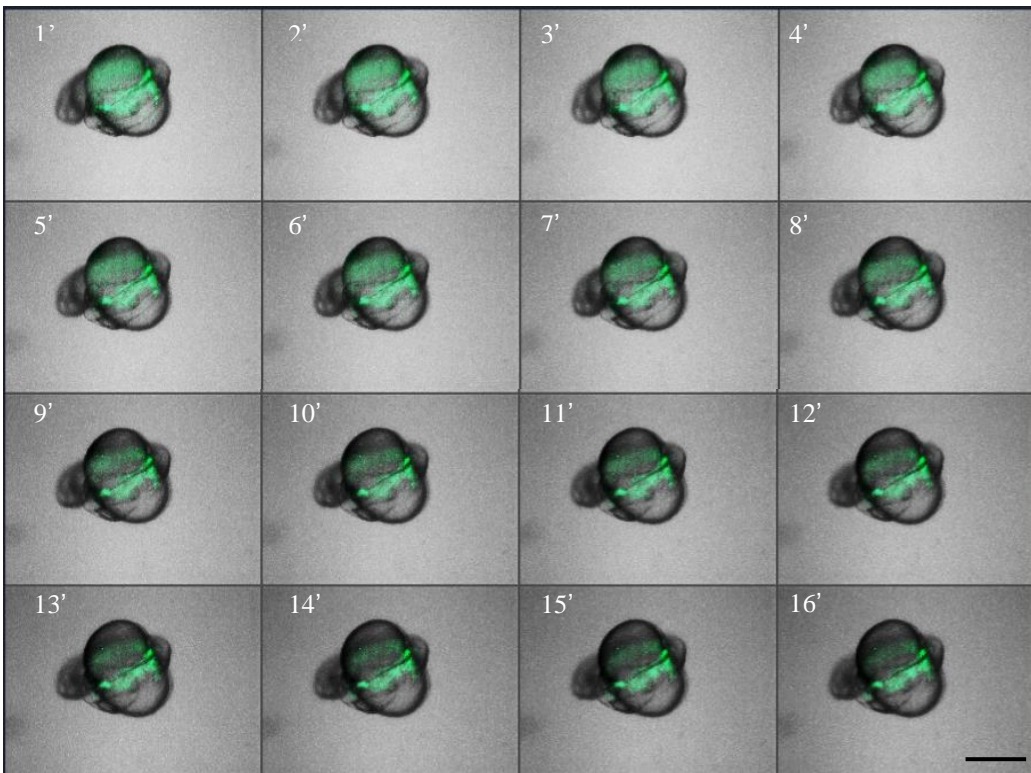


Figura 27. Expresión de Nestin durante del desarrollo del pez cebra (18-20 hpf) en embriones expuestos a morfina 10 nM. Vista lateral (A) y coronal (B). Selección de imágenes tomadas cada 5 minutos entre las 18 y las 20 horas de desarrollo de embriones transgénicos para Nestin (verde). Barra de escala: 200 μ m.

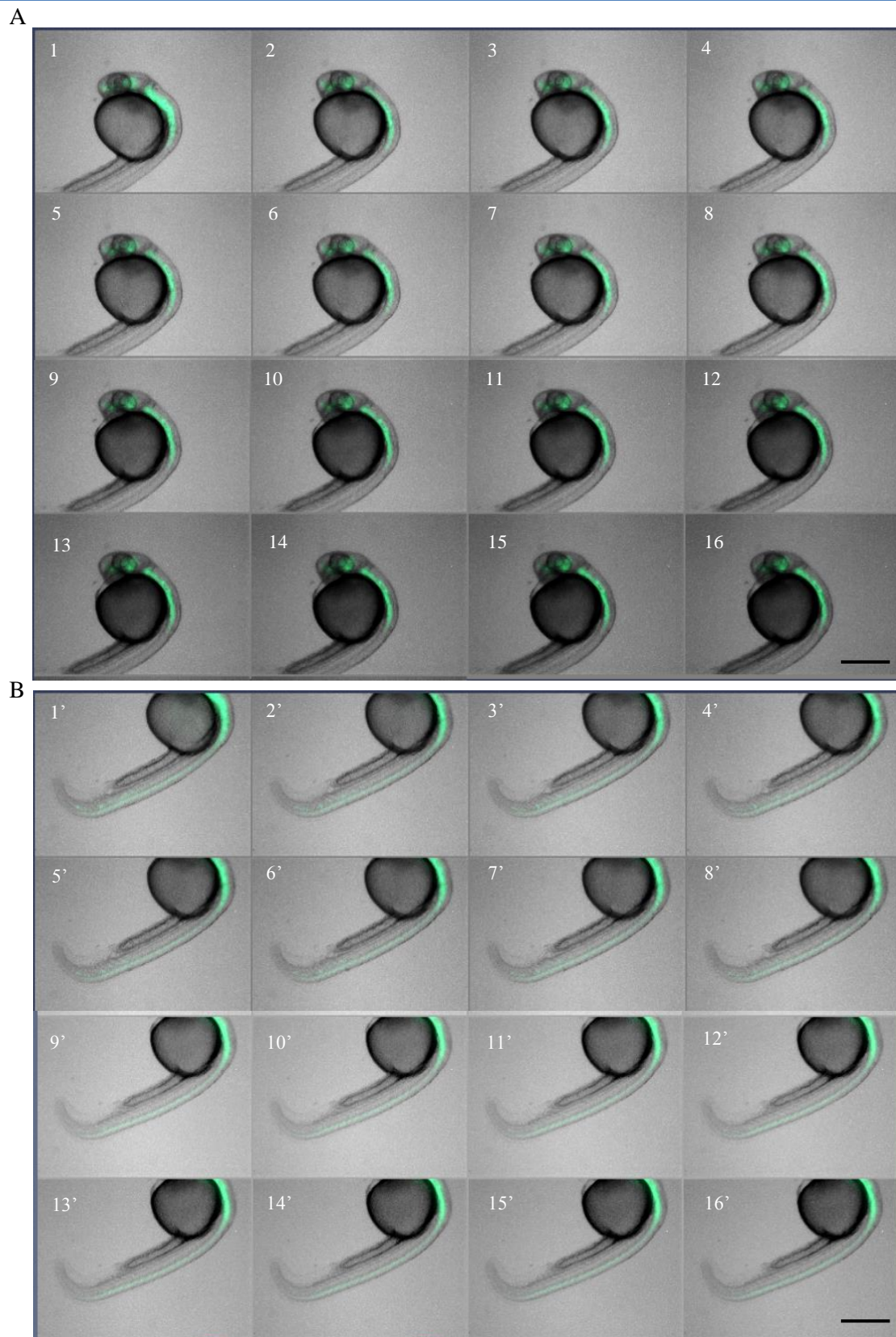


Figura 28. Expresión de Nestin durante del desarrollo del pez cebra (24-26 hpf) en embriones control. Vista lateral de la región encefálica (A) y de la región medular (B) en los mismos embriones. Selección de imágenes tomadas cada 5 minutos entre las 24 y las 26 horas de desarrollo de embriones transgénicos para Nestin (verde). Barra de escala: 200 μm .

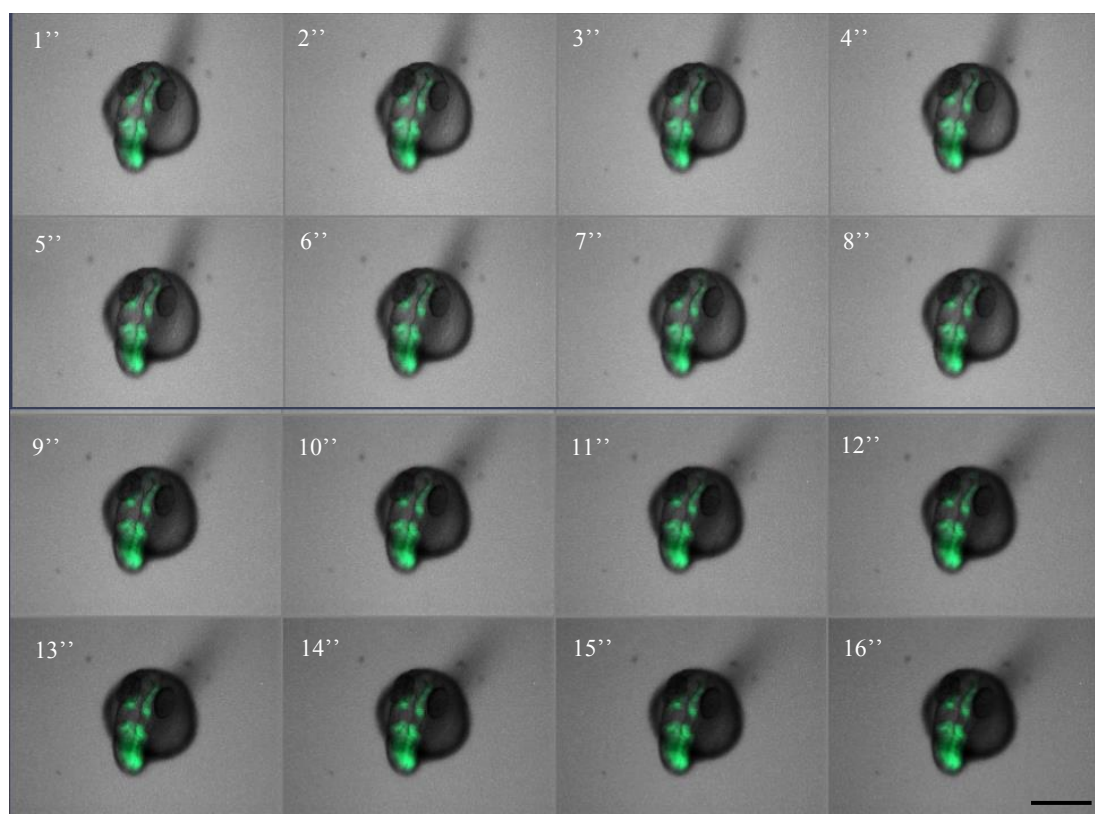


Figura 29. Expresión de Nestin durante del desarrollo del pez cebra (24-26 hpf) en embriones control. Vista coronal. Selección de imágenes tomadas cada 5 minutos entre las 24 y las 26 horas de desarrollo de embriones transgénicos para Nestin (verde). Barra de escala: 200 μ m.

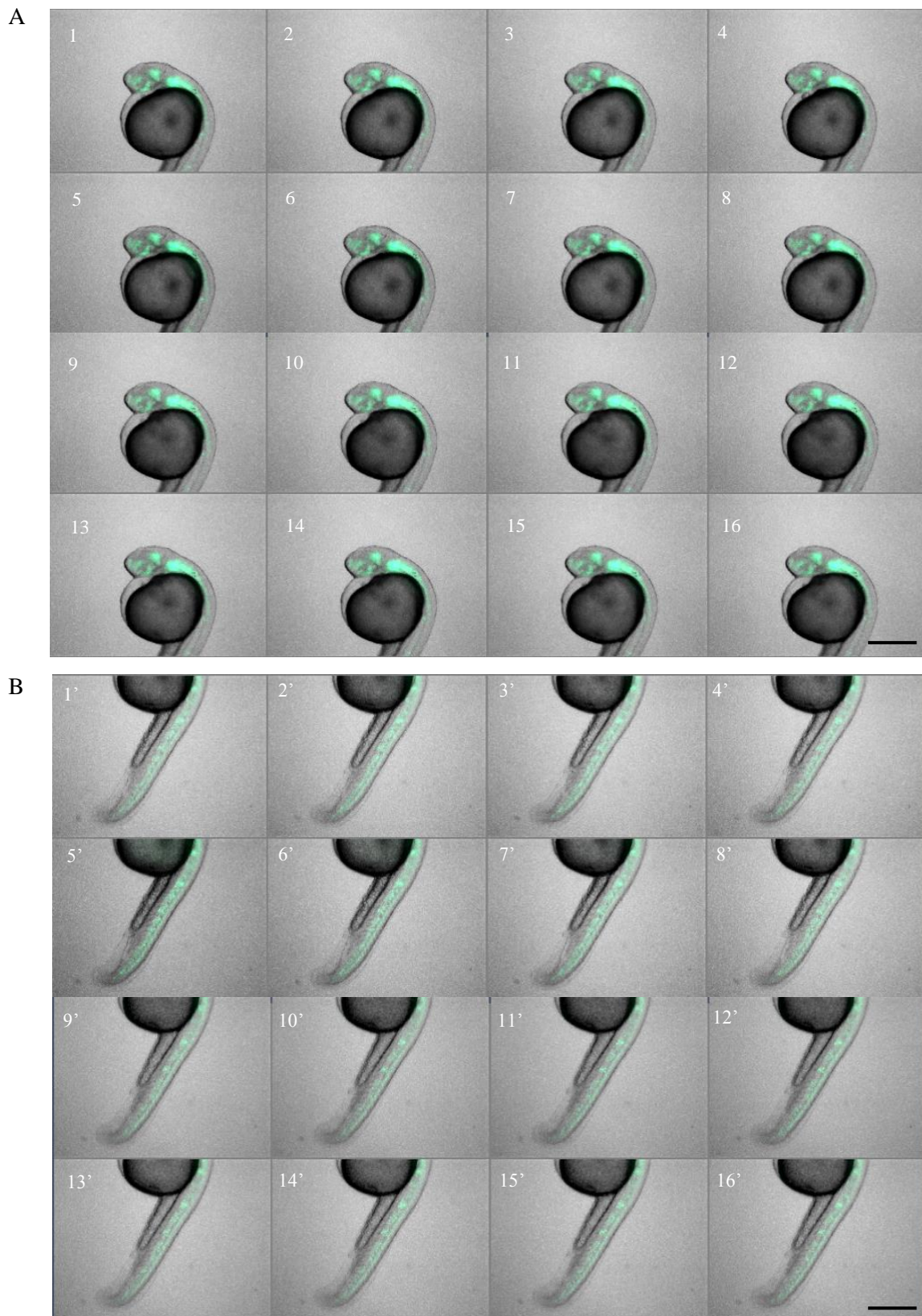


Figura 30. Expresión de Nestin durante del desarrollo del pez cebra (24-26 hpf) en embriones expuestos a morfina 10nM. Vista lateral de la región encefálica (A) y de la región medular (B) en los mismos embriones. Selección de imágenes tomadas cada 5 minutos entre las 24 y las 26 horas de desarrollo de embriones transgénicos para Nestin (verde). Barra de escala: 200 μ m.

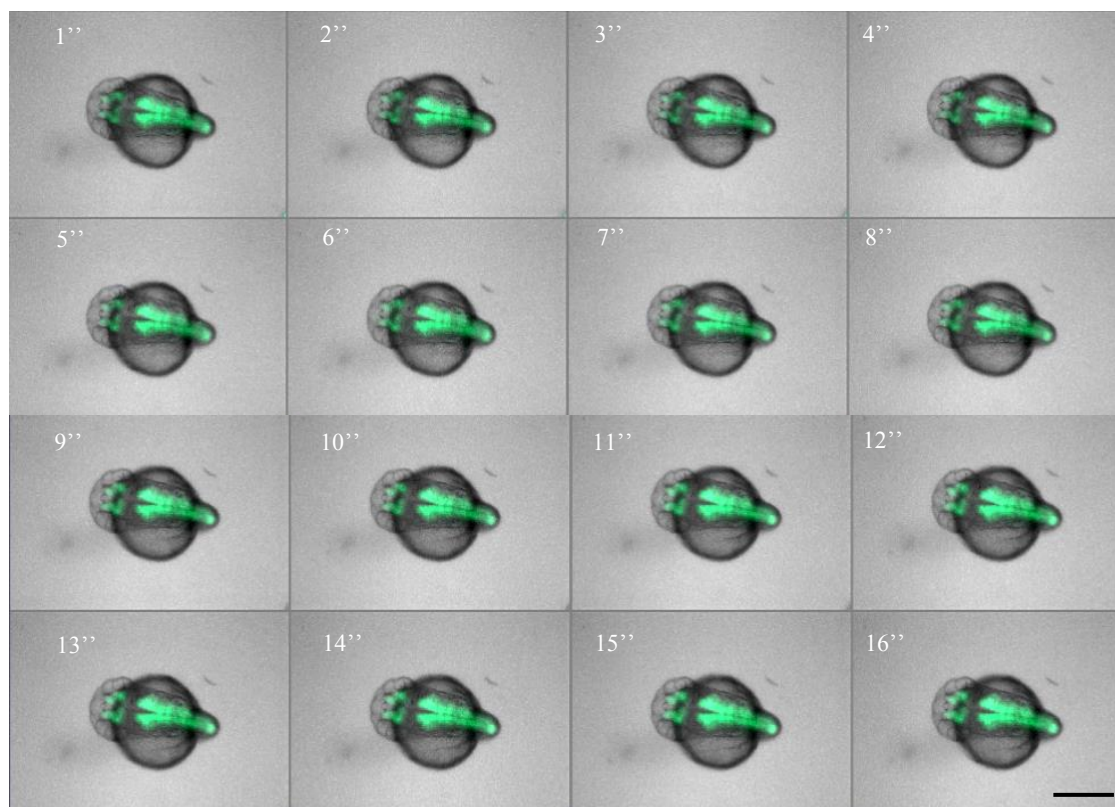


Figura 31. Expresión de Nestin durante el desarrollo del pez cebra (24-26 hpf) en embriones expuestos a morfina 10 nM. Vista coronal. Selección de imágenes tomadas cada 5 minutos entre las 24 y las 26 horas de desarrollo de embriones transgénicos para Nestin (verde). Barra de escala: 200 μ m.

El hecho de contar con peces transgénicos para la proteína Nestin hace posible observar directamente los efectos de la exposición a morfina en precursores neuronales ya que estos aparecen marcados con la proteína verde fluorescente en un cultivo primario de neuronas. Este estudio se realizó en neuronas incubadas durante 48 horas con morfina 1 nM de las que se tomaron imágenes durante 8 horas (Fig. 32). El efecto de agregación de las células inducido por la morfina (Fig. 11), volvió a observarse en estos cultivos. Además, el tratamiento con morfina prolongó la expresión de Nestin en los precursores neuronales, retrasando, por tanto, su diferenciación a células maduras.

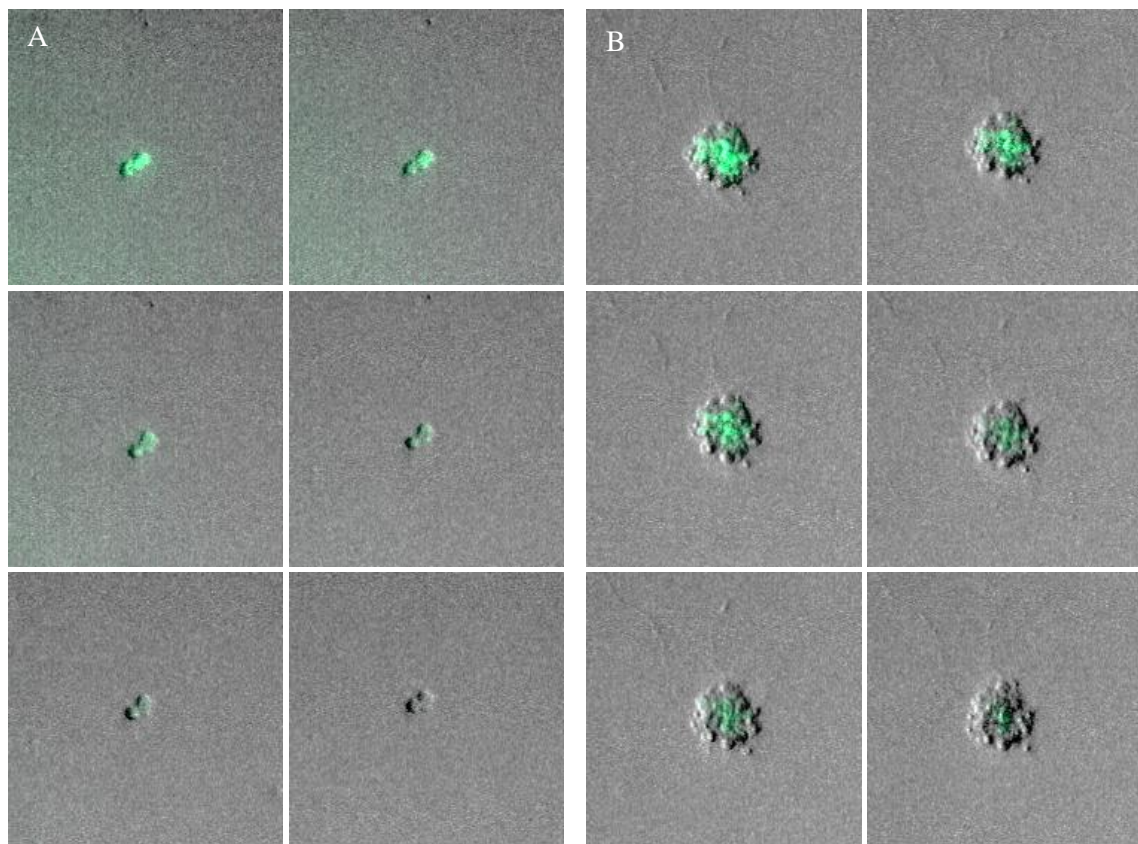


Figura 32. Expresión de Nestin durante el desarrollo de los precursores neuronales. Selección de imágenes tomadas cada 10 minutos durante 8 horas de desarrollo en un cultivo de células control (A) y expuestas a morfina 1 nM (B) Precursores neuronales (Nestin) marcados en verde.

Discusión

1. Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética mediados por RNA no codificantes: cambios sobre el *miRNA 212* y el *miRNA 132*.

En el presente trabajo se prueba que la morfina desencadena cambios en la expresión del *mir212* y *mir132* en el pez cebra a las 48 hpf. Los niveles de *mir212* disminuyeron tras la exposición a morfina mientras que el *mir132* aumentó comparado con los niveles del grupo no tratado. Ambos miRNAs pertenecen al mismo *cluster* genético (Kumarswamy y cols, 2014) y se ha descrito que en los *clusters* los miRNAs que los componen a menudo se encuentran regulados de la misma manera (Schmeier y cols, 2009). En este trabajo, esta regulación conjunta no parece ser la responsable de los resultados observados dado que los niveles del *mir212* y el *mir132* cambian de manera opuesta tras la exposición a morfina. Varios autores han descrito que la transcripción del *mir212* y el *mir132* se encuentra regulada por CREB en mamíferos y esta regulación además se conserva evolutivamente (Berrios y cols., 2008; Wanet y cols., 2012). La morfina desencadena varias rutas que activan CREB mediante la unión al OPRM1 (Nestler y cols., 2004). Por tanto se puede extrapolar que esta respuesta a CREB también ocurre en nuestro modelo (embriones de pez cebra) dado que los experimentos con naloxona han probado que la morfina está ejerciendo cambios en el *mir212* y *mir132* a través de la activación de OPRM1.

Al observar las consecuencias morfológicas de los resultados obtenidos tras el tratamiento con morfina, se analizaron los efectos en el SNC dado que este fármaco induce diversos cambios a este nivel como los producidos en proliferación celular (Korostynski y cols., 2007; Berrios y cols., 2008). Nuestro grupo de investigación ha descrito previamente que el área periventricular, el mesencéfalo y el rombencéfalo están relacionados con el sistema opioide (López-Bellido y cols., 2012); por tanto este análisis se enfocó en dichas regiones en las que existe un cambio en la localización de las células proliferativas en torno a la línea media tras la exposición a morfina. Estos cambios solo volvieron a observarse tras el silenciamiento del *mir132*. Además, la relación entre el *mir132* y el número de células proliferativas se ha descrito en patologías como el carcinoma hepatocelular y el cáncer de pulmón en los cuales el *mir132* afecta a la proliferación celular (Liu K. y cols., 2015; Liu X. y cols 2015), según muestran nuestros resultados de morfantes de *mir132* tras la cuantificación de las

células en proliferación y apoptosis (Fig. 11). No obstante, estos cambios en el número de células no fueron estadísticamente significativos probando que, en este estadio, la morfina solo ejerce una influencia en la localización de las células proliferativas en el SNC, pero no en el número de células. Los miRNAs *mir212* y *mir132*, están involucrados en estos efectos, como se discutirá más adelante.

A la vista de estos resultados, nuestro trabajo se centró en las neurotrofinas como posibles efectores de los cambios inducidos por morfina durante la proliferación celular. Se ha demostrado que las neurotrofinas controlan la plasticidad neuronal, la supervivencia celular y la diferenciación (Skaper y cols., 2012). Además, BDNF es la proteína más abundante de este grupo en el SNC. De Felice y cols., (2014) han descrito la expresión de BDNF en el cerebro en desarrollo del pez cebra. BDNF y TrkB han sido anteriormente descritos como susceptibles de ser modulados por la morfina en modelos murinos (Lunden y cols., 2013; Rozyski y cols., 2013). No obstante, no se ha observado ningún efecto de la morfina sobre estas proteínas en el pez cebra. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que la exposición a morfina aumenta la expresión *Bdnf* y *TrkB* en los embriones de pez cebra.

Las diferencias observadas en la expresión de *Bdnf* tras el silenciamiento de los miRNAs demuestran que el *mir132* tiene un efecto mayor en la regulación de *Bdnf* y en los cambios inducidos por morfina. A pesar de estos datos, el análisis de los morfantes de los miRNAs mostró evidencias claras de que los *mir212* y *mir132* no son las únicas moléculas involucradas en los efectos de la morfina en la regulación de *Bdnf*, dado que no se logró suprimir completamente su expresión. Debido a la abundante bibliografía que confirma los efectos de la morfina en la expresión de *Oprm1* (Prenus y cols., 2012; Zhu y cols., 2012; Lu y cols., 2014; Garcia-Concejo y cols., 2016), se analizaron los morfantes para *oprm1*. Según los cambios observados en la expresión de *Bdnf*, comparados con los presentados por los morfantes de los *mir212* y *mir132*, *Oprm1* ejerce una regulación directa sobre la expresión de esta neurotrofina, sugiriendo que existe una relación entre el sistema opioide y las neurotrofinas. Este resultado no es sorprendente dado que otros receptores acoplados a proteína G, como CB1, han sido relacionados con la regulación directa de BDNF (Blazquez y cols., 2015). Por el contrario, los niveles de la proteína *TrkB* sólo cambiaron en los morfantes del *mir212*, lo cual indica que *mir212* regula *TrkB* y es necesario para la correcta expresión de este receptor. Esta regulación puede ser indirecta debido a la ausencia de un sitio de unión

para el *mir212* en la secuencia de *trkb*, confirmada por predicciones bioinformáticas (Ver anexo 10).

La región de unión de los miRNAs ha sido señalada como un factor clave para el posterior procesamiento de su diana (Fang y cols., 2011; Berillo y cols., 2013). No obstante, la ausencia de una región de unión para el *mir212* y *mir132* en la secuencia de mRNA de *bdnf* apunta a la existencia de un regulador intermedio de esta proteína al cual se unen los miRNAs. Por tanto, se analizó la relación entre el *mir212* y el *mir132* y *mecp2* dado que la proteína que codifica este gen es inhibidora de la expresión de BDNF (Hollander y cols., 2010). El hecho de que ambos miRNAs inhiban al gen de *mecp2* de pez cebra explica los mayores niveles de Bdnf obtenidos tras la exposición a morfina. Además, se ha observado que la morfina mejora la expresión del *mir132* pero no la del *mir212*; por tanto, se puede concluir que el *mir132* tiene un mayor efecto en la inhibición de *mecp2* tras la exposición morfina.

Dado que se han encontrado diferencias en la localización celular en los experimentos *in toto* (Fig. 11 y 12), se obtuvo un cultivo primario de neuronas de embriones de pez cebra para confirmar que estos efectos inducidos por la morfina ocurrían en neuronas. El aumento de TrkB que se obtuvo en estos cultivos también fue observado por *western blot* y puede estar relacionado con la disminución inducida por la morfina en los niveles del *mir212* dado que se ha demostrado que la ausencia de este miRNA desregula la expresión normal de TrkB. Hemos comprobado que la morfina aumenta la expresión de Bdnf, por tanto se analizaron los efectos de la exposición a BDNF exógeno sobre un grupo de neuronas para imitar los efectos inducidos por la morfina. La exposición a BDNF aumentó la expresión de TrkB aunque la incubación conjunta con morfina y BDNF también indujo cambios en la agregación celular (Fig. 18). Estos efectos prueban que la morfina es capaz de inducir modificaciones en la localización de las neuronas, de manera similar a lo observado en los estudios *in toto*. En base a estos resultados, se puede comprobar que los cambios moleculares inducidos por la morfina durante la formación neuronal pueden alterar otros sistemas además del opioide, como se ha descrito en estudios previos de nuestro grupo (Sanchez-Simon y cols., 2010a; Sanchez-Simon y cols., 2010b).

En el presente trabajo, se demuestra que el *mir212*, *mir132* y *Oprm1* son novedosos reguladores que relacionan los opioides y las neurotrofinas. Aunque varios autores han

propuesto una regulación negativa de la expresión de BDNF tras la exposición a morfina (Lunden y cols., 2013; Ahmaladipour y cols., 2015), con este estudio se demuestra que la morfina es un facilitador de la expresión de Bdnf en este estadio del desarrollo del pez cebra (48 hpf).

Considerando esto, se propone un mecanismo (Fig. 33) según el cual la activación de *Oprm1* por la morfina conduce a cambios en los *mir212* y *mir132* a través de la regulación de Creb (Fig. 33-1). Adicionalmente, los *mir212* y *mir132* son reguladores de *mecp2*, el cual ha sido descrito como un inhibidor de BDNF (Hollander y cols., 2010) (Fig. 33-2). Por tanto, los cambios desencadenados por la morfina en ambos miRNAs aumentan la expresión de Bdnf (Fig. 33-3). Este aumento en la expresión de Bdnf es principalmente ejercido por el *mir132* dado que la morfina lo sobre-expresa a las 48 hpf mientras que disminuye al *mir212*, señalando la posible relevancia del *mir132* en este estadio. Consecuentemente, tras el incremento de Bdnf, la expresión de *Trkb* aumenta (Fig. 33-4), como ya describió Ji y cols., (2010). No obstante, *Oprm1* también está directamente involucrado en la regulación de Bdnf dado que los morfantes de *oprm1* redujeron drásticamente la expresión de Bdnf (Fig. 33-1').

La relevancia de este mecanismo yace en la influencia de la morfina en la expresión de Bdnf el cual tiene efectos en la localización de las células proliferativas y la agregación neuronal (Fig. 33-5). Esta influencia se ejerce a través de la alteración de los *mir212* y *mir132* y afecta negativamente al correcto desarrollo del SNC. Contrarrestar estos efectos secundarios inducidos por la morfina en el desarrollo temprano ha sido objeto de estudio durante los últimos años (Golalipour y cols., 2013), dado que la exposición prenatal a opioides afecta a los fetos en mujeres gestantes que abusan de estas drogas (Kremer y Arora, 2015). Por tanto, la implicación de estos miRNAs en los efectos de la morfina les convierte en novedosas dianas para la posible regulación de los cambios desencadenados por la exposición a morfina y abre nuevas puertas a un conocimiento más profundo en el control de los efectos de la morfina.

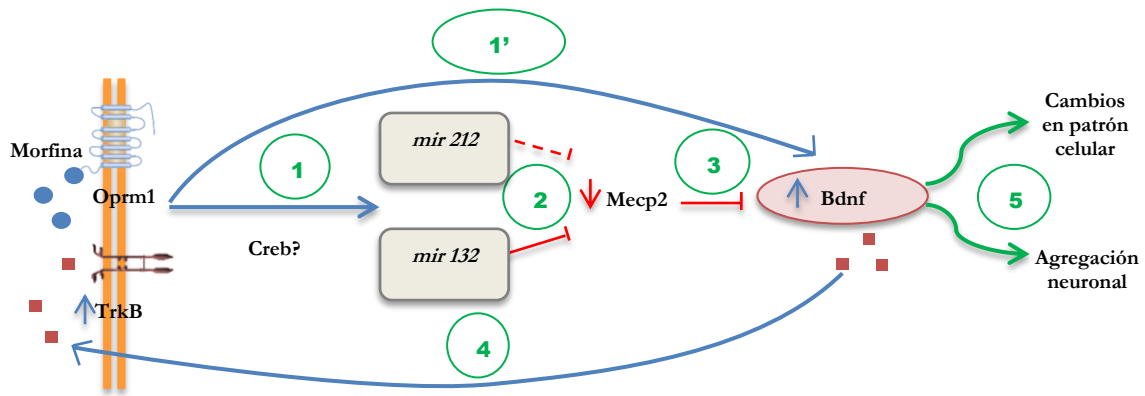


Figura 33. Mecanismo propuesto para los efectos de la morfina durante el desarrollo del SNC del pez cebra. La activación de Oprm1 por la morfina conduce a cambios en el *mir212* y *mir132* a través de la regulación de Creb a las 48 hpf (1). Dado que ambos miRNAs son reguladores negativos de MeCP2, su expresión disminuyó (2). En este estadio, el *mir132* tiene un efecto mayor en esta regulación dado que la morfina aumenta su expresión (Línea continua) comparada con el *mir212* (Línea discontinua). MeCP2 ha sido descrito como un inhibidor de BDNF y, por su menor expresión conlleva un aumento de BDNF (3). Debido a este incremento en la expresión de su ligando, TrkB también se ve sobre-expresado (4). Las alteraciones inducidas en BDNF tienen consecuencias morfológicas que resultan en cambios en la localización de las células proliferativas y la agregación neuronal (5). En paralelo a estos cambios, también se ha descrito una regulación directa de los efectos de la morfina sobre BDNF a través de Oprm1 (1'). Las líneas azules indican efectos estimuladores. Las líneas rojas indican efectos inhibidores. Oprm1: receptor opioide mu; TrkB: receptor con actividad tirosina quinasa B; Creb: elemento de unión en respuesta al AMPc; MeCP2: methyl CpG binding protein 2; BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro. Jimenez-Gonzalez y cols., 2016.

2. Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética: cambios en las modificaciones de histonas H3K27ac y H3K27me3.

Los efectos de la exposición a morfina en las modificaciones de histonas fueron estudiados en embriones de pez cebra de 24 hpf separados en grupos control y tratados con morfina 10 nM. La técnica de inmunoprecipitación de cromatina acoplada a secuenciación de alto rendimiento permitió estudiar algunas modificaciones de histonas usando anticuerpos dirigidos contra las mismas. Este estudio se centró en alguna de las modificaciones que afectan a la Histona 3 debido a su estrecha relación con el desarrollo. En concreto, las variantes H3.1 y H3.3 son esenciales en varios puntos del desarrollo embrionario y la supervivencia. En ratón, el bloqueo de *H3f3a*, uno de los dos genes codificantes para la variante H3.3, supone la mortalidad del 50% de los neonatos mientras que el resto presenta retrasos en el crecimiento (Couldrey y cols., 1999). Este gen también es esencial para el mantenimiento de la integridad genómica (Jang y cols., 2015). Además, el silenciamiento con morfolinós del gen que codifica la H3.1 y del gen de la H3.3 causa defectos durante la gastrulación en *Xenopus laevis* (Szenker y cols., 2012). En pez cebra la mutación de la H3.3 conlleva la aparición de malformaciones en la cresta neural (Cox y cols., 2012).

Por otra parte, las modificaciones asociadas a las histonas pueden determinar la expresión o inhibición de un gen según la región en la que se encuentren y los aminoácidos modificados. En este sentido, la acetilación de la lisina 27 de la Histona 3, se ha estudiado dada su propiedad de activación y regulación de otras histonas y genes (Creyghton y cols., 2010). Sin embargo, la trimetilación de la lisina 27 de la Histona 3, conlleva al silenciamiento génico en las regiones en las que aparece, ejerciendo un efecto contrario al de la trimetilación de la lisina 4, como ocurre en fibroblastos humanos (Hawkins y cols., 2010) o células madre humanas (Pan y cols., 2007).

En el análisis de los resultados obtenidos por *ChIP-seq*, el estudio de las modificaciones en el grupo control, ha aportado nuevos datos sobre la regulación pre-transcripcional de numerosos genes (29650 para la H3K27ac y 1703 para la H3K27me3), revelando varios genes importantes para este estudio (Ver resumen en fig. 34). Entre ellos, se encontró que la modificación H3K27ac afecta a algunos miembros de la familia de factores de transcripción POU, a REST, CREB y Ap-4, que están relacionados con el correcto

desarrollo del sistema nervioso central, en varios organismos incluido el pez cebra (Pennypacker y cols., 1995; Josephson y cols., 1998; Shonemann y cols., 1998; Lonze y Ginty, 2002; Tantin, 2013; Thiel y cols., 2014) También se ha encontrado genes que codifican para algunas proteínas de unión a las citosinas metiladas, para *mir212* y argonauta y para genes codificantes para histonas, vinculados a la modificación H3K27ac. Estos hallazgos aportan un mayor entendimiento de los intrincados mecanismos reguladores de la expresión que llevan a cabo estos factores epigenéticos. Por ejemplo, con este trabajo se ha determinado que la morfina cambia la expresión del *mir212* tras su unión a Oprm1 y de BDNF a través de MeCP2. Sin embargo, en nuestros resultados de *ChIP-seq*, ninguno de estos genes presenta un enriquecimiento de la modificación H3K27ac tras la exposición a morfina, aunque sí presentan esta modificación en el grupo control. Esto indica que la acetilación de la lisina 27 de la histona 3 participa exclusivamente en la regulación de los genes *mir212* y *mecp2* de manera fisiológica pero no es responsable de los cambios observados en este estudio tras la exposición a morfina, dado que esta modificación no parece haberse visto afectada tras el tratamiento con dicho fármaco.

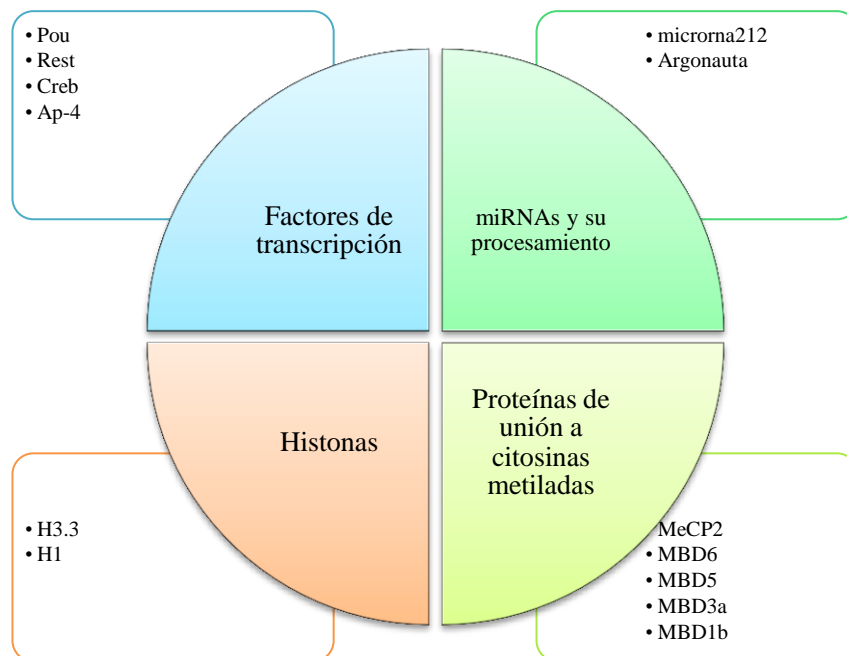


Figura 34. Resumen de los principales genes marcados por la modificación epigenética H3K27ac en condiciones control. Los genes seleccionados entre los resultados observados tras el análisis de la técnica ChIP-seq, están estrechamente relacionados con el desarrollo del SNC.

Al comparar las marcas H3K27ac y H3K27me3 entre los embriones control y los tratados con morfina, aparecen numerosos genes ligados al desarrollo que no muestran estas modificaciones en situación control. Entre ellos, el gen *mych*, que en este estudio aparece asociado a un aumento de la marca H3K27ac, tiene efectos anti-apoptóticos en el desarrollo temprano del pez cebra tras ser activado por Oct4 (Kotkamp y cols., 2014). El factor de transcripción Oct4 interviene en el desarrollo de los precursores neuronales formando complejos de transcripción junto a Sox2. Por tanto, la sobreexpresión de *sox2* observada en nuestro estudio desde estadios tempranos (Fig. 23) junto a la mayor disponibilidad del gen *mych* para ser transcrito debido al aumento de la marca epigenética H3K27ac, indican que puede existir un mecanismo conjunto por el cual *mych* favorece la supervivencia celular en el desarrollo temprano tras la exposición a morfina.

El gen *eswrla* está implicado en el mantenimiento de la integridad mitótica y la supervivencia de las células proneuronales en el pez cebra (Azuma y cols., 2007). Esto ocurre en el eje mesencéfalo-prosencéfalo a partir de las 24 hpf, periodo estudiado en nuestros experimentos. La relación entre la exposición a morfina y un posible aumento en la expresión de este gen debido a la menor condensación de la cromatina al contar con la marca H3K27ac, puede ser, en parte, el desencadenante de los efectos observados en las células positivas para Nestin cuya expresión era mayor y su diferenciación más tardía tras la exposición a morfina (Fig. 32).

Por otra parte, el silenciamiento de *fmr1* está ligado al desarrollo de retraso mental y desórdenes del espectro autista (Kim y cols., 2014; Park y cols., 2015). Según los resultados aquí observados, la morfina puede favorecer la represión de su transcripción debido a la regulación del gen por la trimetilación de la lisina 27 de la histona 3. Además, el gen *chl1b* promueve el crecimiento de las neuritas cerebelares e hipocámpales (Ko y cols., 2006). Debido al papel de estos genes en el desarrollo del SNC, su posible represión mediada por la H3K27me3 tras la exposición a morfina, puede aportar nuevos mecanismos que expliquen los efectos desencadenados por este fármaco en la lenta diferenciación de los precursores neuronales observada en nuestro estudio. El conjunto de estos cambios puede traducirse en un retraso en el desarrollo normal del SNC. Estudios previos han descrito los efectos producidos en el feto como consecuencia de la exposición a opioides durante la gestación. Entre ellos figuran

efectos equiparables a los obtenidos en este trabajo como el desarrollo embrionario tardío o el retraso en el crecimiento del cerebro (Nasiraei-Moghadam y cols., 2009).

Tras el exhaustivo estudio de los genes enriquecidos con las marcas H3K27ac y H3K27me3, se estudiaron las regiones adyacentes a los picos atribuidos a dichos enriquecimientos, guardando un margen de 20Kb a izquierda y derecha de los mismos. La finalidad de este estudio era detectar posibles regiones promotoras de genes afectadas por las mismas marcas. De esta manera, se encontró un enriquecimiento para la marca H3K27ac sobre el promotor distal del gen *nestin*. Este gen está ligado con los precursores neuronales (Park y cols., 2010). Su enriquecimiento con esta marca epigenética tras el tratamiento pero no en situación control, parece indicar que la morfina ejerce cambios en el SNC antes de que se formen las neuronas maduras. Esta relación entre la morfina y los precursores neuronales ya ha sido sugerida por Dholakiya y cols. (2016) en su trabajo sobre la diferenciación neuronal tras la exposición a morfina en células embrionarias de ratón. El hecho de conocer una de las vías a través de la cual la morfina determina los cambios en dichos precursores, permitiría establecer mecanismos de regulación más concretos.

Además, el análisis funcional de los resultados del estudio de *ChIP-seq* se estableció según criterios generales comparando los datos obtenidos en todos los grupos experimentales incluidos y, también, siguiendo criterios ontológicos determinados por la base de datos *Gene Ontology*, gracias a la cual se puede determinar la función asociada a los genes obtenidos en estudios de ChIP-seq. En el primer caso, la comparación de todos los grupos entre sí permitió concluir que los resultados observados entre las dos modificaciones estudiadas no sólo eran distintos entre sí, sino que además se oponían en funcionalidad. Es decir, los genes asociados a ambas modificaciones tienen, en su mayoría, roles opuestos. Este hecho no es sorprendente debido a que las modificaciones de histonas estudiadas en este trabajo ejercen efectos contrarios. Por una parte, ya se ha comentado que la acetilación de lisina 27 es activadora de la expresión génica, mientras que la metilación en esta misma lisina supone la represión de los genes afectados por dicha modificación. Por tanto, los resultados inversos en el aspecto funcional se deben a los efectos represores y activadores de las marcas epigenéticas estudiadas.

El aumento generalizado en el número de genes enriquecidos observados con la marca H3K27ac frente a los esperados en condiciones fisiológicas, indica que la exposición a

morfina aumenta la posibilidad de que un mayor número de genes presenten esta modificación. Este hecho no parece extraño dado la propiedad de la morfina de alterar la expresión génica (Walters y cols., 2003). Sin embargo, la disminución de los genes observados frente a los esperados en relación con el transporte de membrana, el transporte iónico, la proteólisis, la señalización acoplada a proteína G y la transducción de señales, puede indicar que a las 24 hpf la exposición a morfina altera la maquinaria celular clave para la correcta señalización cuando se compara con lo esperado en condiciones fisiológicas, consiguiéndolo a través de la disminución en la acetilación de la histona 3.

No obstante, también se ha demostrado el aumento de genes observados frente a los estadísticamente esperados asociados a la marca H3K27me3. Tras el tratamiento con morfina, el hecho de encontrar un aumento de genes que presentan ambas marcas, con roles tan opuestos como la supresión o activación de la expresión génica, evidencia la refinada regulación desencadenada por este fármaco (Ammon-Treiber y Holt, 2005; McClung y cols, 2005). Es decir, la morfina aumenta de forma generalizada el número de genes enriquecidos con las marcas estudiadas frente a lo que se espera en condiciones fisiológicas. Sin embargo, aunque existe un aumento del número de genes que presentan las modificaciones H3K27ac y H3K27me3, estos genes tienen una funcionalidad opuesta como se describió en la figura 21. Este fenómeno de enriquecimiento con distintas marcas epigenéticas puede estar ocurriendo en diferentes tipos celulares al mismo tiempo, de tal manera que se regule selectivamente la mayor o menor disponibilidad para la transcripción de genes involucrados en los mecanismos efectores de este fármaco.

3. Estudio de los efectos de la morfina en los mecanismos de regulación epigenética: cambios en la metilación del DNA. Efectos sobre la expresión de la proteína Nestin.

Los efectos de la metilación del DNA son aún hoy en día controvertidos en relación a su efecto silenciador o activador de la expresión génica. De forma general, se considera que la metilación del promotor de un gen reduce la expresión del mismo, mientras que la metilación de regiones internas puede considerarse como un efector negativo o positivo en la regulación del gen afectado (Baubec y Schubeler, 2014; Kato y Iwamoto, 2014). De esta manera, la reducción del porcentaje de metilación del DNA del promotor distal de *nestin* observada en este estudio, puede indicar que existe un aumento en la expresión del gen. Este efecto modulador sobre la metilación del DNA, no es exclusivo de la morfina, sino que también aparece en otras drogas de abuso como la cocaína y el cannabis (Anier y cols., 2010; Baker-Andresen y cols., 2015; Szutorisz y Hurd, 2015).

En este trabajo, se ha observado una regulación positiva de la expresión de *nestin* en la que intervienen dos mecanismos epigenéticos, la regulación de la metilación del DNA y el enriquecimiento de la cromatina con la marca H3K27ac, simultáneamente sobre el promotor de un gen, tras la exposición a morfina (Fig. 35 A y B). Estos resultados indican que el tratamiento con morfina activa mecanismos que promueven y facilitan la expresión de la proteína Nestin. Este tipo de regulación epigenética se ha observado en el trabajo de Zhang y cols., (2005) en el que se determinó el efecto modulador sobre el receptor de la hormona luteinizante ejercido por la combinación de la acetilación de histonas y la disminución de la metilación del DNA, concluyendo que ambos mecanismos pueden estar presentes para favorecer la expresión de un gen.

El factor de transcripción Sox2 es un conocido regulador de la expresión de Nestin favoreciendo su transcripción al unirse con complejos formados por otros factores de transcripción como POU (Tanaka y cols., 2004; Jin y cols., 2009). En este trabajo se ha analizado el efecto de la exposición a morfina sobre *sox2* durante varios estadios del desarrollo de pez cebra. La morfina aumenta la expresión de *sox2* de manera gradual, pudiendo observarse el mayor incremento a las 24 hpf (Fig. 35C) corroborando lo descrito por Niu y cols, (2015). Sin embargo, el hecho de que la expresión de este factor de transcripción aumente de manera drástica a las 24 hpf, apunta a un papel relevante de este estadio en los efectos de la exposición a morfina sobre el correcto desarrollo de los

precursores neuronales. En el caso de *sox2*, los efectos del tratamiento con morfina no están mediados directamente por los miRNAs 212/132 pero estos parecen ejercer algún tipo de regulación indirecta sobre su expresión dada la disminución causada en los niveles de *sox2* tras el silenciamiento de los mismos. Además, estos efectos de la exposición a morfina sobre *sox2*, junto a los observados en otros genes ligados al desarrollo del SNC, como *mych*, pueden ser parcialmente responsables de los cambios en los transgénicos Nestin-GFP.

En la figura 35 se representa el efecto de la morfina sobre la expresión de *nestin* partiendo de la mayor acetilación de su promotor distal (Fig. 35A), el incremento de la expresión de *sox2* (Fig. 35C) y el descenso de la metilación del DNA de esta región (Fig. 35B), provocados por el tratamiento con morfina. En conjunto, estas modificaciones favorecen el aumento de la expresión de Nestin (Fig. 35D). Esta mayor expresión pudo observarse *in vivo* durante el desarrollo de embriones transgénicos (Nestin-GFP) y en cultivos primarios de neuronas obtenidos de dichos embriones. La proteína Nestin, además de ser marcador de precursores neuronales, es esencial para la correcta supervivencia y auto-renovación de los mismos (Park y cols., 2010). Por tanto, la mayor expresión de la proteína observada tras la exposición a morfina no se relaciona sólo con un incremento de Nestin, sino también con el efecto de la morfina sobre los precursores neuronales. Al mantenerse la proteína Nestin de forma más prolongada en el tiempo y con una mayor expresión, se puede considerar que la exposición a morfina induce un retraso en la diferenciación de los precursores neuronales hacia otros tipos celulares y, por tanto, ralentiza la maduración del SNC. Efectos similares a los observados en este estudio producidos por la morfina sobre los precursores neuronales han sido descritos en cultivos celulares de ratón (Willner y cols., 2014; Dholakiya y cols., 2016). El presente estudio aporta el posible mecanismo regulador de estos efectos según el cual la exposición a morfina es capaz de inducir cambios en la conformación del DNA que codifica la proteína Nestin, favoreciendo la menor condensación de la cromatina de su promotor distal, reduciendo la metilación del DNA de esta misma región y aumentando la expresión de su factor de transcripción Sox2 (Fig. 35).

En resumen, el mecanismo regulador de los efectos de la exposición a morfina, induce cambios en el SNC a través de la modificación de los miRNAs 212 y 132 y su efecto sobre las neurotrofinas. Además, la morfina es capaz de variar la estructura del DNA regulando la acetilación y la trimetilación de la Histona 3 en la lisina 27. Por último,

este fármaco altera el correcto desarrollo de los precursores neuronales a través de los cambios en el factor de transcripción Sox2 y el promotor distal de Nestin.

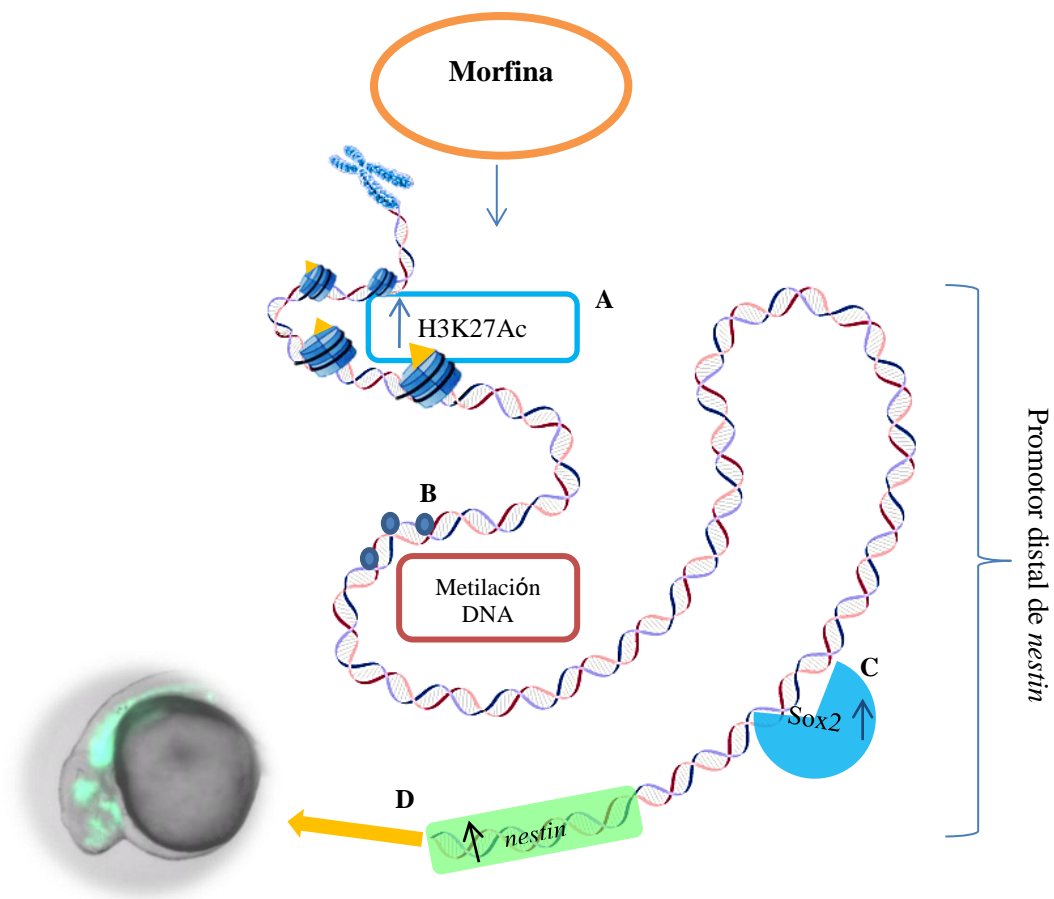


Figura 35. Modelo de la regulación de la transcripción de *nestin* tras la exposición a morfina. Los cambios en la expresión de *nestin* son favorecidos por una mayor acetilación de la Histona 3 en la lisina 27 (A), la menor metilación del DNA (B) y el aumento de la expresión del factor de transcripción Sox2 (C). En conjunto estos cambios favorecen el aumento de la expresión de Nestin observado en embriones *in vivo* (D).

Conclusiones

El uso extendido de la morfina, bien como fármaco para el tratamiento de la sensación dolorosa o como droga de abuso, ha mantenido vigente la investigación realizada en torno a sus mecanismos de acción. En este trabajo nos hemos centrado en algunos de los aspectos moleculares que explican las alteraciones observadas tras la exposición a morfina. La importancia de esta investigación yace en la posibilidad de encontrar mecanismos concretos que sean susceptibles de ser modificados y controlados con el fin de contrarrestar los efectos inducidos por la morfina. A partir de los resultados descritos en el presente trabajo se derivan las siguientes conclusiones:

1. La morfina, a través de la activación del receptor opioide μ , induce cambios en el SNC entre los que se encuentra la distinta localización de las células proliferativas en el área periventricular del pez cebra. Esta alteración en la formación temprana del SNC puede tener consecuencias fisiológicas posteriores que expliquen los efectos que se han observado en otras especies tras la exposición prenatal a morfina.
2. La alteración de la correcta localización de las células en proliferación, inducida por la morfina, está parcialmente mediada por la regulación que ejercen los *mir212* y *mir132* sobre Bdnf y Trkb. Este hecho convierte a los miRNAs 212 y 132 en dianas susceptibles de ser moduladas para evitar las alteraciones descritas.
3. En el presente trabajo, se demuestra que el *mir212*, el *mir132* y *Oprm1* son novedosos reguladores que relacionan los opioides y las neurotrofinas. Además, la morfina actúa como facilitador de la expresión de Bdnf en este estadio del desarrollo del pez cebra (48 hpf).
4. La exposición a morfina modifica la condensación de la cromatina, favoreciendo la represión o la activación génica. Estos cambios opuestos en la regulación de la expresión de genes explican la gran variedad de efectos observados tras la exposición a morfina según el área cerebral estudiada.
5. A las 24 hpf, muchos de los cambios producidos en la condensación de la cromatina, afectan a genes relacionados con el desarrollo del SNC del pez cebra como *mych*, *ewsrla*, *fmr1* y *chl1b*. Estos genes pueden ser novedosas dianas relacionadas con los efectos de la morfina en el desarrollo temprano.

6. La expresión de la proteína Nestin en un transgénico Nestin-GFP incrementa debido a los cambios en la condensación y metilación de su promotor distal y al aumento del factor de transcripción Sox2. Por tanto, la morfina induce la activación de varios mecanismos que conjuntamente promueven el aumento de Nestin en los precursores neuronales. El aumento en la expresión de Nestin, se traduce en una mayor supervivencia de los precursores neuronales y, por tanto, en un retraso en el correcto desarrollo del SNC.

Los resultados obtenidos en este trabajo llevan al planteamiento de un posible esquema de actuación de la morfina en el desarrollo del SNC a través de los factores epigenéticos. Así, a las 24 hpf, la exposición a este fármaco induce efectos en el SNC retrasando la maduración de los precursores neuronales a neuronas y células gliales. Estos cambios están regulados por la modificación de histonas H3K27ac y H3K27me3 y por la alteración en la metilación del DNA. Posteriormente, a las 48 hpf, los efectos producidos por la exposición a morfina se traducen en un fallo del posicionamiento de las células en proliferación en torno al área periventricular, controlado por la distinta expresión de los miRNAs 212 y 132. Este modelo de actuación nos permite establecer puntos de regulación clave para una posible modulación de los efectos de la morfina en el SNC.

Bibliografía

1. Aday AW, Zhu LJ, Lakshmanan A, Wang J, Lawson ND. Identification of cis regulatory features in the embryonic zebrafish genome through large-scale profiling of H3K4me1 and H3K4me3 binding sites. *Dev Biol*. 2011 Sep;357(2):450–62.
2. Ahmadalipour A, Sadeghzadeh J, Vafaei AA, Bandegi AR, Mohammadkhani R, Rashidy-Pour A. Effects of environmental enrichment on behavioral deficits and alterations in hippocampal BDNF induced by prenatal exposure to morphine in juvenile rats. *Neuroscience*. 2015 Oct;305:372–83.
3. Akil H, Meng F, Devine DP, Watson SJ. Molecular and Neuroanatomical Properties of the Endogenous Opioid System: Implications for Treatment of Opiate Addiction. *Semin Neurosci*. 1997;9(3–4):70–83.
4. Alvarez FA, Rodriguez-Martin I, Gonzalez-Nunez V, Marron Fernandez de Velasco E, Gonzalez Sarmiento R, Rodriguez RE. New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci Lett*. 2006 Sep;405(1-2):94–9.
5. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004 Sep;431(7006):350–5.
6. Ammon-Treiber S, Hollt V. Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict Biol*. 2005 Mar;10(1):81–9.
7. Ananthan S. Opioid ligands with mixed mu/delta opioid receptor interactions: an emerging approach to novel analgesics. *AAPS J*. 2006;8(1):E118–25.
8. Andrews C. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data [Internet]. 2010. Available from: at <http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>
9. Anier K, Malinovskaja K, Aonurm-Helm A, Zharkovsky A, Kalda A. DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2010 Nov;35(12):2450–61.
10. Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*. 2004 Mar;41(6):881–90.
11. Arevalo JC, Wu SH. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci*. 2006 Jul;63(13):1523–37.
12. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*. 2000 May;25(1):25–9.
13. Axtell MJ, Bartel DP. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell*. 2005 Jun;17(6):1658–73.
14. Azuma M, Embree LJ, Sabaawy H, Hickstein DD. Ewing sarcoma protein *ewsr1* maintains mitotic integrity and proneural cell survival in the zebrafish embryo. *PLoS One*. 2007;2(10):e979.
15. Baker-Andresen D, Zhao Q, Li X, Jupp B, Chesworth R, Lawrence AJ, et al. Persistent variations in neuronal DNA methylation following cocaine self-administration and protracted abstinence in mice. *Neuroepigenetics*. 2015 Oct;4:1–11.
16. Balcells I, Cirera S, Busk PK. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol*. 2011;11:70.
17. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011 Mar;21(3):381–95.

18. Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Porteros A, Garcia-Isidoro M, Rodriguez RE. Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun*. 1998a Apr;245(2):544–8.
19. Barrallo A, Malvar FG, Gonzalez R, Rodriguez RE, Traynor JR. Cloning and characterization of a delta opioid receptor from zebrafish. *Biochem Soc Trans*. 1998b Nov;26(4):S360.
20. Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Alvar F, Rodriguez RE. ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res*. 2000 Dec;84(1-2):1–6.
21. Barreto-Valer K, Lopez-Bellido R, Macho Sanchez-Simon F, Rodriguez RE. Modulation by cocaine of dopamine receptors through miRNA-133b in zebrafish embryos. *PLoS One*. 2012;7(12):e52701.
22. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan;116(2):281–97.
23. Baubec T, Schubeler D. Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Curr Opin Genet Dev*. 2014 Apr;25:85–92.
24. Bauer SR, Hitchner L, Harrison H, Gerstenberger J, Steiger S. Predictors of higher-risk chronic opioid prescriptions in an academic primary care setting. *Subst Abuse*. 2016;37(1):110–7.
25. Bazzini AA, Lee MT, Giraldez AJ. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*. 2012 Apr;336(6078):233–7.
26. Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol Cell*. 2009 Jan;33(1):1–13.
27. Berillo O, Regnier M, Ivashchenko A. Binding of intronic miRNAs to the mRNAs of host genes encoding intronic miRNAs and proteins that participate in tumorigenesis. *Comput Biol Med*. 2013 Oct;43(10):1374–81.
28. Berrios I, Castro C, Kuffler DP. Morphine: axon regeneration, neuroprotection, neurotoxicity, tolerance, and neuropathic pain. *P R Health Sci J*. 2008 Jun;27(2):119–28.
29. Bimonte S, Barbieri A, Rea D, Palma G, Luciano A, Cuomo A, et al. Morphine Promotes Tumor Angiogenesis and Increases Breast Cancer Progression. *Biomed Res Int*. 2015;2015:161508.
30. Blazquez C, Chiarlone A, Bellocchio L, Resel E, Pruunsild P, Garcia-Rincon D, et al. The CB(1) cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. *Cell Death Differ*. 2015 Oct;22(10):1618–29.
31. Bogdanovic O, Fernandez-Minan A, Tena JJ, de la Calle-Mustienes E, Gomez-Skarmeta JL. The developmental epigenomics toolbox: ChIP-seq and MethylCap-seq profiling of early zebrafish embryos. *Methods*. 2013 Aug;62(3):207–15.
32. Bonci A, Williams JT. Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. *J Neurosci*. 1997 Jan;17(2):796–803.
33. Bozarth MA. Neuroanatomical boundaries of the reward-relevant opiate-receptor field in the ventral tegmental area as mapped by the conditioned place preference method in rats.

- Brain Res. 1987 Jun;414(1):77–84.
34. Chao M V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Apr;4(4):299–309.
 35. Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nat Rev Genet*. 2007 Feb;8(2):93–103.
 36. Chen L, Wang C, Qin ZS, Wu H. A novel statistical method for quantitative comparison of multiple ChIP-seq datasets. *Bioinformatics*. 2015 Jun;31(12):1889–96.
 37. Chen Z, Lee H, Henle SJ, Cheever TR, Ekker SC, Henley JR. Primary neuron culture for nerve growth and axon guidance studies in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*. 2013;8(3):e57539.
 38. Christov CP, Gardiner TJ, Szuts D, Krude T. Functional requirement of noncoding Y RNAs for human chromosomal DNA replication. *Mol Cell Biol*. 2006 Sep;26(18):6993–7004.
 39. Conaco C, Otto S, Han J-J, Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb;103(7):2422–7.
 40. Cooper G. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
 41. Couldrey C, Carlton MB, Nolan PM, Colledge WH, Evans MJ. A retroviral gene trap insertion into the histone 3.3A gene causes partial neonatal lethality, stunted growth, neuromuscular deficits and male sub-fertility in transgenic mice. *Hum Mol Genet*. 1999 Dec;8(13):2489–95.
 42. Cox SG, Kim H, Garnett AT, Medeiros DM, An W, Crump JG. An essential role of variant histone H3.3 for ectomesenchyme potential of the cranial neural crest. *PLoS Genet*. 2012 Sep;8(9):e1002938.
 43. Creighton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Dec;107(50):21931–6.
 44. Darst RP, Pardo CE, Ai L, Brown KD, Kladde MP. Bisulfite sequencing of DNA. *Curr Protoc Mol Biol*. 2010 Jul;Chapter 7:Unit 7.9.1–17.
 45. De Felice E, Porreca I, Alleva E, De Girolamo P, Ambrosino C, Ciriaco E, et al. Localization of BDNF expression in the developing brain of zebrafish. *J Anat*. 2014 May;224(5):564–74.
 46. De Ruiter J. *Principles of drug addiction 2*. 2000.
 47. Delfs JM, Kong H, Mestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T, et al. Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level. *J Comp Neurol*. 1994 Jul;345(1):46–68.
 48. Devine DP, Wise RA. Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats. *J Neurosci*. 1994 Apr;14(4):1978–84.
 49. Dholakiya SL, Aliberti A, Barile FA. Morphine sulfate concomitantly decreases neuronal differentiation and opioid receptor expression in mouse embryonic stem cells. *Toxicol Lett*. 2016 Apr;247:45–55.

50. Eberharther A, Becker PB. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep*. 2002 Mar;3(3):224–9.
51. Eisinger DA, Schulz R. Mechanism and consequences of delta-opioid receptor internalization. *Crit Rev Neurobiol*. 2005;17(1):1–26.
52. Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA*. 2009 Jan;15(1):21–32.
53. Evans CJ, Keith DEJ, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*. 1992 Dec;258(5090):1952–5.
54. Fang Z, Rajewsky N. The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs. *PLoS One*. 2011;6(3):e18067.
55. Filipescu D, Szenker E, Almouzni G. Developmental roles of histone H3 variants and their chaperones. *Trends Genet*. 2013 Nov;29(11):630–40.
56. Fkih M'hamed I, Privat M, Ponelle F, Penault-Llorca F, Kenani A, Bignon Y-J. Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. *Cell Oncol (Dordr)*. 2015 Dec;38(6):433–42.
57. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009 Jan;19(1):92–105.
58. Fukuda T, Itoh M, Ichikawa T, Washiyama K, Goto Y. Delayed maturation of neuronal architecture and synaptogenesis in cerebral cortex of *Mecp2*-deficient mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Jun;64(6):537–44.
59. Garcia Robles R, Ayala Ramirez P, Perdomo Velásquez SP. Epigenética: definición, bases moleculares e implicaciones en la salud y en la evolución humana. *Rev Ciencias la Salud*. 2012;
60. Garcia-Concejo A, Jimenez-Gonzalez A, Rodriguez RE. μ Opioid Receptor Expression after Morphine Administration Is Regulated by miR-212/132 Cluster. *PLoS One*. 2016;11(7):e0157806.
61. Ginty DD, Segal RA. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol*. 2002 Jun;12(3):268–74.
62. Golalipour MJ, Ghafari S, Kafshgiri SK, Moghadam MHL, Moharri AR. Effect of maternal morphine sulfate exposure on neuronal plasticity of dentate gyrus in Balb/c mice offspring. *Pakistan J Biol Sci PJBS*. 2013 Mar;16(6):281–6.
63. Gonzalez-Nunez V, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE. Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: evidence of the existence of two different nociceptin sequences in the same precursor. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Oct;1629(1-3):114–8.
64. Gonzalez-Nunez V, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE. Identification of two proopioidmelanocortin genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res*. 2003 Dec;120(1):1–8.
65. Gonzalez-Nunez V, Marron Fernandez de Velasco E, Arsequell G, Valencia G, Rodriguez RE. Identification of dynorphin a from zebrafish: a comparative study with mammalian dynorphin A. *Neuroscience*. 2007 Jan;144(2):675–84.

66. Gonzalez-Nunez V, Toth G, Rodriguez RE. Endogenous heptapeptide Met-enkephalin-Gly-Tyr binds differentially to duplicate delta opioid receptors from zebrafish. *Peptides*. 2007 Dec;28(12):2340–7.
67. Gonzalez-Nunez V, Noriega-Prieto JA, Rodriguez RE. Morphine modulates cell proliferation through mir133b & mir128 in the neuroblastoma SH-SY5Y cell line. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Apr;1842(4):566–72.
68. Gulland J, Robinson RC. Constitution of codeine and thebaine. *Mem Proc Manchester Lit Phil Soc*. 69:79–86.
69. Hallbook F. Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol*. 1999 Oct;9(5):616–21.
70. Hanlon KE, Herman DS, Agnes RS, Largent-Milnes TM, Kumarasinghe IR, Ma SW, et al. Novel peptide ligands with dual acting pharmacophores designed for the pathophysiology of neuropathic pain. *Brain Res*. 2011 Jun;1395:1–11.
71. Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS. Endogenous opioids regulate dendritic growth and spine formation in developing rat brain. *Brain Res*. 1987 Jul;416(1):157–61.
72. Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS. Endogenous opioid systems and the regulation of dendritic growth and spine formation. *J Comp Neurol*. 1989 Mar;281(1):13–22.
73. Hawkins RD, Hon GC, Lee LK, Ngo Q, Lister R, Pelizzola M, et al. Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells. *Cell Stem Cell*. 2010 May;6(5):479–91.
74. Heinrich G, Lum T. Fish neurotrophins and Trk receptors. *Int J Dev Neurosci*. 2000 Feb;18(1):1–27.
75. Hirose N, Murakawa K, Takada K, Oi Y, Suzuki T, Nagase H, et al. Interactions among mu- and delta-opioid receptors, especially putative delta1- and delta2-opioid receptors, promote dopamine release in the nucleus accumbens. *Neuroscience*. 2005;135(1):213–25.
76. Hollander JA, Im H-I, Amelio AL, Kocerha J, Bali P, Lu Q, et al. Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling. *Nature*. 2010 Jul;466(7303):197–202.
77. Holtt V, Dum J, Blasig J, Schubert P, Herz A. Comparison of in vivo and in vitro parameters of opiate receptor binding in naive and tolerant dependent rodents. *Life Sci*. 1975 Jun;16(12):1823–8.
78. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(1):1–13.
79. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37(1):1–13.
80. Huntley RP, Harris MA, Alam-Faruque Y, Blake JA, Carbon S, Dietze H, et al. A method for increasing expressivity of Gene Ontology annotations using a compositional approach. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:155.
81. Huttenhofer A, Schattner P, Polacek N. Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends Genet*. 2005 May;21(5):289–97.

82. Ip NY, Stitt TN, Tapley P, Klein R, Glass DJ, Fandl J, et al. Similarities and differences in the way neurotrophins interact with the Trk receptors in neuronal and nonneuronal cells. *Neuron*. 1993 Feb;10(2):137–49.
83. Jacquet YF, Klee WA, Rice KC, Iijima I, Minamikawa J. Stereospecific and nonstereospecific effects of (+)- and (-)-morphine: evidence for a new class of receptors? *Science*. 1977 Nov;198(4319):842–5.
84. Jang C-W, Shibata Y, Starmer J, Yee D, Magnuson T. Histone H3.3 maintains genome integrity during mammalian development. Vol. 29, *Genes & Development*. 2015. p. 1377–92.
85. Ji Y, Lu Y, Yang F, Shen W, Tang TT-T, Feng L, et al. Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons. *Nat Neurosci*. 2010 Mar;13(3):302–9.
86. Jimenez-Gonzalez A, Garcia-Concejo A, Lopez-Benito S, Gonzalez-Nunez V, Arevalo JC, Rodriguez RE. Role of morphine, miR-212/132 and mu opioid receptor in the regulation of *Bdnf* in zebrafish embryos. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jun;1860(6):1308–16.
87. Jin Z, Liu L, Bian W, Chen Y, Xu G, Cheng L, et al. Different transcription factors regulate nestin gene expression during P19 cell neural differentiation and central nervous system development. *J Biol Chem*. 2009 Mar;284(12):8160–73.
88. Johnson SW, North RA. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J Neurosci*. 1992 Feb;12(2):483–8.
89. Josephson R, Muller T, Pickel J, Okabe S, Reynolds K, Turner PA, et al. POU transcription factors control expression of CNS stem cell-specific genes. *Development*. 1998 Aug;125(16):3087–100.
90. Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao M V, Parada LF. The *trk* proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science*. 1991 Apr;252(5005):554–8.
91. Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, et al. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science*. 2007 Jun;316(5830):1484–8.
92. Kato T, Iwamoto K. Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. *Neuropharmacology*. 2014 May;80:133–9.
93. Kavalali ET, Nelson ED, Monteggia LM. Role of MeCP2, DNA methylation, and HDACs in regulating synapse function. *J Neurodev Disord*. 2011 Sep;3(3):250–6.
94. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec;89(24):12048–52.
95. Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol*. 2002 Apr;66(5):285–306.
96. Kim E, Clark AL, Kiss A, Hahn JW, Wesselschmidt R, Coscia CJ, et al. Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors. *J Biol Chem*. 2006 Nov;281(44):33749–60.

97. Kim L, He L, Maaswinkel H, Zhu L, Sirotkin H, Weng W. Anxiety, hyperactivity and stereotypy in a zebrafish model of fragile X syndrome and autism spectrum disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2014 Dec;55:40–9.
98. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995 Jul;203(3):253–310.
99. Kishore S, Stamm S. The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science*. 2006 Jan;311(5758):230–2.
100. Klabunde T, Eicken C, Sacchettini JC, Krebs B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nat Struct Biol*. 1998 Dec;5(12):1084–90.
101. Klein ME, Liyo DT, Ma L, Impey S, Mandel G, Goodman RH. Homeostatic regulation of MeCP2 expression by a CREB-induced microRNA. *Nat Neurosci*. 2007 Dec;10(12):1513–4.
102. Klein R, Jing SQ, Nanduri V, O'Rourke E, Barbacid M. The *trk* proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell*. 1991a Apr;65(1):189–97.
103. Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, et al. The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell*. 1991b Jul;66(2):395–403.
104. Ko J, Kim S, Chung HS, Kim K, Han K, Kim H, et al. SALM synaptic cell adhesion-like molecules regulate the differentiation of excitatory synapses. *Neuron*. 2006 Apr;50(2):233–45.
105. Kornblum HI. Introduction to Neural Stem Cells. *Stroke*. 2007 Feb 1;38(2):810–6.
106. Korostynski M, Piechota M, Kaminska D, Solecki W, Przewlocki R. Morphine effects on striatal transcriptome in mice. *Genome Biol*. 2007;8(6):R128.
107. Kotkamp K, Kur E, Wendik B, Polok BK, Ben-Dor S, Onichtchouk D, et al. Pou5f1/Oct4 promotes cell survival via direct activation of myc expression during zebrafish gastrulation. *PLoS One*. 2014;9(3):e92356.
108. Kremer ME, Arora KS. Clinical, Ethical, and Legal Considerations in Pregnant Women With Opioid Abuse. *Obstet Gynecol*. 2015 Sep;126(3):474–8.
109. Kumarwamy R, Volkmann I, Beermann J, Napp LC, Jabs O, Bhayadia R, et al. Vascular importance of the miR-212/132 cluster. *Eur Heart J*. 2014 Dec;35(45):3224–31.
110. Kung JTY, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*. 2013 Mar;193(3):651–69.
111. LaBuda CJ, Sora I, Uhl GR, Fuchs PN. Stress-induced analgesia in mu-opioid receptor knockout mice reveals normal function of the delta-opioid receptor system. *Brain Res*. 2000 Jun;869(1-2):1–5.
112. Lam CS, Marz M, Strahle U. *gfap* and *nestin* reporter lines reveal characteristics of neural progenitors in the adult zebrafish brain. *Dev Dyn*. 2009 Feb;238(2):475–86.
113. Lamballe F, Klein R, Barbacid M. *trkC*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell*. 1991 Sep;66(5):967–79.
114. Langheinrich U. Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays*. 2003 Sep;25(9):904–12.

115. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012 Apr;9(4):357–9.
116. Law PY, Loh HH. Regulation of opioid receptor activities. Vol. 289, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. UNITED STATES; 1999. p. 607–24.
117. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*. 1990 Feb;60(4):585–95.
118. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec;115(7):787–98.
119. Lindeman LC, Collas P. Chromatin Immunoprecipitation Assay for Early Zebrafish Embryos. *Epygenesis*. 2012.
120. Lindeman LC, Vogt-Kielland LT, Alestrom P, Collas P. Fish'n ChIPs: chromatin immunoprecipitation in the zebrafish embryo. *Methods Mol Biol*. 2009;567:75–86.
121. Liu K, Li X, Cao Y, Ge Y, Wang J, Shi B. MiR-132 inhibits cell proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma by targeting PIK3R3. *Int J Oncol*. 2015 Oct;47(4):1585–93.
122. Liu X, Yan S, Pei C, Cui Y. Decreased microRNA-132 and its function in human non-small cell lung cancer. *Mol Med Rep*. 2015 May;11(5):3601–8.
123. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Mar;90(5):2074–7.
124. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002 Aug;35(4):605–23.
125. Lopez-Bellido R, Barreto-Valer K, Sanchez-Simon FM, Rodriguez RE. Cocaine modulates the expression of opioid receptors and miR-let-7d in zebrafish embryos. *PLoS One*. 2012;7(11):e50885.
126. Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature*. 1977 Jun;267(5611):495–9.
127. Lu Z, Xu J, Xu M, Pasternak GW, Pan Y-X. Morphine regulates expression of mu-opioid receptor MOR-1A, an intron-retention carboxyl terminal splice variant of the mu-opioid receptor (OPRM1) gene via miR-103/miR-107. *Mol Pharmacol*. 2014 Feb;85(2):368–80.
128. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997 Sep;389(6648):251–60.
129. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71:59–66.
130. Lunden JW, Kirby LG. Opiate exposure and withdrawal dynamically regulate mRNA expression in the serotonergic dorsal raphe nucleus. *Neuroscience*. 2013 Dec;254:160–72.
131. Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron*. 1993 Jul;11(1):173–89.
132. Magill ST, Cambronne XA, Luikart BW, Liroy DT, Leighton BH, Westbrook GL, et al.

- microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov;107(47):20382–7.
133. Malatesta P, Hack MA, Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, et al. Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*. 2003 Mar;37(5):751–64.
 134. Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*. 1995 Jan;18(1):22–9.
 135. Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther*. 1976 Jun;197(3):517–32.
 136. McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:295–318.
 137. McClung CA, Nestler EJ, Zachariou V. Regulation of gene expression by chronic morphine and morphine withdrawal in the locus ceruleus and ventral tegmental area. *J Neurosci*. 2005 Jun;25(25):6005–15.
 138. McDonald NQ, Chao M V. Structural determinants of neurotrophin action. *J Biol Chem*. 1995 Aug;270(34):19669–72.
 139. Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, et al. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*. 1994 Mar;341(1):33–8.
 140. Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, et al. Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem*. 2006 Jun;97(5):1494–505.
 141. Nasevicius A, Ekker SC. Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat Genet*. 2000 Oct;26(2):216–20.
 142. Nasiraei-Moghadam S, Sahraei H, Bahadoran H, Sadooghi M, Salimi SH, Kaka GR, et al. Effects of maternal oral morphine consumption on neural tube development in Wistar rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Sep;159(1):12–7.
 143. Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*. 1997 Oct;278(5335):58–63.
 144. Nestler EJ. Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Apr;25(4):210–8.
 145. Nilsson AS, Fainzilber M, Falck P, Ibanez CF. Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. *FEBS Lett*. 1998 Mar;424(3):285–90.
 146. Niu D-G, Peng F, Zhang W, Guan Z, Zhao H-D, Li J-L, et al. Morphine promotes cancer stem cell properties, contributing to chemoresistance in breast cancer. *Oncotarget*. 2015 Feb;6(6):3963–76.
 147. Nüsslein-Volhard C, Dahm R. *Zebrafish: a practical approach*. Oxford University Press; 2002.
 148. Nye HE, Nestler EJ. Induction of chronic Fos-related antigens in rat brain by chronic morphine administration. *Mol Pharmacol*. 1996 Apr;49(4):636–45.

149. Oki M, Aihara H, Ito T. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem.* 2007;41:319–36.
150. Okutsu H, Watanabe S, Takahashi I, Aono Y, Saigusa T, Koshikawa N, et al. Endomorphin-2 and endomorphin-1 promote the extracellular amount of accumbal dopamine via nonopioid and mu-opioid receptors, respectively. *Neuropsychopharmacology.* 2006 Feb;31(2):375–83.
151. Pan G, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, Wei H, et al. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007 Sep;1(3):299–312.
152. Pan Y-X, Xu J, Xu M, Rossi GC, Matulonis JE, Pasternak GW. Involvement of exon 11-associated variants of the mu opioid receptor MOR-1 in heroin, but not morphine, actions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Mar;106(12):4917–22.
153. Park C-Y, Halevy T, Lee DR, Sung JJ, Lee JS, Yanuka O, et al. Reversion of FMR1 Methylation and Silencing by Editing the Triplet Repeats in Fragile X iPSC-Derived Neurons. *Cell Rep.* 2015 Oct;13(2):234–41.
154. Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di C-G, Liu X-M, et al. Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells.* 2010 Dec;28(12):2162–71.
155. Pennypacker KR. AP-1 transcription factor complexes in CNS disorders and development. *J Fla Med Assoc.* 1995 Aug;82(8):551–4.
156. Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science.* 1973 Mar;179(4077):1011–4.
157. Peyriere H, Nogue E, Eiden C, Frauger E, Charra M, Picot M-C. Evidence of slow-release morphine sulphate abuse and diversion: epidemiological approaches in a French administrative area. *Fundam Clin Pharmacol.* 2016 Jun;
158. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May;30(9):e36.
159. Pinal-Seoane N, Martin IR, Gonzalez-Nunez V, Marron Fernandez de Velasco E, Alvarez FA, Sarmiento RG, et al. Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. *J Mol Endocrinol.* 2006 Dec;37(3):391–403.
160. Prenus R V, Luscar E, Zhu Z-P, Badisa RB, Goodman CB. Regulation of mammalian MOR-1 gene expression after chronic treatment with morphine. *Int J Mol Med.* 2012 Dec;30(6):1493–7.
161. Prodromaki E, Korpetinou A, Giannopoulou E, Vlotinou E, Chatziathanasiadou M, Papachristou NI, et al. Expression of the microRNA regulators Droscha, Dicer and Ago2 in non-small cell lung carcinomas. *Cell Oncol (Dordr).* 2015 Aug;38(4):307–17.
162. Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, et al. Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron.* 2000 Oct;28(1):69–80.
163. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Sep;361(1473):1545–64.
164. Reisine T. Opiate receptors. *Neuropharmacology.* 1995 May;34(5):463–72.

165. Remenyi J, Hunter CJ, Cole C, Ando H, Impey S, Monk CE, et al. Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins. *Biochem J*. 2010 Jun;428(2):281–91.
166. Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*. 1992a Nov;12(11):4565–74.
167. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992b Mar;255(5052):1707–10.
168. Rivas-Boyer AA, Herrero-Turrión MJ, González-Núñez V, Sánchez-Simón FM, Barreto-Valer K, Rodríguez RE. Pharmacological characterization of a nociceptin receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol*. 2011 Apr;46(2):111–23.
169. Robinson RC, Radziejewski C, Spraggon G, Greenwald J, Kostura MR, Burtnick LD, et al. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci*. 1999 Dec;8(12):2589–97.
170. Rodríguez RE, Barrallo A, García-Malvar F, McFadyen IJ, González-Sarmiento R, Traynor JR. Characterization of ZFOR1, a putative delta-opioid receptor from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett*. 2000 Jul;288(3):207–10.
171. Rozisky JR, Laste G, de Macedo IC, Santos VS, Krolow R, Noschang C, et al. Neonatal morphine administration leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats. *Neurochem Res*. 2013 Mar;38(3):494–503.
172. Sahlen P, Abdullayev I, Ramskold D, Matskova L, Rilakovic N, Lotstedt B, et al. Genome-wide mapping of promoter-anchored interactions with close to single-enhancer resolution. *Genome Biol*. 2015;16:156.
173. Sánchez-Simón FM, Arenzana FJ, Rodríguez RE. In vivo effects of morphine on neuronal fate and opioid receptor expression in zebrafish embryos. *Eur J Neurosci*. 2010a Aug;32(4):550–9.
174. Sánchez-Simón FM, Zhang XX, Loh HH, Law P-Y, Rodríguez RE. Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b. *Mol Pharmacol*. 2010b Nov;78(5):935–42.
175. Schmeier S, MacPherson CR, Essack M, Kaur M, Schaefer U, Suzuki H, et al. Deciphering the transcriptional circuitry of microRNA genes expressed during human monocytic differentiation. *BMC Genomics*. 2009;10:595.
176. Schonemann MD, Ryan AK, Erkman L, McEvelly RJ, Bermingham J, Rosenfeld MG. POU domain factors in neural development. *Adv Exp Med Biol*. 1998;449:39–53.
177. Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973 Jul;70(7):1947–9.
178. Skaper SD. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*. 2012;846:1–12.
179. Sofroniew M V, Howe CL, Mobley WC. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1217–81.
180. Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, et al. trkB

- encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*. 1991 May;65(5):885–93.
181. Standifer KM, Pasternak GW. G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cell Signal*. 1997;9(3-4):237–48.
182. Stiene-Martin A, Gurwell JA, Hauser KF. Morphine alters astrocyte growth in primary cultures of mouse glial cells: evidence for a direct effect of opiates on neural maturation. *Brain Res Dev Brain Res*. 1991 May;60(1):1–7.
183. Szenker E, Lacoste N, Almouzni G. A developmental requirement for HIRA-dependent H3.3 deposition revealed at gastrulation in *Xenopus*. *Cell Rep*. 2012 Jun;1(6):730–40.
184. Szutorisz H, Hurd YL. Epigenetic Effects of Cannabis Exposure. *Biol Psychiatry*. 2016 Apr;79(7):586–94.
185. Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H. Interplay of SOX and POU factors in regulation of the Nestin gene in neural primordial cells. *Mol Cell Biol*. 2004 Oct;24(20):8834–46.
186. Tantin D. Oct transcription factors in development and stem cells: insights and mechanisms. *Development*. 2013 Jul;140(14):2857–66.
187. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol*. 2004 May;339(2):327–35.
188. Tao PL, Law PY, Loh HH. Decrease in delta and mu opioid receptor binding capacity in rat brain after chronic etorphine treatment. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987 Mar;240(3):809–16.
189. Taucher V, Mangge H, Haybaeck J. Non-coding RNAs in pancreatic cancer: challenges and opportunities for clinical application. *Cell Oncol (Dordr)*. 2016 Apr;
190. Terenius L. Characteristics of the “receptor” for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1973;33(5):377–84.
191. Thiel G, Ekici M, Rossler OG. RE-1 silencing transcription factor (REST): a regulator of neuronal development and neuronal/endocrine function. *Cell Tissue Res*. 2015 Jan;359(1):99–109.
192. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 1995 Oct;270(5236):593–8.
193. Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ. Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron*. 1993 Nov;11(5):903–13.
194. Tipney H, Hunter L. An introduction to effective use of enrichment analysis software. *Hum Genomics*. 2010 Feb;4(3):202–6.
195. Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician*. 2008 Mar;11(2 Suppl):S133–53.
196. Trigo JM, Martin-Garcia E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R. The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend*. 2010 May;108(3):183–94.
197. Tso PH, Wong YH. Molecular basis of opioid dependence: role of signal regulation by G-proteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2003;30(5-6):307–16.

198. Vilar M, Murillo-Carretero M, Mira H, Magnusson K, Besset V, Ibanez CF. Bex1, a novel interactor of the p75 neurotrophin receptor, links neurotrophin signaling to the cell cycle. *EMBO J.* 2006 Mar;25(6):1219–30.
199. Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, et al. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov;102(45):16426–31.
200. Waddington C. An introduction to modern genetics. Macmillan, editor. 1938.
201. Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:953–90.
202. Walters CL, Kuo Y-C, Blendy JA. Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. *J Neurochem.* 2003 Dec;87(5):1237–44.
203. Wanet A, Tacheny A, Arnould T, Renard P. miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Res.* 2012 Jun;40(11):4742–53.
204. Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR. mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Nov;90(21):10230–4.
205. Wang JB, Johnson PS, Imai Y, Persico AM, Ozenberger BA, Eppler CM, et al. cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett.* 1994 Jul;348(1):75–9.
206. Wang X-J, Reyes JL, Chua N-H, Gaasterland T. Prediction and identification of Arabidopsis thaliana microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol.* 2004;5(9):R65.
207. Wayman GA, Davare M, Ando H, Fortin D, Varlamova O, Cheng H-YM, et al. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by down-regulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul;105(26):9093–8.
208. Weber T, Corbett MK, Chow LML, Valentine MB, Baker SJ, Zuo J. Rapid cell-cycle reentry and cell death after acute inactivation of the retinoblastoma gene product in postnatal cochlear hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jan;105(2):781–5.
209. Willner D, Cohen-Yeshurun A, Avidan A, Ozersky V, Shohami E, Leker RR. Short term morphine exposure in vitro alters proliferation and differentiation of neural progenitor cells and promotes apoptosis via Mu receptors. *PLoS One.* 2014;9(7):1–11.
210. Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jul;66(13):2109–21.
211. Xhelmac B, Dawson M, Bannister AJ. Histone modifications: John Wiley and Sons; 2011.
212. Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, et al. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Jul;90(14):6736–40.
213. Zadina JE, Kastin AJ, Ge LJ, Gulden H, Bungart KJ. Chronic, but not acute, administration of morphine alters antiopiate (Tyr-MIF-1) binding sites in rat brain. *Life Sci.* 1989;44(8):555–61.
214. Zampieri N, Chao M V. Mechanisms of neurotrophin receptor signalling. *Biochem Soc*

- Trans. 2006 Aug;34(Pt 4):607–11.
215. Zhang J, Haddad GG, Xia Y. delta-, but not mu- and kappa-, opioid receptor activation protects neocortical neurons from glutamate-induced excitotoxic injury. *Brain Res.* 2000 Dec;885(2):143–53.
 216. Zhang Y, Fatima N, Dufau ML. Coordinated changes in DNA methylation and histone modifications regulate silencing/derepression of luteinizing hormone receptor gene transcription. *Mol Cell Biol.* 2005 Sep;25(18):7929–39.
 217. Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* 2008;9(9):R137.
 218. Zhang Y, Friedlander RM. Using non-coding small RNAs to develop therapies for Huntington's disease. *Gene Ther.* 2011 Dec;18(12):1139–49.
 219. Zhao W-G, Yu S-N, Lu Z-H, Ma Y-H, Gu Y-M, Chen J. The miR-217 microRNA functions as a potential tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting KRAS. *Carcinogenesis.* 2010 Oct;31(10):1726–33.
 220. Zhu H, Wang Q, Yao Y, Fang J, Sun F, Ni Y, et al. Microarray analysis of Long non-coding RNA expression profiles in human gastric cells and tissues with *Helicobacter pylori* Infection. *BMC Med Genomics.* 2015;8:84.
 221. Zhu Z-P, Badisa RB, Palm DE, Goodman CB. Regulation of rat MOR-1 gene expression after chronic intracerebroventricular administration of morphine. *Mol Med Rep.* 2012 Feb;5(2):513–6.
 222. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003 Jul;31(13):3406–15.

Anexos

Anexo 1. Cuantificación de los resultados de los experimentos mostrados en las figuras incluidas a lo largo de este trabajo

Figura 10. Datos de la cuantificación realizada por qPCR de la expresión del *mir212* y del *mir132* tras la exposición a morfina (10nM), a naloxona (1 μ M) o ambas

Control			<i>mir212</i> 10 nM			<i>mir212</i> Nx 1 μ M			<i>mir212</i> 10 nM + 1 μ M			<i>mir132</i> 10 nM			<i>mir132</i> Nx 1 μ M			<i>mir132</i> 10 nM + 1 μ M		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
1	0	5	0,4353	0,1787	5	1,593	0,3804	5	0,9443	0,2026	5	1,289	0,0445	5	0,137	0,03175	5	0,8997	0,06099	5

Figura11B. Datos de la cuantificación de las células en proliferación en torno al área periventricular en embriones control, morfantes de los miRNAs 212 y 132(Mo) y el efecto de la exposición a morfina (10nM)

C- 48			C- 48 + 10 nM			Mo 212			Mo 212 + 10 nM			Mo 132			Mo 132 + 10 nM		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
53	4,509	3	62,67	3,712	3	59,33	8,969	3	66,67	4,807	3	62,67	6,766	3	92,67	16,9	3

Figura11C. Datos de la cuantificación de las células en apoptosis en torno al área periventricular en embriones control, morfantes de los miRNAs 212 y 132 (Mo) y el efecto de la exposición a morfina (10nM)

C- 48			C- 48 + 10 nM			Mo 212			Mo 212 + 10 nM			Mo 132			Mo 132 + 10 nM		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
26	4,163	3	27,33	5,812	3	14	1,155	3	17,33	4,055	3	41,33	10,09	3	36,67	10,73	3

Figura 13. Datos de la cuantificación de los resultados de western blot para determinar la expresión de Bdnf y TrkB en situación control y tras la exposición a morfina (10nM)

Control			Bdnf + 10 nM			TrkB + 10 nM		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
1	0	5	1,373	0,02505	5	1,293	0,06398	5

Figura 14. Datos de la cuantificación de los resultados de western blot para determinar la expresión de Bdnf en morfantes (Mo) para el *mir212*, *mir132* y *oprm1* y los cambios tras la exposición a morfina (10nM)

Control			212 Mo			212 Mo + 10 nM			132 Mo			132 Mo + 10 nM			<i>oprm1</i> Mo			<i>oprm1</i> Mo + 10 nM		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
1	0	5	0,3549	0,0475	5	0,5485	0,02128	5	0,06273	0,01595	5	0,03149	0,007586	5	0,0508	0,02743	5	0,07945	0,01875	5

Figura 15. Datos de la cuantificación de los resultados de western blot para determinar la expresión de TrkB en morfantes para el *mir212*, *mir132* y *oprm1*

Control			212 Mo			212 Mo + 10 nM			132 Mo			132 Mo + 10 nM			<i>oprm1</i> Mo			<i>oprm1</i> Mo + 10 nM		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
1	0	5	1,783	0,0853	5	0,3579	0,02307	5	1,111	0,03076	5	0,8064	0,04413	5	0,6771	0,1748	5	0,7876	0,1584	5

Figura 17. Datos de la cuantificación de los resultados del análisis de luciferasa para determinar la regulación de la secuencia de *mecp2* (*wt*) por el *mir212* y el *mir132*

Control			wt			wt 212			wt 132		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
1	0,1405	5	0,4645212	0,04044	5	0,287525	0,05763	5	0,3179225	0,07097	5

Figura 23. Datos de la cuantificación de la expresión de *sox2* durante varios estadios del desarrollo del pez cebra. Efectos de la exposición a morfina 10 nM

C-			8 hpf 10 nM			16 hpf 10 nM			24 hpf 10 nM			48 hpf 10 nM		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
1	0	3	3,236	0,4115	3	3,12	0,292	3	9,576	0,114	3	1,061	0,24	3

Figura 24. Cuantificación de los resultados de qPCR para determinar la expresión de *sox2* tras el silenciamiento del *mir212*, del *mir132* y de *oprm1*, durante varios estadios del desarrollo de pez cebra

HPF	C-			212 mo			132 mo			oprm1 mo		
	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
8	1	0	3	0,35	0,143	3	0,39	0,112	3	0,2705	0,2095	3
16	1	0	3	0,6170	0,02120	3	0,8065	0,005500	3	0,6085	0,1155	3
24	1	0	3	0,948	0,028	3	2,183	0,291	3	1,766	0,0185	3
48	1	0	3	1,594	0,07	3	4,048	0,151	3	1,549	0,0385	3

Figura 25. Datos de la cuantificación de los resultados del análisis de luciferasa para determinar la regulación de la secuencia del único exón de *sox2* (*wt*) por el *mir212* y el *mir132*

c-			wt			wt 212			wt 132		
Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N	Media	SEM	N
1	0,004552	3	0,9232609	0,02282	3	0,9968734	0,00636	3	0,9844569	0,004443	3

Anexo 2. Resultados del análisis del enriquecimiento de los genes asociados a la modificación H3K27ac tras la exposición a morfina obtenidos por CHIP-seq. El estudio de los genes modificados en regiones adyacentes (Columnas sombreadas) se realizó con la base de anotación genómica Ensemble (V. GRCz10).

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG0000001057	-	inside	169	bystin-like [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-1287]	ENSDARG00000027391	Cyclin D3
ENSDARG00000097155	-	inside	269	zgc:153343 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-060929-280]		
ENSDARG00000077473	+	inside	584	myelocytomatosis oncogene homolog [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030219-51]		
ENSDARG00000099865	+	inside	124	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/Bb [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-2516]	ENSDARG00000098259	5s rRNA
ENSDARG00000091931	+	inside	170	G patch domain containing 4 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-041008-158]	ENSDARG00000088805	Nestin
ENSDARG00000030700	+	inside	145	CTP synthase 1a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-808]	ENSDARG00000034215	Rab 42
ENSDARG00000020258	-	inside	235	EWS RNA-binding protein 1a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-2317]		
ENSDARG00000102320	-	upstream	-275	MOB kinase activator 1A [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-6506]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000104889	+	inside	314	karyopherin (importin) beta 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-2579]	ENSDARG00000101521	UBE2M
					-	-
					ENSDARG00000104420	SNORA79
					-	-
ENSDARG00000018124	psmd3					
ENSDARG00000029058	-	inside	300	retinoblastoma binding protein 4 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-445]		
ENSDARG00000052641	-	inside	443	karyopherin alpha 3 (importin alpha 4) [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030616-541]		
ENSDARG00000067613	+	inside	160	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C , member 25 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-081104-137]		
ENSDARG00000019765	-	inside	189	zgc:158803 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-070424-15]	ENSDARG00000024681	Pane1
ENSDARG00000039208	-	inside	471	nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding) [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-5511]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000026967	+	inside	32212	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-2174]		
ENSDARG00000090337	-	inside	463	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator-related 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-9858]	ENSDARG00000074686	mgea5
ENSDARG00000004702	-	downstream	35086	interferon regulatory factor 2 binding protein 2a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-7809]		
ENSDARG00000101018	+	inside	256	phosphatidylserine synthase 2 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-130424-2]		
ENSDARG00000000229	+	upstream	-1721	ubiquitin specific peptidase 49 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-050208-484]		
ENSDARG00000034825	+	inside	164	ubiquitin specific peptidase like 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040930-7]	ENSDARG00000054755	alox5ap

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000004576	-	upstream	-246	polo-like kinase 4 (Drosophila) [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030619-14]		
ENSDARG00000010571	+	inside	113	enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-041111-259]		
ENSDARG00000005122	+	inside	484	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-867]		
ENSDARG00000029930	-	downstream	34578	SAM pointed domain containing ETS transcription factor [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17257]		
ENSDARG00000057414	+	inside	179	prohibitin [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-6577]		
ENSDARG00000063649	+	inside	23863	TEA domain family member 3 b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-080103-3]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000068401	-	inside	34864	Yes-associated protein 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-9710]		
ENSDARG00000070477	-	inside	344	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 2 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-1912]		
ENSDARG00000092115	-	inside	552	eukaryotic translation initiation factor 4A1A [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-031030-2]	ENSDARG00000092115 - ENSDARG00000040266	SNORD10 - sox19b
ENSDARG00000099865	+	inside	495	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/Bb [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-2516]	ENSDARG00000098259	5s rRNA
ENSDARG00000086060	+	inside	217	hmcn2		
ENSDARG00000043453	-	inside	159	ribosomal protein S5 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-020419-12]	ENSDARG00000097804 - ENSDARG00000077479	Lypc - msh5
ENSDARG00000035468	+	upstream	-137	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-060526-340]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000077473	+	downstream	115398	myelocytomatosis oncogene homolog [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030219-51]		
ENSDARG00000002659	-	inside	348	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 1b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-2256]		
ENSDARG00000012140	-	inside	274	cyclin L1b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-4813]		
ENSDARG00000058571	-	inside	195	putative pyruvate dehydrogenase phosphatase isoenzyme 2 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-000921-2]	ENSDARG00000088130	si:dkey-30c15.10
ENSDARG00000044511	-	inside	211	ets variant 5b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-991228-4]		
ENSDARG00000103142	+	inside	124	chromosome 9 open reading frame 69 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:31009]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000092693	-	inside	593	tumor protein, translationally-controlled 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-990603-10]	ENSDARG00000081849 - ENSDARG00000085301	SNORD58 - SNORA31
ENSDARG00000035895	-	upstream	-1539	fibronectin type III domain containing 5b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-060503-916]		
ENSDARG00000024416	-	inside	379	TWIST neighbor [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-041007-3]		
ENSDARG00000007216	-	inside	289	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-1995]		
ENSDARG00000099865	+	upstream	-413	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/Bb [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-2516]		
ENSDARG00000016753	+	inside	174	importin 9 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-2953]		
ENSDARG00000070127	+	inside	215	nuclear transcription factor, X-box binding-like 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-110411-178]		
ENSDARG00000051785	+	inside	167	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 33		

Anexo 3. Resultados del análisis del enriquecimiento de los genes asociados a la modificación H3K27me3 tras la exposición a morfina, obtenidos por CHIP-seq. El estudio de los genes modificados en regiones adyacentes (Columnas sombreadas) se realizó con la base de anotación genómica Ensemble (V. GRCz10).

ENSDARG00000080000	-	upstream	-15180	si:dkey-178e17.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-B-GENE-081104-41]	
ENSDARG00000101623	-	inside	6067	zinc finger protein 992 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-110913-92]	
ENSDARG00000069692	+	inside	5428	collagen type VII alpha 1-like [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-9861]	
ENSDARG00000078442	-	inside	5109	NOP9 nucleolar protein [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:19826]	
ENSDARG00000014230	+	inside	25104	dihydrolipoamide S-succinyltransferase [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030326-1]	
ENSDARG00000015015	+	upstream	-52490	tetraspanin 18b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040718-137]	
ENSDARG00000037433	+	upstream	-56287	fragile X mental retardation 1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-020731-6]	

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG000000983 74	+	inside	22086	filamin B [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:375 5]		
ENSDARG000000085 53	+	upstream	-17599	zgc:136872 [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-060421-5204]		
ENSDARG000000976 26	+	inside	55451	si:ch211-242a9.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-131121-347]		
ENSDARG000000969 26	-	upstream	-155966	si:dkey-117j14.8 [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-131127-487]	ENSDARG000000589 69	cntnap2a
ENSDARG000000215 95	+	inside	736	lipoma HMGIC fusion partner-like 3 [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-040801-180]	ENSDARG000000980 69	BX537162.1
ENSDARG000000812 18	+	downstream	1415	5.8S ribosomal RNA [Source:RFAM;Acc:RF 00002]		
ENSDARG000000948 65	-	upstream	-14094	si:ch211-244i7.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-081104-196]		
ENSDARG000001006 13	+	upstream	-4251			
ENSDARG000000250 34	-	downstream	42319	synaptogyrin 3b [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-070822-6]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG000000209 29	-	upstream	-34885	family with sequence similarity 49, member Ba [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-9537]	ENSDARG000000294 63	asap1a
ENSDARG000000942 04	-	inside	19756	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-071116-7]		
ENSDARG000000539 56	+	upstream	-6288	spectrin, beta, non-erythrocytic 2 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-787]		
ENSDARG000000941 76	+	downstream	1628	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4) [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-110316-1]		
ENSDARG000000051 62	-	upstream	-20236	tropomyosin 3 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030826-16]	ENSDARG000000403 80	arhgef1a
ENSDARG000000920 33	-	upstream	-33964	si:dkey-239h2.3 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-081104-383]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG0000052360	-	downstream	30925	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 1b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-131127-98]		
ENSDARG0000057625	+	inside	13888	dual specificity phosphatase 14 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-041010-162]		
ENSDARG0000094731	+	downstream	52607	si:ch211-20915.2 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-070705-265]		
ENSDARG0000088942	-	downstream	19519			
ENSDARG00000103921	-	upstream	-12544			
ENSDARG0000099083	+	upstream	-997	si:dkey-77g12.2 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-141216-94]	ENSDARG00000102271	si:dkey-203a12.2
ENSDARG0000087074	+	inside	20846	zinc finger protein 574 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-100922-259]		
ENSDARG0000074665	-	inside	60333	cyclin-dependent kinase 14 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-080220-44]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000094839	-	downstream	36264	si:dkey-246e1.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-070705-415]		
ENSDARG00000069171	-	inside	91022	GRAM domain containing 4a [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-041210-211]		
ENSDARG00000079660	-	inside	8823	zgc:158420 [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-080401-2]		
ENSDARG00000079330	-	inside	9678	collagen, type XXVI, alpha 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:180 38]		
ENSDARG00000017128	+	upstream	-21914	myoferlin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:365 6]	ENSDARG000000333 27	unc5b
ENSDARG00000023927	+	upstream	-32823	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 24 [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-040426-1153]		
ENSDARG00000031809	+	upstream	-31219	RNA binding motif protein 24b [Source:ZFIN;Acc:ZDB -GENE-060312-43]	ENSDARG000000695 94	kif13a

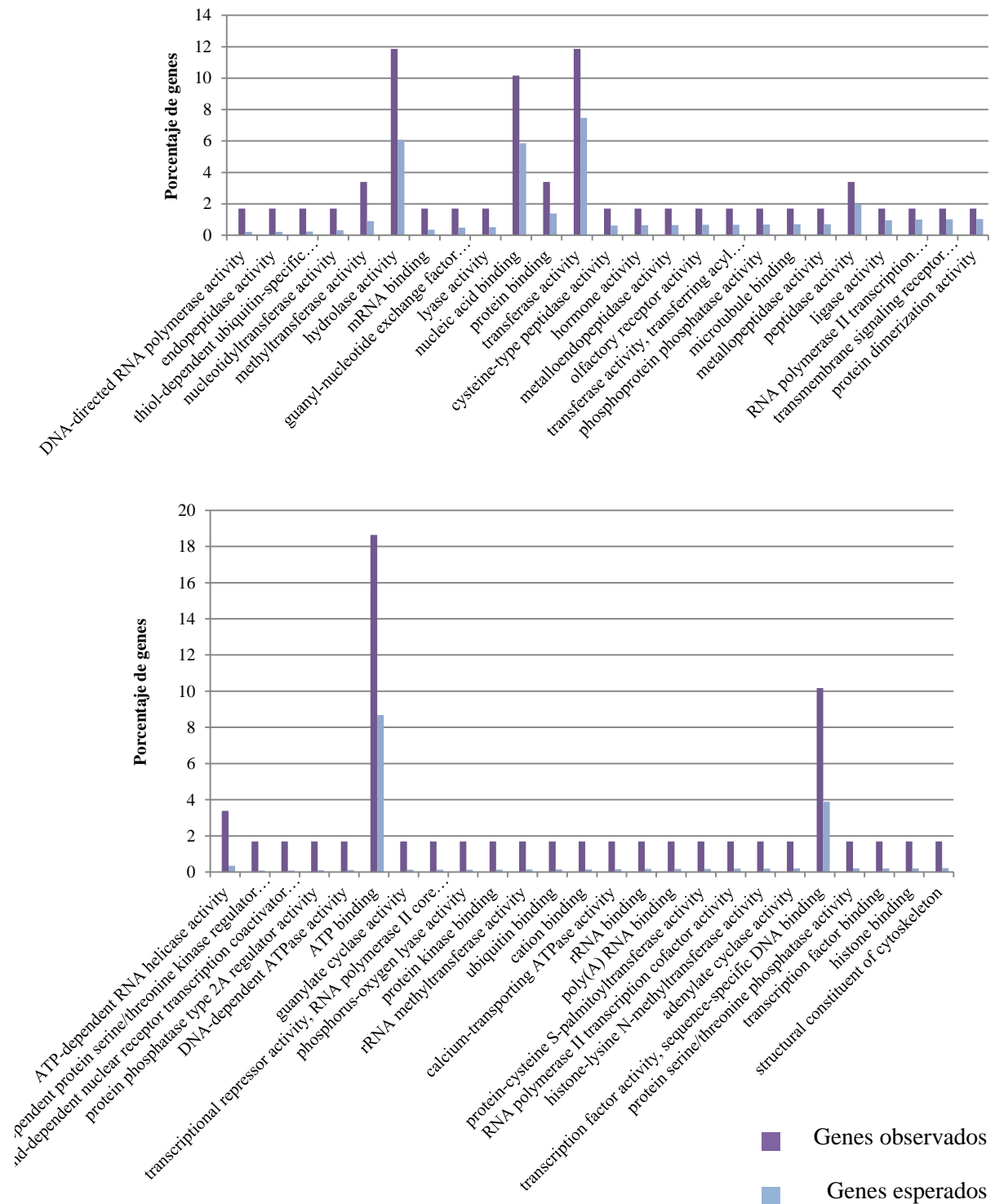
Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000104489	-	downstream	16400	si:dkey-74i1.5 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-131120-68]	ENSDARG00000102626	frem2b
ENSDARG00000078149	-	upstream	-26164	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2Ca [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-070822-3]	ENSDARG000000005883	rfx1a
ENSDARG00000098512	-	upstream	-34571	si:ch73-215f7.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-141216-478]	ENSDARG000000080612 - ENSDARG000000029764	dre-mir-9-2 - mef2ca
ENSDARG00000104313	+	upstream	-34803			
ENSDARG00000005827	+	downstream	127332	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-526]		
ENSDARG00000105447	+	inside	64102	si:ch211-129p13.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-160113-47]		
ENSDARG00000070100	+	upstream	-55063	si:ch211-168d1.3 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-160113-13]	ENSDARG000000073728	gal3st3
ENSDARG00000019743	-	inside	25948	dynactin 1a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-070117-2205]		

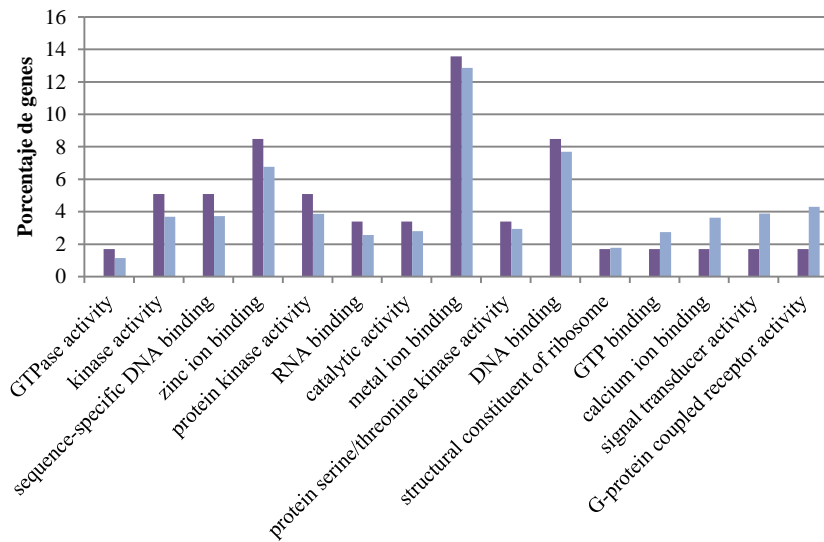
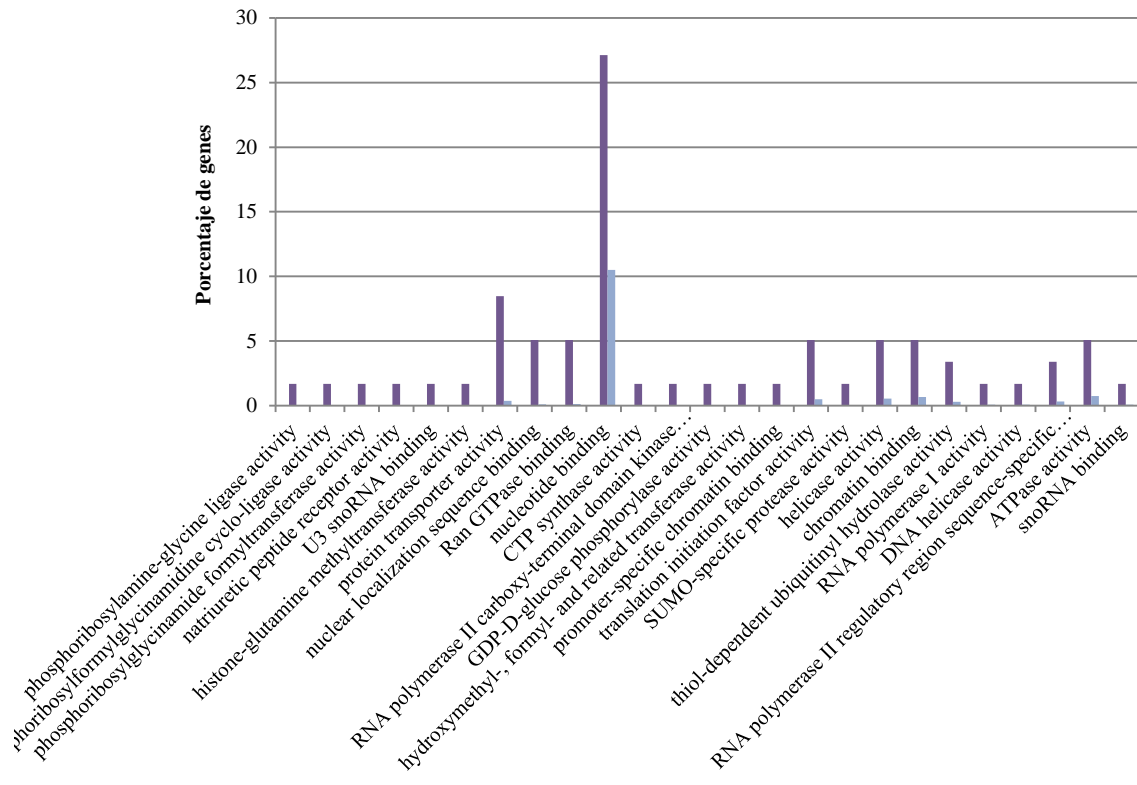
Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000085871	-	upstream	-4680	5S ribosomal RNA [Source:RFAM;Acc:RF00001]	ENSDARG00000004196	tnfsf10l
ENSDARG00000096866	-	upstream	-50795	si:dkey-50d16.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-131127-276]	ENSDARG00000045639	elavl4
ENSDARG00000015546	+	inside	26485	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040420-1]		
ENSDARG00000027887	+	downstream	186816	zinc finger, FYVE domain containing 21 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-1296]		
ENSDARG00000099352	+	inside	11137	si:rp71-62i8.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-131127-571]		
ENSDARG00000021149	-	upstream	-2763	carbonyl reductase 1-like [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-030131-9642]		
ENSDARG00000067567	-	downstream	37604	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 13 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:11046]		

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG000001001 63	+	inside	9404	TOX high mobility group box family member 4 b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-080220-49]	ENSDARG000000799 49	supt16h
ENSDARG000000177 75	+	upstream	-23564	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C3 (subunit 9), genome duplicate a [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-040426-857]		
ENSDARG000000339 49	+	upstream	-48485	F-box protein 16 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-041015-747]	ENSDARG000000164 64	CDC42BPA
ENSDARG000001031 09	+	inside	61791	cell adhesion molecule L1-like b [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-091105-1]		
ENSDARG000001054 53	-	inside	53	potassium channel, subfamily K, member 17 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-120113-3]	ENSDARG000000532 40	kif6

Gen	Hebra	Localización en el gen	Localización (pb)	Descripción	Gen más cercano en la hebra (20000 pb)	Descripción del gen cercano
ENSDARG00000051823	-	upstream	-21590	hyaluronoglucosaminidase 4 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-061220-9]	ENSDARG00000038166	hyal6
ENSDARG00000096161	+	downstream	45439	si:dkeyp-89h8.1 [Source:ZFIN;Acc:ZDB-GENE-110914-178]		

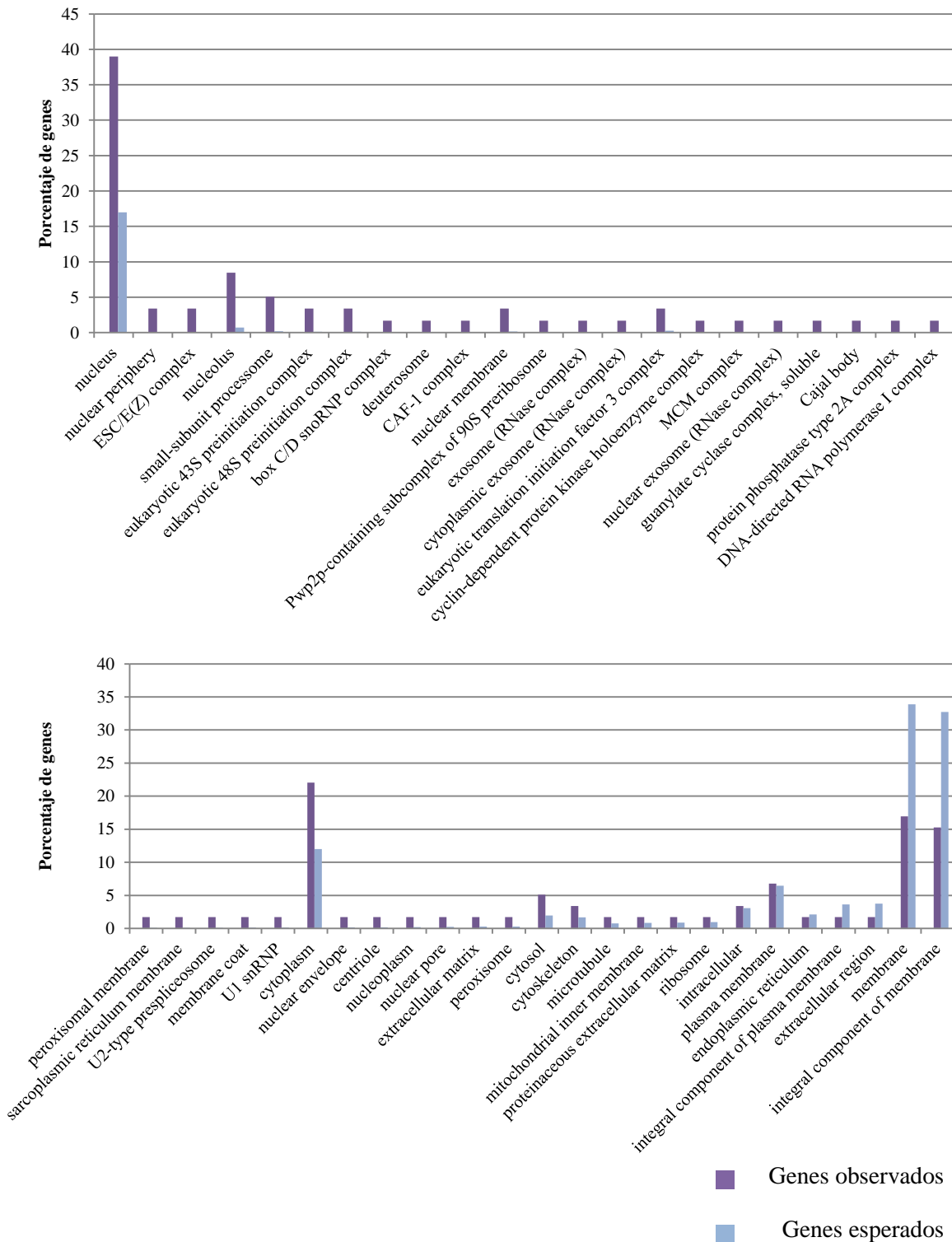
Anexo 4. Resultados del análisis funcional a nivel de la función molecular de los genes afectados por la modificación H3K27ac tras la exposición a morfina. El estudio se realizó con la base de datos Gene Ontology que muestra las diferencias entre los genes esperados estadísticamente y observados en relación con la funcionalidad estudiada.



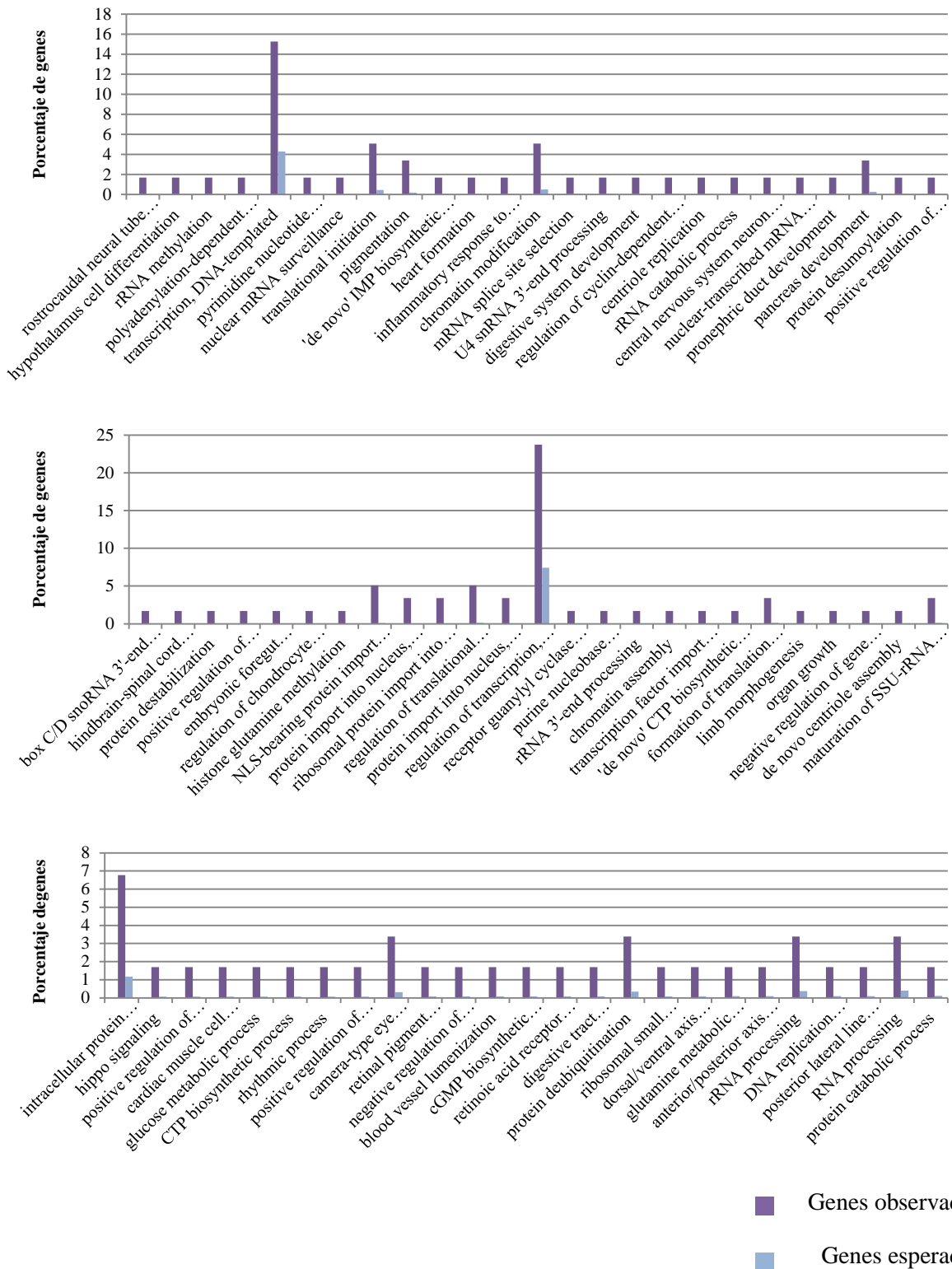


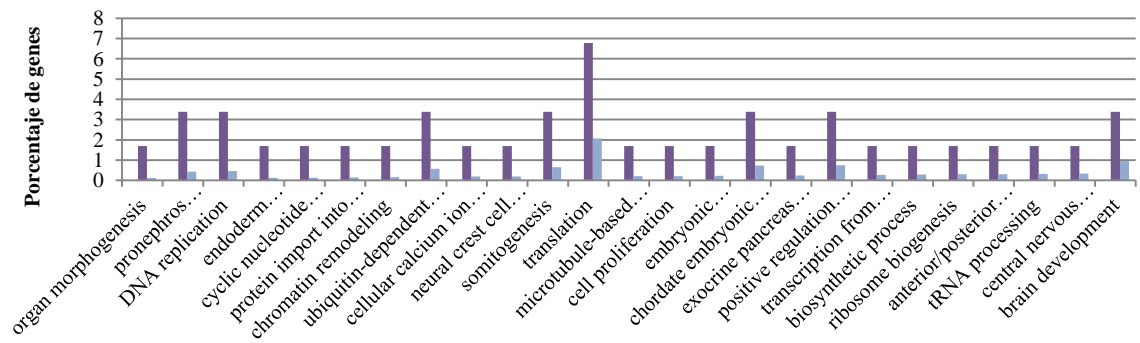
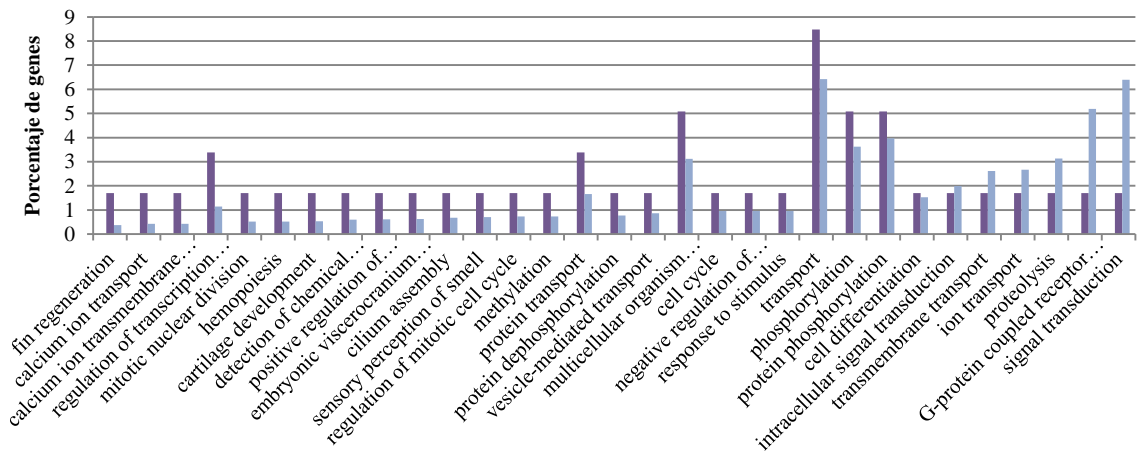
■ Genes observados
 ■ Genes esperados

Anexo 5. Resultados del análisis funcional a nivel de componente celular asociado a los genes afectados por la modificación H3K27ac tras la exposición a morfina. El estudio se realizó con la base de datos Gene Ontology que muestra las diferencias entre los genes esperados estadísticamente y observados en relación con la funcionalidad estudiada.



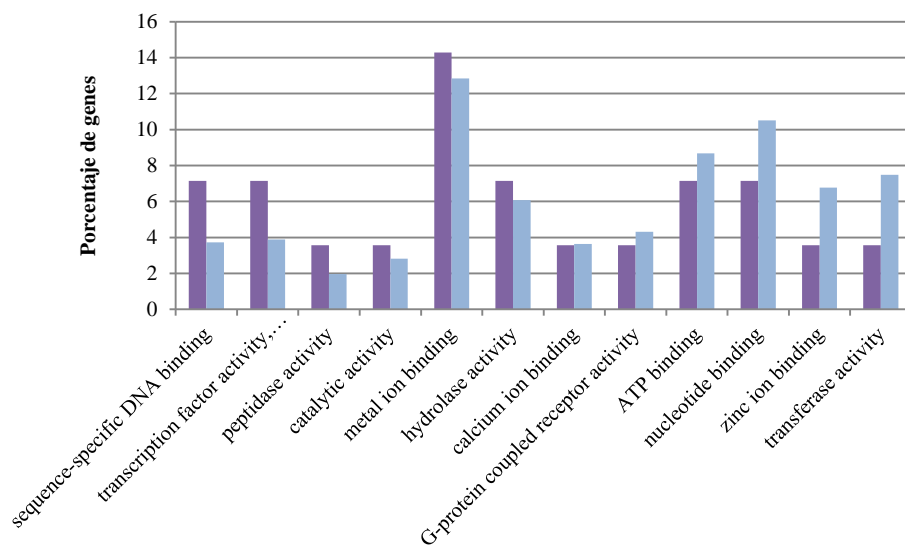
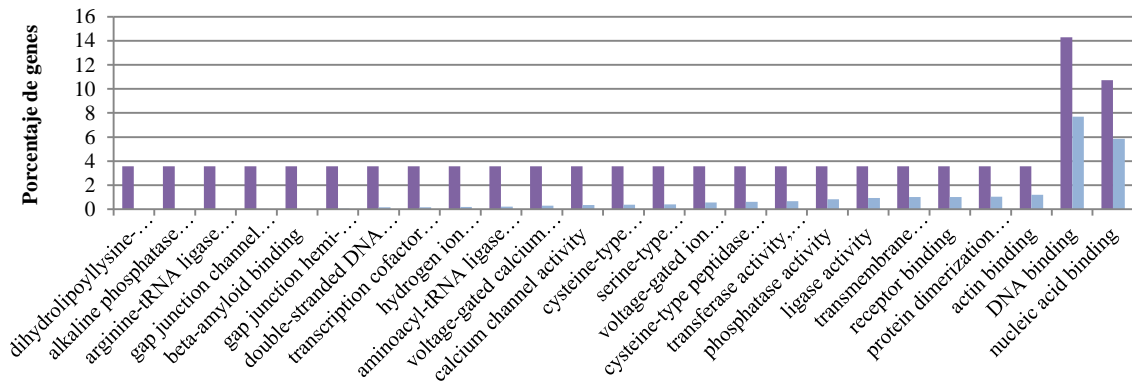
Anexo 6. Resultados del análisis funcional a nivel del proceso biológico en el que intervienen los genes afectados por la modificación H3K27ac tras la exposición a morfina. El estudio se realizó con la base de datos Gene Ontology que muestra las diferencias entre los genes esperados estadísticamente y observados en relación con la funcionalidad estudiada.





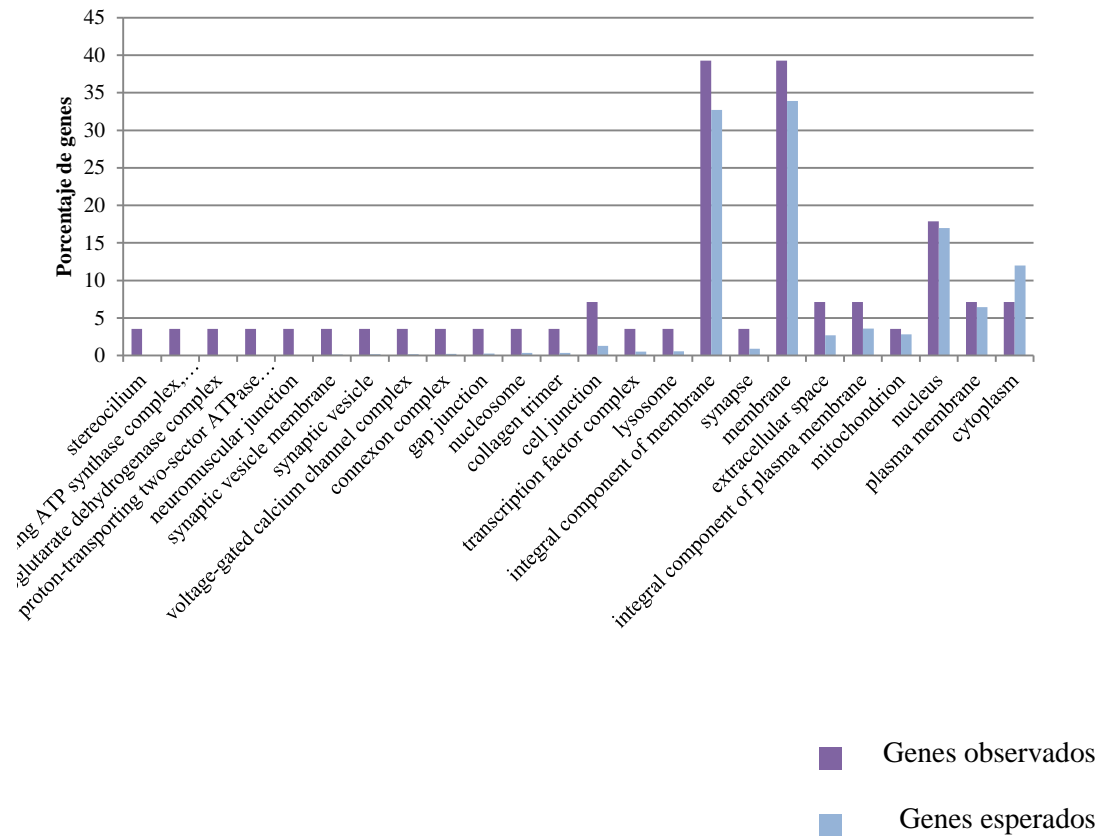
■ Genes observados
 ■ Genes esperados

Anexo 7. Resultados del análisis funcional a nivel de la función molecular de los genes afectados por la modificación H3K27me3 tras la exposición a morfina. El estudio se realizó con la base de datos Gene Ontology que muestra las diferencias entre los genes esperados estadísticamente y los observados en relación con la funcionalidad estudiada.

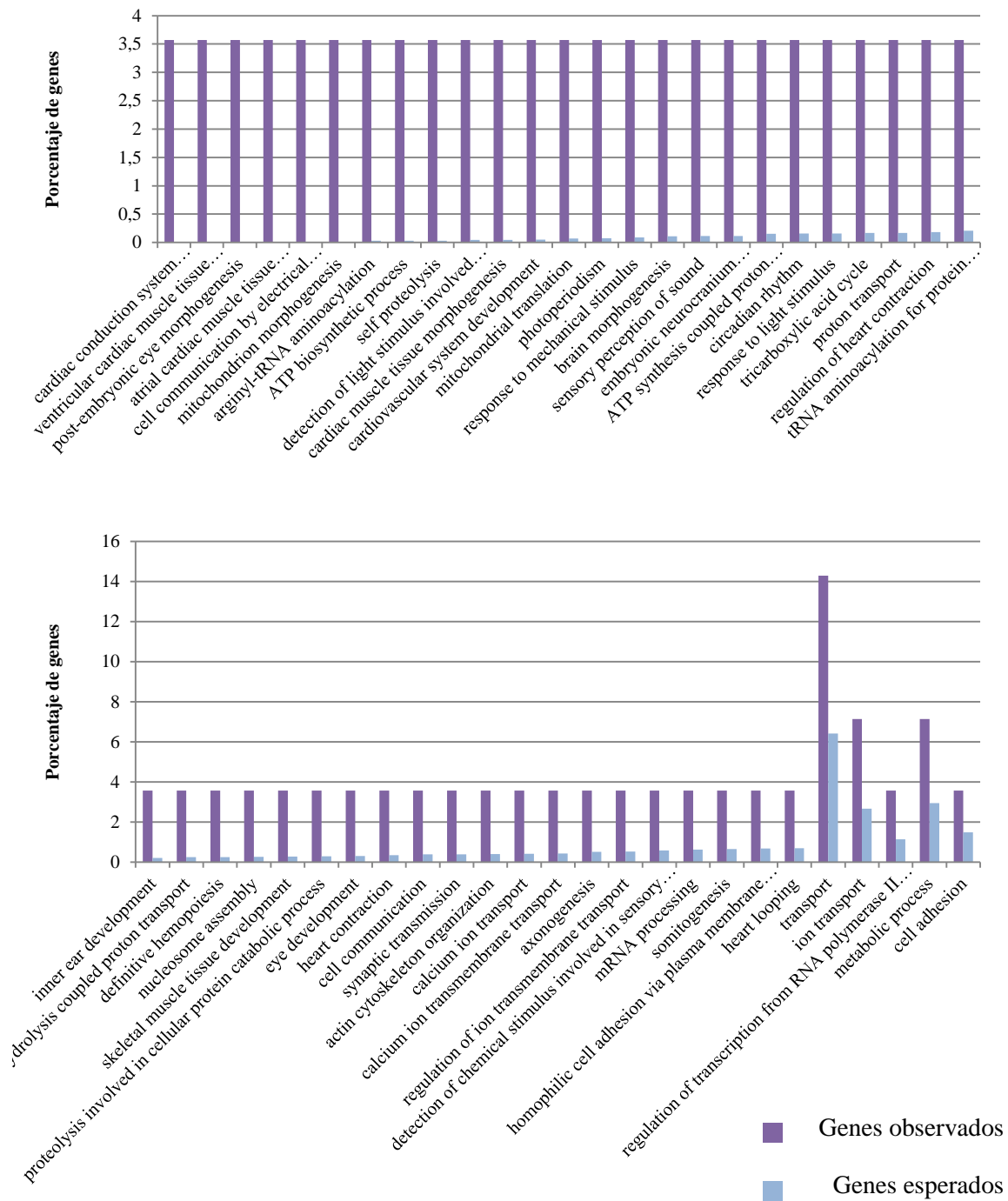


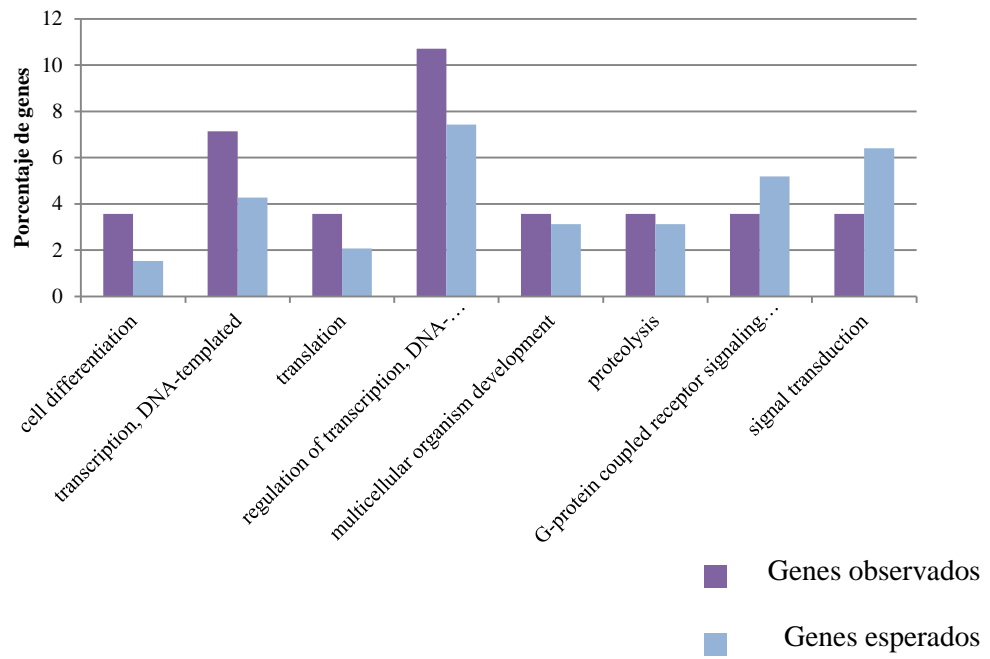
■ Genes observados
 ■ Genes esperados

Anexo 8. Resultados del análisis funcional a nivel de componente celular asociado a los genes afectados por la modificación H3K27me3 tras la exposición a morfina. El estudio se realizó con la base de datos Gene Ontology que muestra las diferencias entre los genes esperados estadísticamente y los observados en relación con la funcionalidad estudiada.

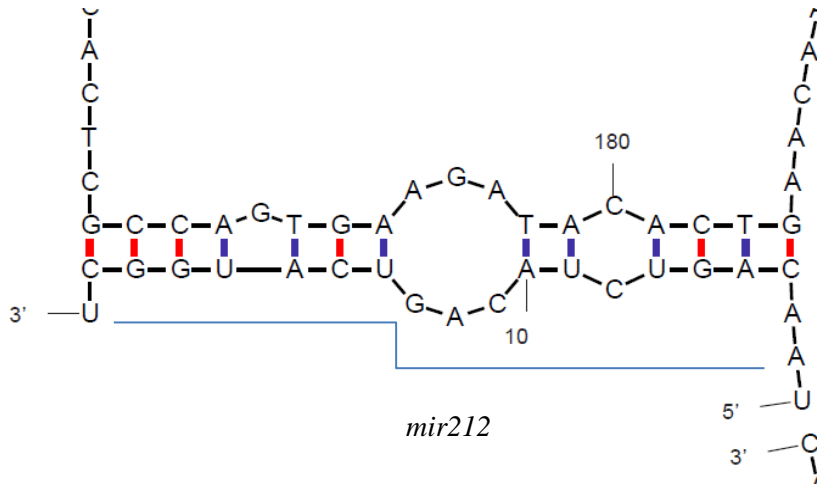


Anexo 9. Resultados del análisis funcional a nivel del proceso biológico en el que intervienen los genes asociados a la modificación H3K27me3 tras la exposición a morfina. El estudio se realizó con la base de datos Gene Ontology que muestra las diferencias entre los genes esperados estadísticamente y observados en relación con la funcionalidad estudiada.

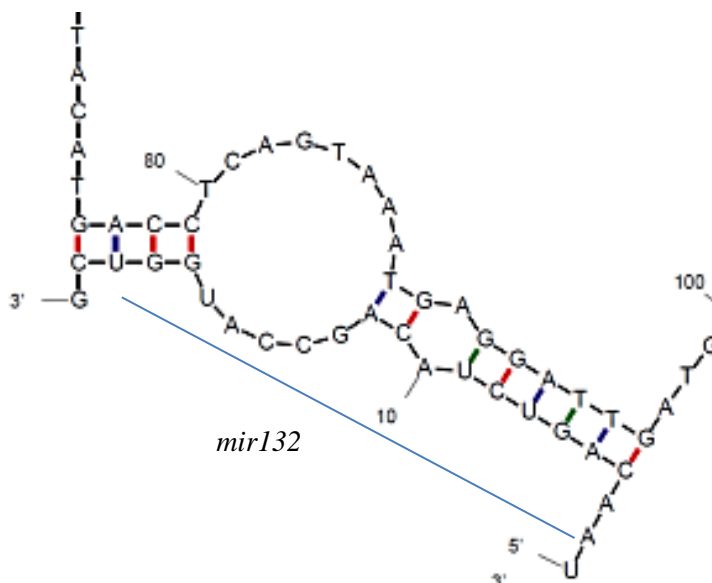




Anexo 10. Resultados del análisis bioinformático de la unión de los miRNAs 212 y 132 a la secuencia de TrkB.

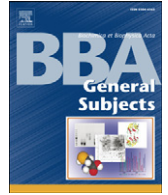


Unión imperfecta del *mir212* (línea azul) a la secuencia de TrkB en la que la región *seed* (extremo 5') no presenta complementariedad en las primeras bases.



Unión imperfecta del *mir132* (línea azul) a la secuencia de TrkB en la que la región *seed* (extremo 5') no presenta complementariedad en las primeras bases.

Anexo 11. Jimenez-Gonzalez A, Garcia-Concejo A, Lopez-Benito S, Gonzalez-Nunez V, Arevalo JC, Rodriguez RE. Role of morphine, miR-212/132 and mu opioid receptor in the regulation of Bdnf in zebrafish embryos. *Biochimica et biophysica acta*;1860(6):1308-16. (2016).



Role of morphine, miR-212/132 and mu opioid receptor in the regulation of Bdnf in zebrafish embryos



Ada Jimenez-Gonzalez^{b,c}, Adrián García-Concejo^{b,c}, Saray López-Benito^{b,c}, Verónica Gonzalez-Nunez^{a,b,c}, Juan Carlos Arévalo^{b,c,d}, Raquel E. Rodriguez^{a,b,c,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Salamanca, Spain

^b Institute of Neurosciences of Castilla y Leon (INCyL), University of Salamanca, Spain

^c Institute of Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), Salamanca, Spain

^d Department of cell biology and pathology, Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 September 2015

Received in revised form 29 January 2016

Accepted 1 March 2016

Available online 4 March 2016

Keywords:

miR-132

miR-212

Morphine

Bdnf

Danio rerio

ABSTRACT

Background: Morphine is one of the first-line therapies for the treatment of pain despite its secondary effects. It modifies the expression of epigenetic factors like miRNAs. In the present study, we analyzed miR-212 and miR-132 and their implication in morphine effects in the zebrafish Central Nervous System (CNS) through the regulation of Bdnf expression.

Methods: We used control and knock-down zebrafish embryos to assess the effects of morphine in miRNAs 212/132 and mitotic or apoptotic cells by qPCR, immunohistochemistry and TUNEL assay, respectively. Bdnf and TrkB were studied by western blot and through a primary neuron culture. A luciferase assay was performed to confirm the binding of miRNAs 212/132 to *mecp2*.

Results: Morphine exposure decreases miR-212 but upregulates miR-132, as well as Bdnf and TrkB, and changes the localization of proliferative cells. However, Bdnf expression was downregulated when miRNAs 212/132 and *oprm1* were knocked-down. Furthermore, we proved that these miRNAs inhibit *mecp2* expression by binding to its mRNA sequence. The described effects were corroborated in a primary neuron culture from zebrafish embryos.

Conclusions: We propose a mechanism in which morphine alters the levels of miRNAs 212/132 increasing Bdnf expression through *mecp2* inhibition. *oprm1* is also directly involved in this regulation. The present work confirms a relationship between the opioid system and neurotrophins and shows a key role of miR-212 and miR-132 on morphine effects through the regulation of Bdnf pathway.

General significance: miRNAs 212/132 are novel regulators of morphine effects on CNS. *Oprm1* controls the normal expression of Bdnf.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Morphine has been widely studied not only for the control of pain but also for its effects as an addictive drug and for its influence on the development of the central nervous system (CNS) [1,2]. This opiate produces important secondary effects such as respiratory depression, gastrointestinal alterations, teratogenic effects and addiction, making its use controversial [1–3]. Morphine exerts its effects by activating G-protein-coupled receptors like the mu (OPRM1), its highest affinity receptor, the delta (OPRD1) and the kappa opioid receptor (OPRK1).

Abbreviations: *Oprm1*, μ opioid receptor; CNS, Central Nervous System; hpf, hours post fertilization; Bdnf, Brain derived neurotrophic factor; miRNA, microRNA; *Mecp2*, Methyl CpG binding Protein 2; TrkB, Tyrosine receptor kinase B; Creb, cAMP response element binding protein.

* Corresponding author at: Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL), c/ Pintor Fernando Gallego n. 1, 37007 Salamanca, Spain.

E-mail address: requelmi@usal.es (R.E. Rodriguez).

In zebrafish, the endogenous opioid system has been well characterized and the existence of *Oprm1*, two delta duplicates (*Oprd1* and *Oprd2*), one kappa opioid receptor (*Oprk1*) and one opiate receptor-like (*Oprl1*) has been proved [4–7]. The fact that the complete opioid system is known in zebrafish allows us to use it as a model to study the effects of morphine on different systems.

microRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNA sequences which generally bind to 3'-UTR regions of their mRNA targets through a complementary sequence of 7–8 nucleotides in their 5' end. Some studies have also reported a binding to 5'-UTR ends and coding regions [8–11]. Depending on the complementarity of the miRNA to its seed region, segmentation and deletion of the target or only its inhibition may occur [12]. It is well known that one gene can be the target of a pool of miRNAs at the same time. On the other hand, each miRNA can target several transcripts by itself [13,14]. Some miRNAs are related to specific areas of the organism. In this sense, numerous miRNAs have been identified in the CNS, many of them carrying out important roles.

Within these molecules, miR-212 and miR-132 forms a gene cluster which was first identified as a regulator of cAMP response element binding protein (CREB). This cluster is highly conserved in vertebrates and has been related to neuronal morphogenesis and synaptic plasticity [14,15]. miR-212 by itself has been shown to control cocaine intake through CREB signaling [16] and methyl CpG binding protein 2 (MeCP2) expression [17]. miR-132 has been related to Repressor Element 1 silencing transcription factor (REST) and to some diseases such as Rett syndrome [18].

Brain derived neurotrophic factor (BDNF) belongs to the neurotrophins family, essential proteins during CNS development. BDNF is involved in the maturation, differentiation and maintenance of neuronal populations [19,20] and the regulation of neuronal plasticity and synaptic functions through the activation of some essential pathways like mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase (MAPK/ERK), phospholipase C γ (PLC γ), and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signaling cascades [21]. BDNF precursor is intracellularly cleaved by enzymes like furin or pro-convertases and secreted as the 14 kDa mature BDNF or secreted as proBDNF and then cleaved by extracellular proteases, such as metalloproteinases and plasmin [22,23]. Neurotrophins bind to transmembrane protein with tyrosine-kinase activity called Trks. In particular, BDNF binds to the tyrosine receptor kinase B (TrkB) [24]. Heinrich and Lum have confirmed the presence of neurotrophins in teleost fish with well conserved structures [25].

In this work we aimed to analyze the effects of morphine on miR-212 and miR-132 and their possible regulation of the Bdnf pathway.

2. Material and methods

2.1. Animals

Experiments were performed using the wild-type *AB* zebrafish line. General maintenance and care of fish were carried out according to standard protocols in our own zebrafish facility. Animals were maintained at a constant temperature of 28 °C in a 14 h light cycle and fed three times a day. Embryos were obtained by natural mating and cultured in E3 medium, with or without the addition of 0.003% 1-Phenyl-2-thiourea (PTU, Sigma) to inhibit pigmentation. Embryos were staged according to hours post fertilization (hpf) [26]. In all experiments, adequate measures were taken to minimize pain or discomfort and animals were handled according to the guidelines of the European Communities Council Directive 2010/63/UE, to the current Spanish legislation for the use and care of animals RD 53/2013 and to the Guide for the Care and Use of Laboratory animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health.

2.2. Drug treatment

Zebrafish embryos were exposed to 10 nM morphine-sulfate and 1 μ M naloxone in E3 embryo buffer from 5 hpf (50% epiboly) to 48 hpf. Fresh morphine solution was added at 24 hpf. A control group (E3 only) was used in parallel for each experiment. Morphine was provided by the Spanish Ministry of Health.

2.3. Morpholino injections: knockdown at one-cell stage

Morpholinos were purchased from Gene Tools LLC (Philomath, Oregon). Morpholino sequences used are shown in Table 1. Morpholino was microinjected at the 1-cell stage at a concentration of 0.33 mM. A standard control morpholino (available from GeneTools) was injected at the same concentration.

2.4. Total protein extraction and western blot

Total proteins were extracted from zebrafish embryos at 48 hpf using cold Ringer solution and protein extraction buffer (10 mM tris pH 7.4, 2% triton X 100, 1 mM PMSF, 1 μ l/ml protease inhibitors [Sigma]). Embryos were aspirated using a syringe and centrifuged 10 min at 10,000 g at 4 °C. The supernatant containing proteins was frozen at –80 °C. Proteins were quantified by Bradford method. 40 μ g of total protein were used for each group. 10% polyacrylamide SDS gels were used for TrkB detection and 15% for Bdnf. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with 5% milk in TBS. Mouse monoclonal primary antibodies were used at 1:500 dilution. Bdnf antibody was provided by Juan Carlos Arévalo and synthesized from the hybridoma clones obtained by Kolbeck et al. [27] (BDNF mAb #9, Developmental studies hybridoma bank). TrkB antibody (BD Biosciences) was a generous gift from Dr. Aránzazu Tabernero Urbieto (Institute of Neuroscience of Castilla y León, Salamanca, Spain). After incubation, membranes were washed with TBS containing 20% Tween 20 and incubated for 1 h with the goat anti-mouse IgG-HRP secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:1000. Blots were developed with ECL (Amersham). Actin (1:500) was used as loading control. Experiments were performed in quintuplicates and quantified with ImageJ software. Relative expression of the experimental groups was obtained by comparing to control group.

2.5. Quantitative real-time PCR analysis

Total RNA from zebrafish embryos was isolated using the Trizol reagent (Invitrogen), treated with DNase I (New England Biolabs) and a poly-A tailing reaction (New England Biolabs) was carried out following manufacturer's instructions. 2 μ g of total RNA was reverse transcribed with the M-MuLV Reverse Transcription Kit (New England Biolabs). To specifically amplify miRNAs, primers were designed as described by Balcells et al. [28]. Oligonucleotides sequences for miR-212 and miR-132 are shown in Table 2. The amplification reactions were carried out in 20 μ l final volume using Power SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) and the real-time polymerase chain reaction was performed using the ABI Prism 7300 Applied Biosystems (Applied Biosystems). Ct values were calculated with the SDS v1.3.1 software (Applied Biosystems) for each gene. Also, standard curves for each gene and negative controls were included in each PCR reaction. REST-384© v2 software was used to calculate the relative expression of groups respect to control embryos.

2.6. In silico prediction of miRNAs binding sites

miR-212 and miR-132 binding sites to the mRNA sequences of *bdnf* and *mecp2* were analyzed by multiple alignment software [29]. The binding sites predicted for *mecp2* third exon were studied with RNA folding program [30] to ensure the correct stability of the miRNA-mRNA duplex.

Table 1
Morpholino sequences for *oprm1* and miRNAs 212/132 knock-down.

Target gene	Morpholino sequence
<i>oprm1</i>	AATGTTGCCAGTGTITTCATCATG
dre-miR-132	ACAGTAACAATCTAATGCCACGGTC
dre-miR-212	AGCCATGACTGTAGACTGTTACTGT

Table 2
Primer sequences for qPCR amplification of dre-miR-132 and dre-miR-212.

Target gene	Forward	Reverse
dre-miR-132	AGTAAACAGTCTACAGCCATG	TCCATTTTTTTTTTTTTTTTGTGCG
dre-miR-212	CGCAGTAACAGTCTACAGTC	CCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCCAT

2.7. Cell culture

HEK293 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin, 0.1 mg ml⁻¹ streptomycin, sodium pyruvate 1 mM and NEAA 1 × (Gibco) at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% (v/v) CO₂ in a Forma incubator.

Cells were grown to 80% confluence, harvested in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 2 mM EDTA and collected by centrifugation at 500 g for 5 min.

2.8. Plasmid and constructs

pmirGLO Vector (Promega) was used to clone the *mecp2* target sequence. This plasmid contained the *luc2* gene (firefly luciferase) and hRluc-neo fusion (renilla luciferase) protein-coding region. Oligonucleotides containing *mecp2* third exon sequence were designed and annealed with the annealing GeneClip U1, Hairpin Cloning System (Promega), as described by the manufacturer's instructions. A mutated *mecp2* sequence (mismatch *mecp2*) was also designed as a control for Luciferase assay. The designed oligos are the following:

```
FwtMeCP2 5' CTAGCTAGGTACCTAGTCTGCTGAGAGACATTGTTTCG 3'
RwtMeCP2 5' TCGACGACAATGTCTCTCAGCACTAGGTACCTAG 3'
FmisMeCP2 5'CTAGCTAGGTACCTAGTCTGCTGAGAGCACGGATGCG 3'
RmisMeCP2 5'TCGACGCATCCGTGCTCTCAGCACTAGGTACCTAG 3'
```

Mutated nucleotides are shown in bold.

2.9. Luciferase assay

For chemiluminescence detection we used the Dual-luciferase® Reporter Assay (Promega). HEK293 cells were transfected with a wild-type and mutated construct using lipofectamine 2000® [31]. Briefly, 300 ng of reporter plasmid were diluted in 25 µl of pure DMEM in combination with 20 nM miRNAs mimic (Ambion) when required. This solution was combined with diluted Lipofectamine (1 µl/well) and the transfection was carried out for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. Luminescence was measured during 10 s as recommended by the manufacturer using a luminometer (Appliskan, Thermo Scientific). The ratio between luminescence from firefly and the control (*Renilla*) was used to check miRNAs binding to the target [32]. The mean for each group (n = 5) was calculated and compared to the wells transfected only with the empty plasmid (non target).

2.10. Primary neuron culture

Brains from 42 hpf zebrafish embryos were placed in 1 × E2 medium (15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 150 µM KH₂PO₄, 50 µM Na₂HPO₄, 1 mM CaCl₂, 0.7 mM NaHCO₃, 0.5 mg/l methylene blue) with 1 × tricaine as described by Chen et al. [33]. Briefly, cells were grown in Dulbecco's modified medium to 48 hpf. BDNF (50 ng/ml) and morphine (1 nM) were added after plating. 48 h later neurons were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (w/v).

2.11. Immunohistochemistry, immunocytochemistry and TUNEL assay

Immunohistochemical studies were performed on whole-mount embryos as described by Sanchez-Simon et al. [34]. Briefly, embryos were fixed in 4% (w/v) PFA (Sigma) in phosphate-buffered saline (PBS) overnight at 4 °C and stored in methanol (Sigma) at -20 °C for at least 1 day. After rehydration, a blocking step was carried out with 5% (v/v) goat serum (Sigma) in PBS. The rabbit anti-histone H3 (phospho Ser¹⁰) (Abcam) was used as primary antibody (1:500) and Alexa Fluor 594 conjugated anti-rabbit (LifeTechnologies) as secondary

antibody (1:1000). Cell nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Roche Applied Science) (1:1000).

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay was performed in *in toto* zebrafish embryos using the ApopTag® Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Millipore) and following the manufacturer's instructions. The reaction was developed with an anti-digoxigenin-fluorescein antibody (1:500, Roche).

Immunohistochemistry and TUNEL were both analyzed with an Olympus AX70 fluorescence microscope. Proliferative and apoptotic cells were quantified with ImageJ cell counter by using 10 slides from 3 embryos for each experimental group.

Immunocytochemistry analysis for primary cultured cells was done as described by Chen et al. [33]. Briefly, neurons were fixed with 4% PFA (w/v) for 20 min and blocked with antibody buffer and 5% goat serum; 1:250 dilution was used for TrkB antibody. To-PRO (1:1000, ThermoFisher) and Alexa fluor 594 Phalloidin (1:10, ThermoFisher) were used as nuclei and soma markers, respectively. Primary cultures were analyzed with a life cell microscopy (Zeiss).

2.12. Statistical analysis

The statistical analyses were performed with the Graphpad Prism (5.01) software.

3. Results

3.1. Changes in miR-212 and miR-132 after morphine exposure

To assess the expression of miR-212 and miR-132 and the changes exerted in both miRNAs by morphine through the activation of OPRM1, we studied 48 hpf zebrafish embryos. At this stage CNS formation is already completed allowing the possible changes triggered by drugs on this stage of zebrafish development to be studied. Four experimental groups were analyzed: control and morphine and/or naloxone treated embryos. In the control group, fish were grown in morphine-free medium whereas treated groups embryos were incubated with 10 nM morphine medium, 1 µM naloxone medium or both from 5 hpf (50% epiboly) up to 48 hpf. qPCR results (Fig. 1) showed detectable changes in the levels of miR-212 and miR-132 expression at 48 hpf, demonstrating a clear effect of morphine treatment. Morphine treated embryos decreased miR-212 levels as relatively compared to the control group. In contrast, 10 nM morphine exposure increased the expression of miR-132. The incubation with OPRM1 antagonist, naloxone, induced the opposite effect exerted by

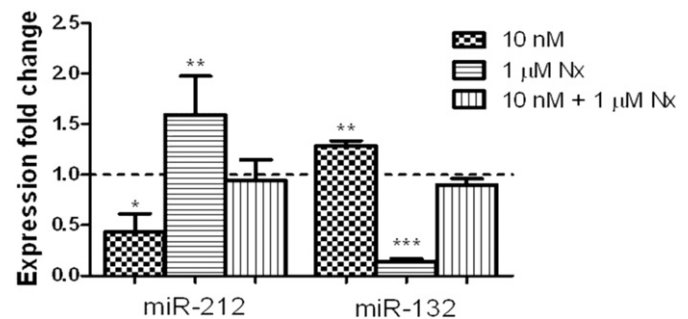


Fig. 1. Changes in the expression levels of miR-212 and miR-132 after 10 nM morphine, 1 µM naloxone and both, 10 nM morphine and 1 µM naloxone exposure. Significant changes were observed in both miRNAs. miR-212 levels decreased when embryos were exposed to 10 nM morphine. miR-132 expression levels were higher compared to miR-212 and control group. The opposite effect to the induced by morphine was observed after naloxone treatment. No changes were found after the incubation with both, morphine and naloxone. Relative expression fold-changes are represented comparing morphine treated groups to control embryos at 48 hpf (Dotted line). Results are shown as mean ± SEM (n = 3). *: statistical difference; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. 10 nM: 10 nM morphine exposure. 1 µM Nx: 1 µM naloxone exposure. 10 nM + 1 µM Nx: 10 nM morphine and 1 µM naloxone incubated at the same time in E3 medium.

morphine exposure, whereas both, morphine and naloxone treatment, did not change the levels of miR-212 and miR-132. These results show that morphine is changing the analyzed miRNAs by the specific activation of OPRM1.

3.2. Morphological effects of morphine exposure on CNS

Considering the above described changes, we analyzed the morphological consequences of these events. Since morphine has been reported to have effects on cell division and apoptosis [35,36], we performed proliferation and TUNEL assay. In these experiments, we also included knock-down embryos (morphants) by microinjecting morpholino sequences which targeted miR-212 and miR-132. The results obtained (Fig. 2A) revealed changes in the proliferative cells around the periventricular area which move to the midline after morphine exposure (Fig. 2A 1'–4'). These effects were not observed in miR-212 morphants. In contrast, when miR-212 morphants were exposed to morphine, we found that the normal localization of proliferative cells was altered in the analyzed areas (Fig. 2A 2'–5'). miR-132 loss-of-function induced similar effects to those observed in control embryos after morphine exposure. Morphine did not induce the same strong changes in the localization of the proliferative cells in miR-132 morphants (Fig. 2A 3'–6'). To determine whether these effects were induced by an increase or a reduction in the mitotic and apoptotic cell number, we quantified phospho-histone 3 and TUNEL positive cells around the periventricular area. As shown in

Fig. 2 (B–C), this quantification did not show significant changes in the studied groups.

3.3. Bdnf and TrkB expression analysis after morphine exposure and in miRNAs and oprm1 morphant embryos

The modification induced by morphine in the localization of mitotic cells at 48 hpf points to a possible role of neurotrophins in morphine effects. In this sense, we focused on Bdnf, the most important neurotrophin in CNS, and its receptor, TrkB. Despite the low expression observed for both proteins, western blot results revealed that the exposure to morphine significantly increases their levels (Fig. 3). As miR-212/132 cluster has been previously related to Bdnf pathway [37], we studied Bdnf and TrkB expression in miR-212 and miR-132 morphants. In addition, oprm1 morphants were also analyzed to assess if Oprm1 is one of the possible effectors in the changes induced by morphine in the expression of Bdnf. In all selected groups, we found a significant decrease of Bdnf expression (Fig. 4A). Differences between untreated and morphine treated groups were only observed in miR-212 morphants. When TrkB was analyzed, we observed higher levels in control embryos after knocking down miR-212 (Fig. 4B), whereas morphine treatment induced a decrease in the levels of this protein in those morphants. No significant changes could be observed in the expression levels of TrkB in miR-132 or oprm1 morphants. To verify whether these results were related to the real decrease of miR-212 and miR-132 expression, we analyzed their levels after morpholino

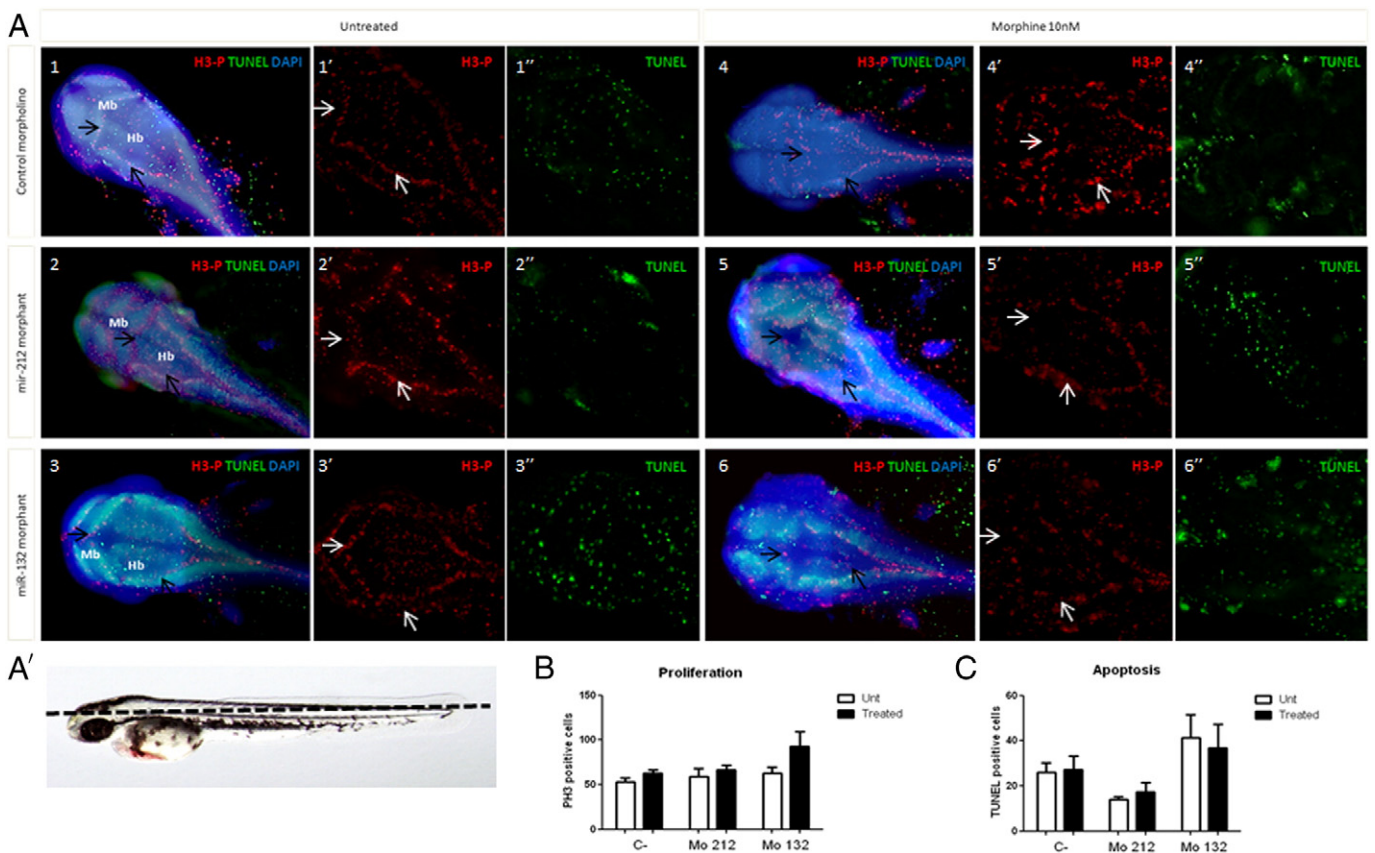


Fig. 2. Morphine effects on cell division and apoptosis after morphine exposure and knocking down miR-212 and miR-132. The mitotic marker phospho-histone 3 (H3-P) (red) and TUNEL technique (green) were used to determine whether morphine treatment (10 nM) alters proliferation and apoptosis in the CNS. Changes in the pattern of proliferation (Arrows) were observed between control (A: 1–3) and treated embryos (A: 4–6) at 48 hpf and miR-212 and miR-132 morphants (Enlarged in 1'–6'). Mitotic marker and TUNEL positive cells (Enlarged in 1''–6'') were quantified around the periventricular area and the midbrain-hindbrain boundary (Squared area) (B–C) (n = 3). Cells nuclei were stained with DAPI (blue). Embryos are oriented anterior toward the left and posterior toward the right (A'). Mb: Midbrain. Hb: Hindbrain. Mo: Morphant. Unt: Untreated embryos. Treated: 10 nM morphine treated embryos.

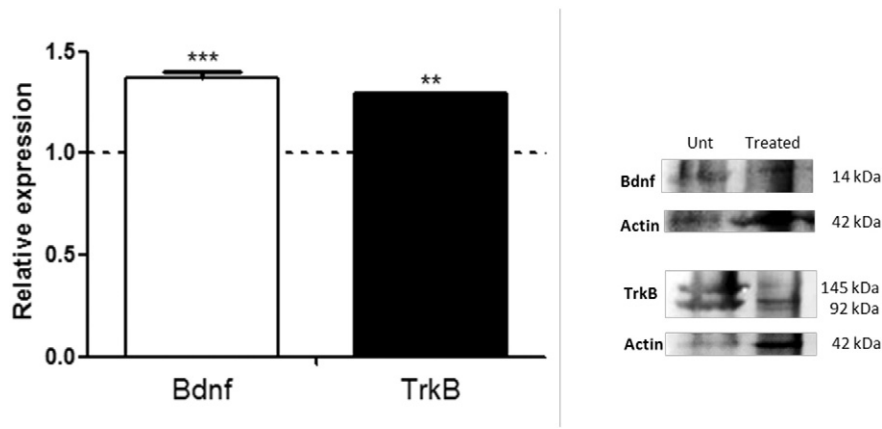


Fig. 3. Bdnf and TrkB protein expression at 48 hpf in 10 nM morphine treated embryos. The effects of morphine on Bdnf and TrkB expression were measured by western blot. Both proteins levels increased when zebrafish embryos were exposed to morphine (10 nM) as compared with an untreated group (Dotted line). Bdnf protein was detected at 14 kDa and TrkB at 92 and 145 kDa. Actin was used as a loading control. Results are shown as mean \pm SEM (n = 5). *: Statistical significance; **p < 0.01, ***p < 0.001. Unt: Untreated embryos. Treated: 10 nM morphine treated embryos.

microinjection (Fig. 4C). With these experiments we proved that morpholino sequences are actually decreasing the expression of miRNAs.

3.4. miR-212 and miR-132 regulation of *mecp2* mRNA sequence

Despite the changes observed in Bdnf after knocking down miR-212 and miR-132, our *in silico* studies did not show a possible binding site for these miRNAs on the zebrafish *bdnf* sequence. Nevertheless, Bdnf expression is inhibited by MeCP2, which was firstly identified as an epigenetic factor which binds to methylated DNA, avoiding its

transcription [16]. New bioinformatic predictions showed a target region for both miRNAs in the third exon of the *mecp2* sequence (Fig. 5A and B). As this binding site has not yet been experimentally proven, we carried out a luciferase assay in order to confirm the possible regulation of miR-212 and miR-132 on *mecp2* gene expression. One group of HEK 293 cells was transfected with a plasmid containing the *mecp2* target sequence (wild-type), while the other was transfected with the mutated *mecp2* target sequence (mismatch) (Fig. 5C) to discard a possible binding of miR-212 and miR-132 to other regions within the sequence analyzed. Finally, we included

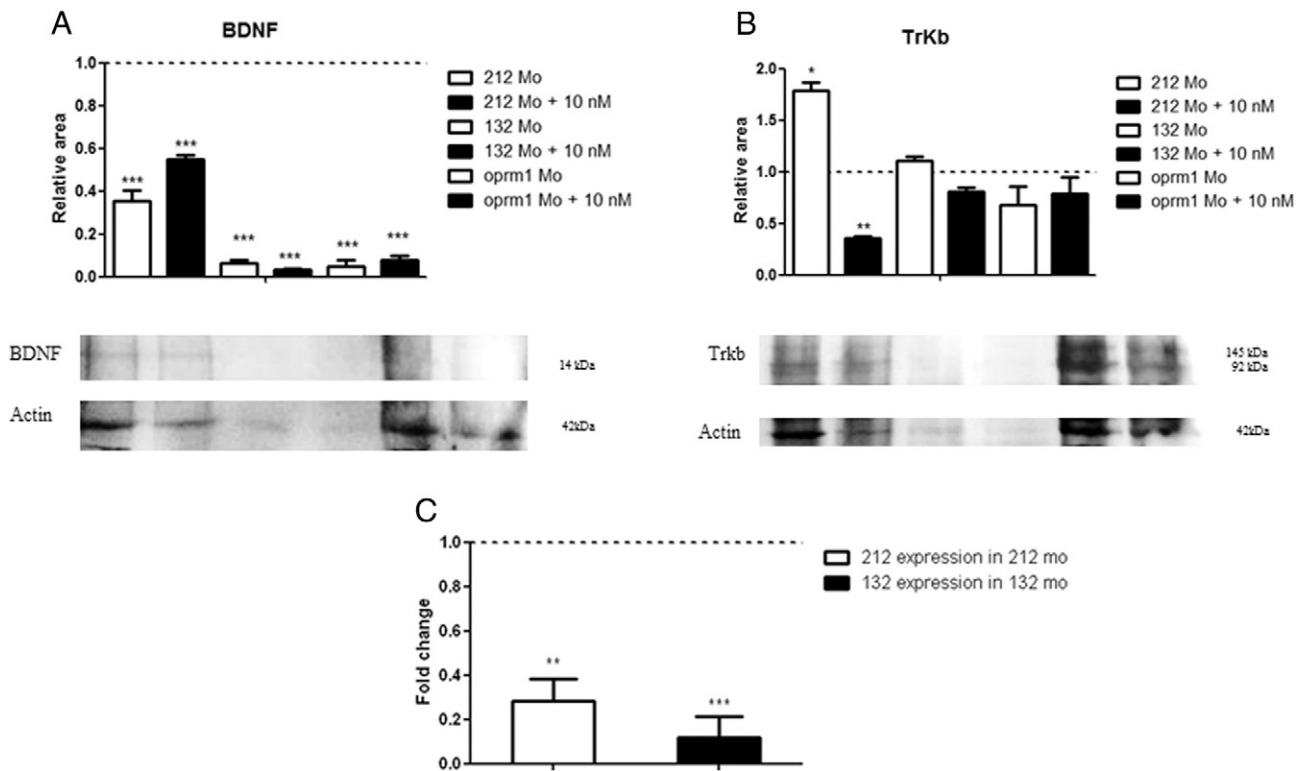


Fig. 4. Bdnf and TrkB protein expression at 48 hpf zebrafish embryos in miRNAs 212/132 and oprm1 morphants and morpholino effect on miRNAs expression. Effects of morphine and miRNAs 212/132 and oprm1 morpholino microinjection on Bdnf and TrkB expression were measured by western blot and compared to the control group (Dotted line). Bdnf expression decreased after knocking down both miRNAs and *oprm1* (A). TrkB levels were higher as compared with the control group in miR-212 untreated morphants (B). miR-212 10 nM morphine exposed embryos showed a decrease in this protein. Actin was used as a loading control. Bdnf protein was detected at 14 kDa and TrkB at 92 and 145 kDa. To ensure the correct downregulation of miR-212 and miR-132 their levels were studied by qPCR after morpholino microinjection (C), showing a clear decrease in their expression induced by this technique. Results are shown as mean \pm SEM (n = 5). *: statistical significance; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Mo: Morphant. Unt: Untreated embryos. Treated: 10 nM morphine treated embryos.

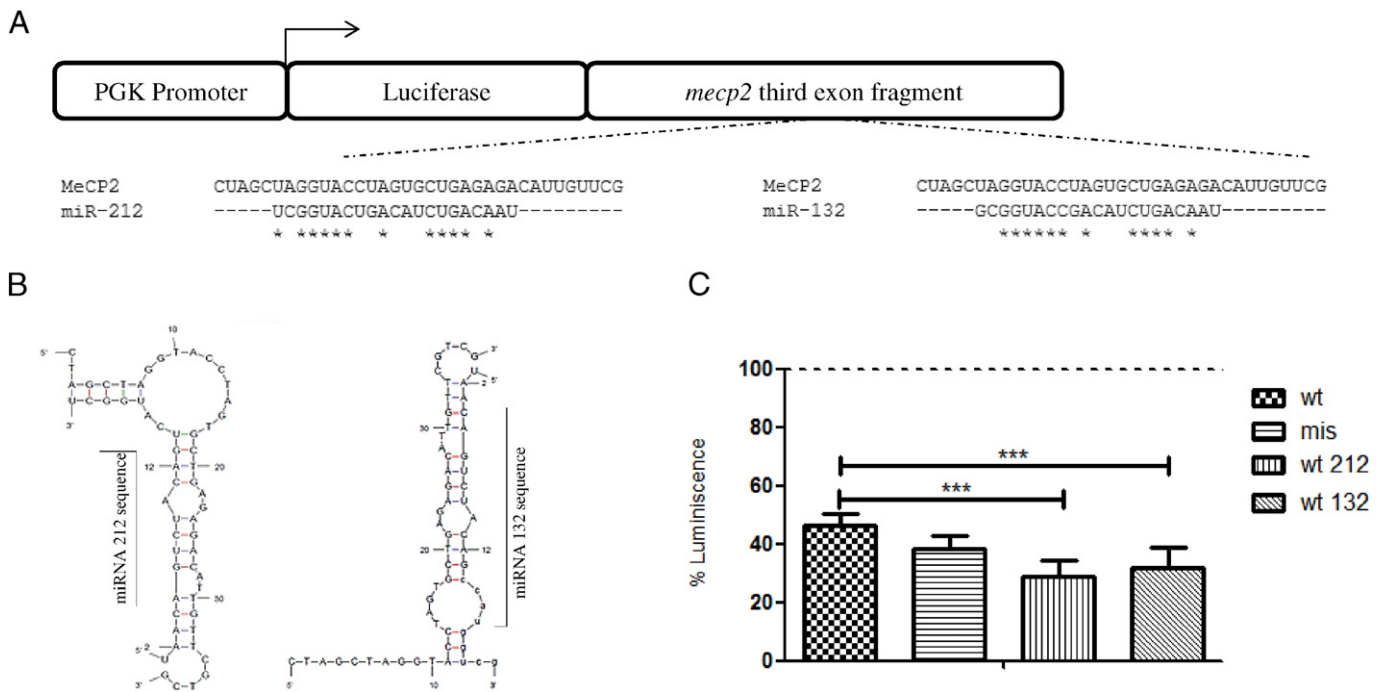


Fig. 5. Regulation of zebrafish *mecp2* by miR-212 and miR-132. miR-212 and miR-132 binding to *mecp2* third exon was studied by bioinformatic predictions (A–B). Schematic representation of the sequence elements predicted to be bound by miR-212 and miR-132 in the *mecp2* wild type fragment (A). miRNAs binding were studied by Mfold hybridization analysis (B). Luciferase assay was performed to verify this binding (C). Significant changes were found between the group containing wild-type *mecp2* target sequence and those which also had been transfected with miR-212 and miR-132 mimics. No significant changes were found between the mutated and wild type constructs. Reporter expression is shown relative to an empty plasmid transfected group (Dotted line). Error bars denote mean \pm SEM (n = 5). *: statistical significance; ***p < 0.001. PGK: Human phosphoglycerate kinase; Wt: Wild-type *mecp2* sequence; Mis: Mutant (mismatch) *mecp2* sequence transfected cells; Wt 212: Wild-type *mecp2* sequence and miR-212 mimic. Wt 132: Wild-type *mecp2* sequence and miR-132 mimic.

two more groups containing the wild-type *mecp2* construct and miRNAs 212/132 mimics to overexpress both miRNAs. When the luciferase assay was analyzed, a significant reduction in the luciferase chemiluminescence was found in the mimics group compared to the control situation (Fig. 5C) but not with the mismatch group. This decrease in chemiluminescence in the miRNAs mimic groups proves that miR-212 and miR-132 bind to the predicted target sequence included in the luciferase plasmid.

3.5. Analysis of *TrkB* expression and cell aggregation after morphine and *Bdnf* exposure. Effects in a primary neuron culture

The results provided here are related to changes in the CNS in general. Since this system is formed by a wide range of cell populations, we obtained a primary neuron culture from zebrafish embryos to ensure that the effects observed after morphine exposure were taking place in neurons (Fig. 6). Cells were analyzed in control and BDNF (50 ng/ μ l) medium. In addition, both groups were also exposed to 1 nM morphine. An immunocytochemistry against *TrkB* revealed changes in its expression under these conditions. This protein was expressed in more restricted areas of the neuronal soma in 1 nM morphine treated cells (Fig. 6B) as compared to control group (Fig. 6A). BDNF medium induced the increase of *TrkB* expression around cell somas (Fig. 6C). Moreover, morphine exposure enhanced the effect induced by BDNF, rising *TrkB* expression and neuronal aggregation (Fig. 6D). These data confirm that the changes observed in cell localization (Fig. 2A) and *TrkB* expression (Fig. 3) are related to the effects of morphine in neurons.

4. Discussion

In the present study, we provide the first evidence that morphine triggers changes in the expression of miR-212 and miR-132 in zebrafish

at 48 hpf. The levels of miR-212 exhibited a downregulation after morphine exposure while miR-132 increased as compared to the untreated group. Both miRNAs belong to the same genetic cluster [38] and it has been reported that clustered miRNAs are usually equally regulated [39]. Despite this fact, this is not our case since miR-212 and miR-132 levels change in opposite ways after morphine exposure. Several authors have described that miR-212 and miR-132 transcription is regulated by CREB in mammals and this regulation is evolutionary conserved [37,40]. Morphine triggers several pathways that activate CREB by binding to ORPM1 [41]. Hence, we extrapolate that this response to CREB also occurs in our model as our naloxone experiments have proved that morphine is only exerting changes in miR-212 and miR-132 through OPRM1 activation.

Looking for the morphological consequences of the results obtained after morphine exposure, we analyzed its effects on CNS since this drug produces diverse changes as for example on cell proliferation [42,43]. We have previously shown that zebrafish midbrain, hindbrain and periventricular area are related to the opioid system [44]; hence, our analysis was focused on these regions. The results described here prove that there is a change in the localization of the proliferative cells around the midline after morphine exposure. We only observed similar changes in miR-132 knock-down embryos. When cell proliferation and apoptosis were quantified, only miR-132 morphants showed a tendency to change after morphine exposure. This relationship between miR-132 and proliferative cell number has already been described by other authors in pathologies like hepatocellular carcinoma or lung cancer in which miR-132 affects cell proliferation [45,46]. Nevertheless, these changes in proliferative and apoptotic cell number were not statistically significant showing that, at this stage, morphine only exerts an influence in the localization of the proliferative cells in CNS but not in their number, and miR-212 and miR-132 are involved in these effects.

In light of these results, we focused on neurotrophins as possible effectors of morphine-induced changes during cell proliferation.

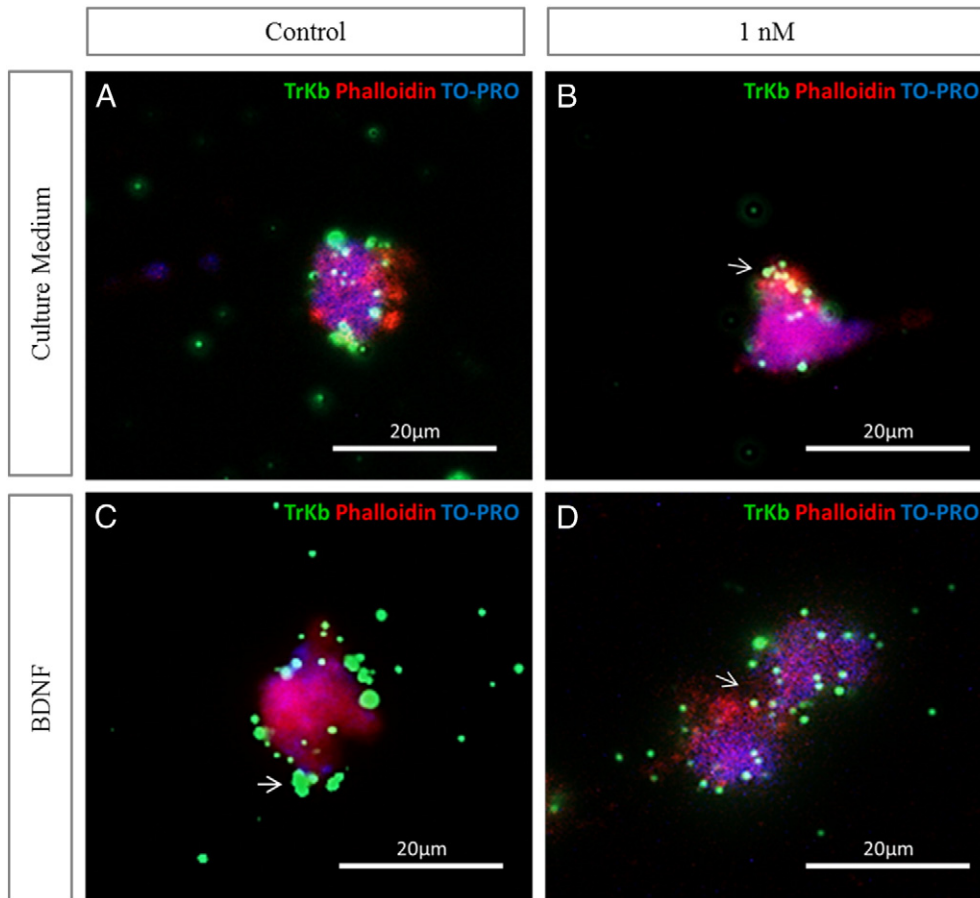


Fig. 6. Morphine and BDNF effects in zebrafish primary neuron culture. The immunostaining confirmed TrkB expression in zebrafish primary neuron culture. Morphine exposure (1 nM) induced the formation of aggregates between cells as similar to the effects observed after BDNF (50 µg/µl) incubation. TrkB (green) was found in neuronal somas (red) in those groups grown only in cell culture medium. BDNF and morphine exposure increased TrkB expression and cell aggregation (Arrows). Alexa 594 phalloidin (red) was used to counterstain cells somas. Nuclei were stained with TO-PRO (blue).

Neurotrophins have been shown to control neuronal plasticity and cell survival and differentiation [47]. Besides BDNF is the most abundant protein of this group in the CNS. Also, De Felice et al. [48] have described the expression of Bdnf in the developing zebrafish brain. BDNF and TrkB have been previously reported to be modulated by morphine in murine models [49,50]. Nevertheless, no report about morphine effects on these proteins in zebrafish has been published. In this sense, we confirm here that morphine exposure increases Bdnf and TrkB expression in zebrafish embryos.

To verify that the changes induced by morphine on miR-212 and miR-132 have an effect on Bdnf, both miRNAs were knocked down. The observed differences confirm that miR-132 has a higher effect in the regulation of BDNF and in the changes induced by morphine. Despite these data, our analysis of miRNAs morphants showed clear evidence that miR-212 and miR-132 are not the only molecules involved in the effects of morphine on Bdnf regulation since we could not totally suppress its expression. Due to the several reports that confirm the effects of morphine on Oprm1 expression [51–53], we analyzed *oprm1* morphants. Our results show that *oprm1*-loss-of-function decreases Bdnf expression. This effect is stronger than the one observed in miR-212 morphants and is similar to that induced by miR-132 knock-down group. According to these changes, Oprm1 exerts a direct regulation on Bdnf expression, suggesting that it is a regulator between the opioid system and neurotrophins. This result is not surprising since other G-protein-coupled receptors like CB1 have been already shown as regulators of BDNF [54]. In contrast, TrkB protein levels were only altered in miR-212 morphants which indicates that miR-212 regulates TrkB and is necessary for the normal expression of this receptor. This

regulation may be indirect due to the lack of a binding site for miR-212 within the *trkb* sequence confirmed by bioinformatic predictions (data not shown).

The binding region of miRNAs has been highlighted as a key factor for the posterior processing of their target [55,56]. Nevertheless, the absence of a binding site for miR-212 and miR-132 in the mRNA sequence of *bdnf* suggest the existence of an intermediate regulator of this protein to which miRNAs 212/132 are binding. Thus, we analyzed the relationship between miR-212 and miR-132 and *mecp2* as it has been already confirmed as an inhibitor of BDNF expression [16]. Our *in silico* studies revealed a binding site for both miRNAs in the third exon of the zebrafish *mecp2* sequence, which we confirmed by a luciferase assay. miRNAs binding to exons leads to the degradation of the targeted mRNA [56]. The fact that both miRNAs are inhibiting the zebrafish *mecp2* gene explains the higher levels of Bdnf after morphine exposure. We have observed that morphine enhances miR-132 expression but not miR-212; hence miR-132 may have a higher effect on *mecp2* inhibition after morphine exposure.

Since we have found differences in cell localization in our *in toto* experiments, we obtained a primary neuron culture from zebrafish embryos to confirm that the effects triggered by morphine are neuron-related. The expression of TrkB increased around the soma when morphine was added to the medium in this primary culture. This increment in the levels of the receptor was also observed by western blot analysis and may be related to the decrease induced by morphine in miR-212 levels since we have proven that its absence deregulates the normal expression of TrkB. As we have demonstrated that morphine increases the expression of Bdnf, we analyzed the effects

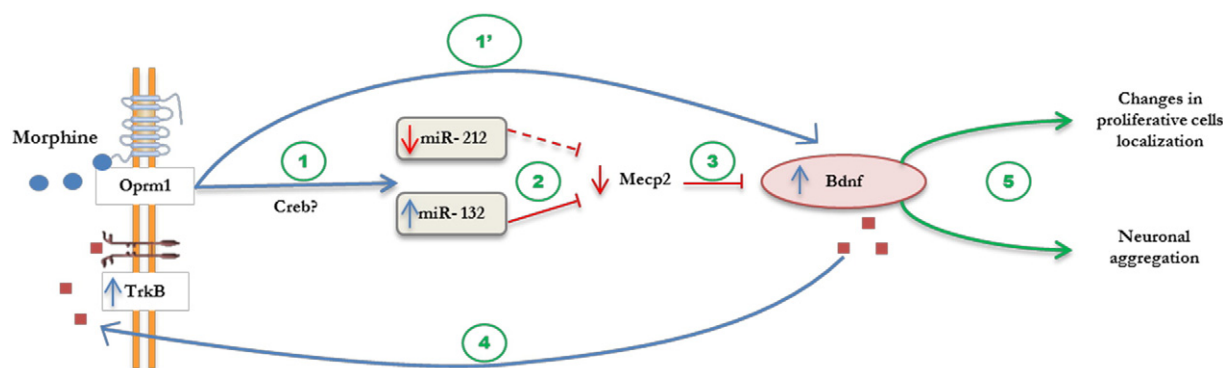


Fig. 7. Proposed mechanism for morphine effects during zebrafish CNS development. The activation of Oprm1 by morphine leads to changes in miR-212 and miR-132 through Creb regulation at 48 hpf (1). Since both miRNAs are negative regulators of Mecp2, its expression is downregulated (2). At this stage, miR-132 has a greater effect on this regulation since its expression is upregulated by morphine (Full line) compared to miR-212 (Dotted line). Mecp2 has been described as an inhibitor of BDNF and therefore, the lower levels of Mecp2 lead to the increase of Bdnf (3). Due to the increment in the expression of its ligand, TrkB is also upregulated (4). The alterations induced in Bdnf have morphological consequences resulting in changes in the localization of proliferative cells and neuronal aggregation (5). In parallel to these changes, we have also described a direct regulation of morphine effects in Bdnf through Oprm1 (1'). Blue lines indicate a stimulatory effect and red lines indicate an inhibitory effect. Oprm1: Mu opioid receptor; TrkB: Tyrosine kinase receptor B; Creb: cAMP response element binding protein; Mecp2: methyl CpG binding protein 2; Bdnf: Brain derived neurotrophin.

of exogenous BDNF in a group of neurons in order to mimic the effects induced by morphine. BDNF exposure increased TrkB expression although we observed more defined effects when cells were incubated with both morphine and BDNF. In this latter experimental group, we observed changes in TrkB expression and cellular aggregation. These effects prove that morphine is able to induce modifications in the localization of neurons, similar to the observed changes in the *in toto* study. Based on these results, we can conclude that the molecular changes induced by morphine during neuronal formation may alter several important systems, as shown in previous works from our group [34,57].

In the present work, we demonstrate that miR-212, miR-132 and Oprm1 are novel regulators that relate the opioid and neurotrophin pathways. Although several authors have already proposed a negative regulation of BDNF expression after morphine exposure [49,58], with this study we show that morphine is an enhancer of Bdnf expression and properties at this stage of zebrafish development (48 hpf). This difference lies not only in the stages analyzed but also in the drug administration paradigm used.

Considering our findings, we propose a mechanism (Fig. 7) by which the activation of Oprm1 by morphine leads to changes in miR-212 and miR-132 through Creb regulation (Fig. 7-1) [37,40]. Additionally, miR-212 and miR-132 are regulators of *mecp2*, which has been described as an inhibitor of BDNF [16] (Fig. 7-2). Therefore, the changes triggered by morphine in both miRNAs increase the expression of Bdnf (Fig. 7-3). This rise in Bdnf expression is mainly exerted by miR-132 since morphine upregulates its expression at 48 hpf while miR-212 is downregulated, pointing to a higher relevance of miR-132 at this stage. Consequently, after the increment of Bdnf, TrkB expression increases (Fig. 7-4), as previously described by Ji et al. [59]. Nevertheless, Oprm1 is also directly involved in Bdnf regulation as *oprm1* knock-down embryos drastically decreased their expression of Bdnf (Fig. 7-1').

The relevance of this mechanism lies in the influence of morphine in Bdnf which has effects in proliferative cells localization and neuronal aggregation (Fig. 7-5). This influence is exerted through the alteration of miR-212 and miR-132 and negatively affects the normal development of the CNS. The avoidance of the side effects induced by morphine in early development has been under study during the last years [60] since prenatal exposition to opioids is common, as occurs in pregnant drug abusers [61]. Thus, the implication of these miRNAs in the effects of morphine makes them novel targets for the possible regulation of the changes triggered by its exposure and opens a new door to a deeper knowledge in the control of the effects of morphine.

5. Conclusions

Morphine affects the normal proliferative cell localization in CNS and miR-212 and miR-132 are involved in these changes. These effects are induced by changes in Bdnf expression which is controlled through *mecp2* inhibition by miR-212 and miR-132. Oprm1 is also a direct regulator of Bdnf expression. These findings provide novel data about the changes produced by morphine on CNS and point to miRNAs 212/132 as possible targets as negative effectors of its effects.

Conflict of interest

This manuscript presents no conflict of interest.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This work was supported by the grant from Ministerio Español de Economía y Competitividad (SAF 2013-48776-P) and Junta de Castilla y León (SA106UIH). We thank Dr. Aránzazu Tabernero Urbieto (INCYL, Spain) for the anti-TrkB antibody.

References

- [1] M. Narita, Y. Kishimoto, Y. Ise, Y. Yajima, K. Misawa, T. Suzuki, Direct evidence for the involvement of the mesolimbic [kappa]-opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state, *Neuropsychopharmacology* 30 (2005) 111–118.
- [2] A. Fodor, J. Timár, D. Zelena, Behavioral effects of perinatal opioid exposure, *Life Sci.* 104 (2014) 1–8.
- [3] S.J. Friedrichsdorf, A. Postier, Management of breakthrough pain in children with cancer, *J. Pain Res.* 7 (2014) 117–123.
- [4] A. Barrallo, R. Gonzalez-Sarmiento, F. Alvar, R.E. Rodriguez, ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*), *Brain Res. Mol. Brain Res.* 84 (2000) 1–6.
- [5] R.E. Rodriguez, A. Barrallo, F. Garcia-Malvar, I.J. McFadyen, R. Gonzalez-Sarmiento, J.R. Traynor, Characterization of ZFOR1, a putative delta-opioid receptor from the teleost zebrafish (*Danio rerio*), *Neurosci. Lett.* 288 (3) (2000) 207–210 (Jul 21).
- [6] F.A. Alvarez, I. Rodriguez-Martin, V. Gonzalez-Nunez, E. Marron Fernandez de Velasco, R. Gonzalez Sarmiento, R.E. Rodriguez, New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*, *Neurosci. Lett.* 405 (2006) 94–99.
- [7] N. Pinal-Seoane, I.R. Martin, V. Gonzalez-Nunez, E. Marron Fernandez de Velasco, F.A. Alvarez, R.G. Sarmiento, R.E. Rodriguez, Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish, *J. Mol. Endocrinol.* 37 (3) (Dec. 2006) 391–403.
- [8] R.C. Lee, R.L. Feinbaum, V. Ambros, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell* 75 (1993) 843–854.

- [9] G. Easow, A.A. Teleman, S.M. Cohen, Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification, *RNA* 13 (2007) 1198–1204.
- [10] I. Elcheva, S. Goswami, F.K. Noubissi, V.S. Spiegelman, CRD-BP protects the coding region of β -TrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation, *Mol. Cell* 35 (2009) 240–246.
- [11] K. Varendi, A. Kumar, M.-A. Harma, J.-O. Andressoo, miR-1, miR-10b, miR-155, and miR-191 are novel regulators of BDNF, *Cell. Mol. Life Sci.* 71 (2014) 4443–4456.
- [12] D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 116 (2004) 281–297.
- [13] M. Esteller, Non-coding RNAs in human disease, *Nat. Rev. Genet.* 12 (2011) 861–874.
- [14] P. Bali, P.J. Kenny, MicroRNAs and drug addiction, *Front. Genet.* 4 (2013) 43.
- [15] K.F. Hansen, K. Sakamoto, G.A. Wayman, S. Impey, K. Obrietan, Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory, *PLoS One* 5 (2010), e15497.
- [16] J.A. Hollander, H.-I. Im, A.L. Amelio, J. Kocerha, P. Bali, Q. Lu, D. Willoughby, C. Wahlestedt, M.D. Konkright, P.J. Kenny, Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signaling, *Nature* 466 (2010) 197–202.
- [17] H.-I. Im, J.A. Hollander, P. Bali, P.J. Kenny, MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212, *Nat. Neurosci.* 13 (2010) 1120–1127.
- [18] K.F. Meza-Sosa, D. Valle-García, G. Pedraza-Alva, L. Pérez-Martínez, Role of microRNAs in central nervous system development and pathology, *J. Neurosci. Res.* 90 (2012) 1–12.
- [19] R. Yoshimura, M. Mitoma, A. Sugita, H. Hori, T. Okamoto, W. Umene, N. Ueda, J. Nakamura, Effects of paroxetine or milnacipran on serum brain-derived neurotrophic factor in depressed patients, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 31 (2007) 1034–1037.
- [20] A. Yoshii, M. Constantine-Paton, Post-synaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity and disease, *Dev. Neurobiol.* 70 (2010) 304–322.
- [21] T. Numakawa, E. Suzuki, S. Fau - Kumamaru, N. Kumamaru, E. ffau - Adachi, M. Adachi, N. Fau - Richards, H. Richards, M. Fau - Kunugi, H. Kunugi, BDNF function and intracellular signaling in neurons, *Histol. Histopathol.* 25 (2) (2010) 237–258.
- [22] B. Lu, BDNF and activity-dependent synaptic modulation, *Learn. Mem.* 10 (2003) 86–98.
- [23] B. Lu, P.T. Pang, N.H. Woo, The yin and yang of neurotrophin action, *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (2005) 603–614.
- [24] M. Barbacid, The Trk family of neurotrophin receptors, *J. Neurobiol.* 25 (11) (1994) 1386–1403 Nov. (25 (1994) 1386–1403).
- [25] G. Heinrich, T. Lum, Fish neurotrophins and trk receptors, *Int. J. Dev. Neurosci.* 18 (2000) 1–27.
- [26] C.B. Kimmel, W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, T.F. Schilling, Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev. Dyn.* 203 (1995) 253–310.
- [27] R. Kolbeck, I. Bartke, W. Eberle, Y.-A. Barde, Brain-derived neurotrophic factor levels in the nervous system of wild-type and neurotrophin Gene Mutant Mice, *J. Neurochem.* 72 (1999) 1930–1938.
- [28] I. Balcells, S. Cirera, P.K. Busk, Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers, *BMC Biotechnol.* 11 (2011).
- [29] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (3) (1990) 403–410 (1990 Oct 5).
- [30] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3406–3415.
- [31] A. de Chevigny, N. Core, P. Follert, M. Gaudin, P. Barbry, C. Beclin, H. Cremer, miR-7a regulation of Pax6 controls spatial origin of forebrain dopaminergic neurons, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 1120–1126.
- [32] D.W. Thomson, C.P. Bracken, G.J. Goodall, Experimental strategies for microRNA target identification, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 6845–6853.
- [33] Z. Chen, H. Lee, S.J. Henle, T.R. Cheever, S.C. Ekker, J.R. Henley, Primary neuron culture for nerve growth and axon guidance studies in zebrafish (*Danio rerio*), *PLoS One* 8 (2013), e57539.
- [34] F.M. Sanchez-Simon, F.J. Arenzana, R.E. Rodriguez, In vivo effects of morphine on neuronal fate and opioid receptor expression in zebrafish embryos, *Eur. J. Neurosci.* 32 (2010) 550–559.
- [35] D. Willner, A. Cohen-Yeshurun, A. Avidan, V. Ozersky, E. Shohami, R.R. Leker, Short term morphine exposure in vitro alters proliferation and differentiation of neural progenitor cells and promotes apoptosis via Mu receptors, *PLoS One* 9 (2014), e103043.
- [36] S. Bimonte, A. Barbieri, D. Rea, G. Palma, A. Luciano, A. Cuomo, C. Arra, F. Izzo, Morphine promotes tumor angiogenesis and increases breast cancer progression, *Biomed. Res. Int.* (2015) 8 (2015).
- [37] A. Wanet, A. Tacheny, T. Arnould, P. Renard, miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 4742–4753.
- [38] R. Kumarswamy, I. Volkmann, J. Beermann, L.C. Napp, O. Jabs, R. Bhayadia, A. Melk, A. Ucar, K. Chowdhury, J.M. Lorenzen, S.K. Gupta, S. Batkai, T. Thum, Vascular importance of the miR-212/132 cluster, *Eur. Heart J.* 35 (2014) 3224–3231.
- [39] S. Schmeier, C. MacPherson, M. Essack, M. Kaur, U. Schaefer, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, V. Bajic, Deciphering the transcriptional circuitry of microRNA genes expressed during human monocytic differentiation, *BMC Genomics* 10 (2009) 595.
- [40] J. Remyeni, C.J. Hunter, C. Cole, H. Ando, S. Impey, C.E. Monk, K.J. Martin, G.J. Barton, G. Hutvagner, J.S.C. Arthur, Regulation of the miR-212/132 locus by MSK1 and CREB in response to neurotrophins, *Biochem. J.* 428 (2010) 281–291.
- [41] E.J. Nestler, Historical review: molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction, *Trends Pharmacol. Sci.* 25 (2004) 210–218.
- [42] M. Korostynski, M. Piechota, D. Kaminska, W. Solecki, R. Przewlocki, Morphine effects on striatal transcriptome in mice, *Genome Biol.* 8 (2007).
- [43] I. Berrios, C. Castro, D.P. Kuffler, Morphine: axon regeneration, neuroprotection, neurotoxicity, tolerance, and neuropathic pain, *P. R. Health Sci. J.* 27 (2) (2008) 119–128 Jun. (27 (2008) 119–128).
- [44] R. López-Bellido, K. Barreto-Valer, F.M. Sánchez-Simón, R.E. Rodríguez, Cocaine modulates the expression of opioid receptors and miR-let-7d in zebrafish embryos, *PLoS One* 7 (2012), e50885.
- [45] K. Liu, X. Li, Y. Cao, Y. Ge, J. Wang, B. Shi, miR-132 inhibits cell proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma by targeting PIK3R3, 2015, <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2015.3112>.
- [46] X. Liu, S. Yan, C. Pei, Y. Cui, Decreased microRNA-132 and its function in human non-small cell lung cancer, *Mol. Med. Rep.* 11 (2015) 3601–3608.
- [47] S.D. Skaper, S. Skaper, The Neurotrophin Family of Neurotrophic Factors: An Overview, *Neurotrophic Factors*, vol. 846, Humana Press, 2012 1–12.
- [48] E. De Felice, I. Porreca, E. Alleva, P. De Girolamo, C. Ambrosino, E. Ciriaco, A. Germanà, P. Sordino, Localization of BDNF expression in the developing brain of zebrafish, *J. Anat.* 224 (2014) 564–574.
- [49] J. Lunden, L.G. Kirby, Opiate exposure and withdrawal dynamically regulate mrna expression in the serotonergic dorsal raphe nucleus, *Neuroscience* 254 (2013) 10.1016.
- [50] J.R. Rozisky, G. Laste, I.C. de Macedo, V.S. Santos, R. Krolow, C. Noschang, C. Vanzella, K. Bertoldi, G.A. Lovatel, I.C.C. de Souza, I.R. Siqueira, C. Dalmaiz, W. Caumo, I.L.S. Torres, Neonatal MORPHINE ADMINISTRATION leads to changes in hippocampal BDNF levels and antioxidant enzyme activity in the adult life of rats, *Neurochem. Res.* 38 (2013) 494–503.
- [51] R.V. Prenus, E. Luscar, Z.-P. Zhu, R.B. Badisa, C.B. Goodman, Regulation of mammalian MOR-1 gene expression after chronic treatment with morphine, *Int. J. Mol. Med.* 30 (2012) 1493–1497.
- [52] Z.-P. Zhu, R.B. Badisa, D.E. Palm, C.B. Goodman, Regulation of rat MOR-1 gene expression after chronic intracerebroventricular administration of morphine, *Mol. Med. Rep.* 5 (2012) 513–516.
- [53] Z. Lu, J. Xu, M. Xu, G.W. Pasternak, Y.-X. Pan, Morphine regulates expression of μ -opioid receptor MOR-1 A, an intron-retention carbonyl terminal splice variant of the μ -opioid receptor (OPRM1) gene via miR-103/miR-107, *Mol. Pharmacol.* 85 (2014) 368–380.
- [54] C. Blazquez, A. Chiarlone, L. Bellocchio, E. Resel, P. Pruunsild, D. Garcia-Rincon, M. Sendtner, T. Timmusk, B. Lutz, I. Galve-Roperh, M. Guzman, The CB1 cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway, *Cell Death Differ.* 22 (2015) 1618–1629.
- [55] Z. Fang, N. Rajewsky, The impact of miRNA target sites in coding sequences and in 3'UTRs, *PLoS One* 6 (2011), e18067.
- [56] O. Berillo, A. Issabekova, M. Regnier, A. Ivashchenko, Characteristics of binding sites of intergenic, intronic and exonic miRNAs with mRNAs of oncogenes coding intronic miRNAs, *Afr. J. Biotechnol.* 12 (2013) 1016–1024 (Academic Journals).
- [57] F.M. Sanchez-Simon, X.X. Zhang, H.H. Loh, P.-Y. Law, R.E. Rodriguez, Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b, *Mol. Pharmacol.* 78 (2010) 935–942.
- [58] A. Ahmadiipour, J. Sadeghzadeh, A.A. Vafaei, A.R. Bandegi, R. Mohammadkhani, A. Rashidy-Pour, Effects of environmental enrichment on behavioral deficits and alterations in hippocampal BDNF induced by prenatal exposure to morphine in juvenile rats, *Neuroscience* 305 (2015) 372–383.
- [59] Y. Ji, Y. Lu, F. Yang, W. Shen, T.T.-T. Tang, L. Feng, S. Duan, B. Lu, Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons, *Nat. Neurosci.* 13 (2010) 302–309.
- [60] M.J. Ghalipour, S. Ghafari, S.K. Kafshgiri, M.H. Moghadam, A.R. Moharri, Effect of maternal morphine sulfate exposure on neuronal plasticity of dentate gyrus in Balb/c mice offspring, *Pak. J. Biol. Sci.* 16 (6) (2013) 281–286 (2013 Mar 15).
- [61] M.E. Kremer, K.S. Arora, Clinical, Ethical, and Legal Considerations in Pregnant Women with Opioid Abuse, 2015.

Anexo 12. Otros artículos y proyectos en los que la autora ha participado durante el periodo de desarrollo de esta Tesis Doctoral no incluidos en la memoria de la misma.

Gonzalez-Nunez V, Jimenez Gonzalez A, Barreto-Valer K, Rodriguez RE. In vivo regulation of the mu opioid receptor: role of the endogenous opioid agents. *Molecular medicine*. 2013;19:7-17. PubMed PMID: 23348513. Pubmed Central PMCID: PMC3592933. Epub 2013/01/26. eng.

Chiarlone A, Borner C, Martin-Gomez L, Jimenez-Gonzalez A, Garcia-Concejo A, Garcia-Bermejo ML, et al. MicroRNA let-7d is a target of cannabinoid CB1 receptor and controls cannabinoid signaling. *Neuropharmacology*. 2016 Sep;108:345-52. PubMed PMID: 27179908. Epub 2016/05/18. eng.

Garcia-Concejo A, Jimenez-Gonzalez A, Rodriguez RE. mu Opioid Receptor Expression after Morphine Administration Is Regulated by miR-212/132 Cluster. *PloS one*. 2016;11(7):e0157806. PubMed PMID: 27380026. Pubmed Central PMCID: PMC4933400. Epub 2016/07/06. eng.

Durante el último año y medio he compaginado mi trabajo de Tesis Doctoral con la realización del proyecto CARDioToxicity In the Elderly pRogrammmme: The CARTIER Project, financiado por el Instituto de Salud Carlos III en el que la Directora de esta Tesis, Profesora Raquel E. Rodríguez, participa como segundo investigador del proyecto. El trabajo que he realizado, a tiempo parcial, ha sido financiado por este proyecto.