

# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



**UNIVERSIDAD  
DE SALAMANCA**

**Influencia de la cocaína en la expresión de receptores  
relacionados al dolor: receptores opioides y receptores  
de la sustancia P**

**Roger López Bellido**

**2012**



# **UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

## **INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN**



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**



**INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN**

### **Influencia de la cocaína en la expresión de receptores relacionados al dolor: receptores opioides y receptores de la sustancia P**

Memoria presentada por Roger López Bellido  
para optar al título de Doctor  
por la **Universidad de Salamanca**

Fdo: Roger López Bellido  
Salamanca, 2012



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

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado “Influencia de la cocaína en la expresión de receptores relacionados al dolor: receptores opioides y receptores de la sustancia P”, que presenta el doctorando D. Roger López Bellido, 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 20 de Junio de 2012.

**Fdo. Prof. Raquel E. Rodríguez Rodríguez**



**Roger López Bellido ha sido becario del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación y la Agencia Española de Cooperación Internacional y de Desarrollo (MAEC-AECID) durante la realización de la tesis doctoral (2008-2012).**



***A mis padres María y Ferriol***

***A mis tíos Aurea y Oswaldo***

***A mis hermanos***

***A Katty***



## Agradecimientos

A la Prof. Raquel E. Rodríguez por haberme aceptado en el laboratorio y sobre todo por su amistad, su confianza, por haber guiado mis pasos, su valiosa ayuda y preocupación hacia mi persona, por su apoyo y consejos en la ciencia y también personales, mi más sincero reconocimiento por todo lo que ha hecho y sigue haciendo por mí. Gracias.

A Pilar, Lita y Aracelli, por su amistad, amabilidad y preocupación. Por la sencillez, calidad y calidez de las que están hechas, y por que sus convicciones traspasan muchas de las expectativas de este mundo.

Al Dr. Juan Carlos Arévalo, por la ayuda prestada e incondicional

Al doctor Javier Herrero por su amistad, ayuda y sus consejos

A la Dra. Verónica González por su forma de ver y hacer la ciencia y por sus consejos.

Al Dr. Ezequiel Marrón por su amistad, ayuda, su perseverancia inagotable. Por brindarme mis primeras lecciones en del laboratorio.

A la Dra. Fátima Macho por su amistad, su ayuda, su buena predisposición en todo momento y por su forma de ser.

Al Dr. Adrián Santos por su ayuda y sus recomendaciones.

A los nuevos compañeros de laboratorio: a Ada por su alegría tan natural, a los nuevos integrantes que se vienen sumando y renovando las ilusiones del laboratorio 13 (Adrián, José y Enrique).

A Katty por su amor, apoyo y comprensión.

A los amigos que han hecho y hacen esta estancia de mi vida más entrañable y menos solitaria, por su amistad ilimitada y sobre todo, por ser como son. Con quienes compartimos buenos momentos y ya no están, digo por Salamanca, pues perviven aún en los recuerdos: Mauricio (el profesor), Ernesto (el che), Edivao (el angelito) y Andrés (el Andy). Con los que aún seguimos remando en la misma dirección de la vida y la ciencia y con algunos con quienes hemos hecho que los viernes sean días de disociación con el comité W&R allá por el Atahualpa y por donde la noche continuase. Gracias por su amistad: Rosario (por las mejores jarras de cerveza y las charlas interminables), Laura (su amistad sincera), Tao (por su sentido del humor), Xi (por su serenidad), Yanneri (por su calla calla), Blanca (por que se queja de todo y nada), Flora (por que siempre el vaso estará medio lleno), Verónica (por esa fe inquebrantable), Vane y Mario (por ser un pareja sin igual), Pablo (el caballero de peñaranda), Fatemeh (la profesora), José (por su forma de ver y vivir la vida, al menos en Salamanca), Mäel (la golpista de las golpistas), Hélène (la princesita Alsaciana) y a todos con los que hemos compartido buenos y agradables momentos y que disculpen si no los nombro.



**Además gracias...**

Al Dr. Luis Fernando Alguacil de la Universidad CEU San Pablo, Madrid-España,  
por habernos proporcionado el clorhidrato de cocaína.



*A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota.*

*Madre Teresa de Calcuta*



# Índice

<b>1. Introducción</b>	
1.1.1. Dolor	3
1.1.2. Receptores del dolor	6
1.2. Sistema opioide	12
1.2.1. Mecanismo de acción de los opioides	14
1.2.2. Regulación del dolor por el sistema opioide	16
1.3. Sistema opioide en el pez cebra	18
1.4. Sistema de las taquicininas	21
1.4.1. Receptores de las neurocininas	25
1.4.2. Mecanismo de acción de las neurocininas	28
1.4.3. El receptor NK1 y su rol en el dolor	29
1.5. Sistema de las neuroquininas en el pez cebra	32
1.6. microRNAs	33
1.6.1. microRNAs let-7d y miR-206	36
1.7. Cocaína	37
1.7.1. Mecanismos de acción de la cocaína	38
1.8. Interrelación sistema opioide, neuroquininas, miRNAs y cocaína	39
1.9. El pez cebra como modelo de estudio	42
1.9.1. El pez cebra como modelo para estudio del dolor	45
1.10. Aportaciones de nuestro grupo de investigación al tema objeto de estudio	47
<b>2. Hipótesis y Objetivos</b>	51
<b>3. Material y métodos</b>	
3.1. Animales de experimentación	55
3.2. Exposición de cocaína a embriones de pez cebra	56
3.3. Exposición de cocaína a Células HEK-293	57
3.4. Extracción de RNA total de embriones de pez cebra	57
3.5. Tratamiento de RNA total con DNasa I	58
3.6. Cuantificación de las muestras de RNA	58
3.7. Extracción de RNA total de células en cultivo	59
3.8. Obtención de cDNA	59
3.9. Síntesis de cDNA de microRNAs	60
3.10. Tratamiento de cDNA con RNasa A	61
3.11. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	61
3.12. PCR a Tiempo real (qPCR)	66
3.13. Análisis de expresión por qPCR	68
3.14. Hibridación in situ (ISH) en embriones enteros	69

3.15.	Imunohistoquímica (IHC)	70
3.16.	Apoptosis por la técnica de TUNEL	71
3.17.	Clonación de los receptores opioides y de las neuroquininas	71
3.18.	Reacción de ligación	73
3.19.	Desfosfatación de los plásmidos	73
3.20.	Preparación de medios y placas bacterianas	74
3.21.	Transformación de células súper competentes	74
3.22.	Selección de las colonias transformantes	75
3.23.	Purificación del DNA plasmídico	75
3.24.	Secuenciación automática del DNA	76
3.25.	Análisis de las secuencias	77
3.26.	Cultivos celulares	78
3.27.	Cultivos celulares y transfección	78
3.28.	Obtención de clones estables	81
3.29.	Congelación de células HEK-293	82
3.30.	Descongelación de células HEK-293	82
3.31.	Análisis filogenético	82
3.32.	Preparación de ribosondas	83
3.33.	Microinyección de morfolidos	85
3.34.	Microinyección de DNA de los receptores opioides	87
3.35.	Análisis de las imágenes	88
3.36.	Análisis estadístico	88
<b>4.</b>	<b>Resultados</b>	
4.1.	Efectos de la cocaína en la expresión de los receptores opioides	91
4.1.1.	Expresión de los receptores opioides	91
4.1.2.	Efectos de la cocaína en la expresión <i>ef1<math>\alpha</math></i>	93
4.1.3.	Nomenclatura de genes y proteínas en el pez cebra y otras especies	94
4.1.4.	Efectos de la cocaína en la expresión de <i>zfmor</i>	95
4.1.5.	Efecto de la cocaína en la expresión del receptor <i>zfdor1</i>	96
4.1.6.	Efecto de la cocaína en la expresión de <i>zfdor2</i>	97
4.1.7.	Efecto de la cocaína en la expresión de los receptores opioides <i>zfmor</i> , <i>zfdor1</i> y <i>zfdor2</i> mediante ISH	98
4.1.8.	La cocaína modula la expresión de dre-let-7d y sus precursores (RT-qPCR)	103
4.1.9.	Efectos de la cocaína en la expresión espacial de dre-let-7d	105
4.1.10.	La microinyección de DNA de los receptores opioides y del 3'UTR-ZfMOR afecta la expresión de dre-let-7d y sus precursores	106
4.1.11.	Efecto de la cocaína en la expresión de proteínas implicadas en la biogénesis del miRNA	112

4.1.12. El silenciamiento de los receptores opioides sobre la expresión de dre-let-7d y sus precursores (estudios de qPCR)	114
4.1.13. Efectos de la cocaína en los procesos de proliferación y apoptosis	116
4.2. Clonación de Tac1 y los receptores de neurocinina en el pez cebra	118
4.2.1. Clonación de Tac1 en el pez cebra	118
4.2.2. Análisis filogenético de Tac1 y SP en el pez cebra	123
4.2.3. Expresión de la SP del pez cebra durante la embriogénesis	127
4.2.4. Efectos de la cocaína sobre la expresión de la SP	128
4.2.5. Distribución espacial de la SP	129
4.2.6. Expresión de la SP en embriones de peces cebra	130
4.2.7. Efectos de la cocaína sobre la expresión espacial de la SP	130
4.2.8. Efectos de la cocaína en la expresión del miR-206 y sus precursores (miR-206-1 y miR-206-2)	133
4.2.9. Silenciamiento de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2) y su efecto en la expresión de la SP	134
4.2.10. Clonación de Nk1a y Nk1b en el pez cebra	135
4.2.11. Análisis filogenético de los receptores Nk1a Nk1b del pez cebra	143
4.2.12. Expresión temporal y espacial de nk1a y nk1b durante la embriogénesis	146
4.2.13. Distribución espacial de nk1a y nk1b en embriones de pez cebra	147
4.2.14. Efectos de la cocaína sobre la expresión temporal y espacial de nk1a y nk1b	149
4.2.15. Expresión de nk1a y nk1b tras el silenciamiento de los receptores opioides	155
4.2.16. Efectos de la cocaína en la expresión de Nk1a y Nk1b transfectadas en células HEK-293	156
<b>5. Discusión</b>	
5.1. Efectos de la cocaína sobre la expresión de los receptores opioides	164
5.2. Efecto de la cocaína en la expresión de dre-let7d y sus precursores.	168
5.2.1. El silenciamiento y la sobreexpresión de los receptores opioides altera la expresión de dre-let-7d y sus precursores	170
5.3. Efectos de la cocaína en los procesos de proliferación y apoptosis	173
5.4. Clonación de Tac1 en el pez cebra	175
5.4.1. Precursor de Tac1 y la SP en el pez cebra	175
5.4.2. La filogenia de Tac1 y de la SP muestra que el pez cebra es un buen modelo par el estudio de las taquicininas	176
5.4.3. Desarrollo de la SP durante el desarrollo embrionario del pez cebra	176
5.4.4. Efectos de la cocaína en la expresión de la SP	179

5.4.5.La cocaína induce cambios en la expresión del miR-206 y sus precursores	180
5.4.6.El silenciamiento de los receptores opioides afecta la expresión de la SP	181
5.5. Identificación de receptores de neurocininas en el pez cebra	183
5.5.1.Clonación de los receptores Nk1a y Nk1b en el pez cebra.	183
5.5.2.La filogenia de Nk1a y N1b muestra que el pez cebra se alinea al igual que sus ortólogos	186
5.5.3.Expresión temporal y espacial de los receptores nk1a y nk1b durante la embriogénesis	187
5.5.4.El silenciamiento de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2) afecta la expresión de los receptores nk1a y nk1b del pez cebra	192
5.5.5.Efectos de la cocaína sobre las células HEK-293 transfectadas con Nk1a y Nk1b	193
<b>6. Conclusiones</b>	<b>213</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>205</b>

# **INTRODUCCIÓN**



## 1.1 Dolor

Las primeras ideas sobre el dolor fueron formuladas antes de 1800 (Perl, 2007) y debido al desarrollo de las ciencias experimentales emergieron diferentes teorías sobre el dolor (Chen, 2011) así como sus definiciones. Sin embargo, la primera definición de dolor que se realizó con fines académicos, científicos y clínicos, que permitiera la comprensión entre las personas que las estudiaban en este campo, las que la padecían o sufrían y los médicos quienes los trataban, se enunció años más tarde de la constitución de la IASP (*International Association for the Study of Pain*) en 1973. El dolor, se definió como: “*Una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con un daño tisular real o potencial*” (Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy, 1979) (Merskey, 1986; Merskey, 2007). Antes de la definición de la IASP las personas relacionadas con el estudio del dolor (clínicos e investigadores) lo definían a su manera, experiencia, condición, etc. Todo esto, antes de la definición del dolor produjo una gran dificultad en su cuantificación e hizo difícil alcanzar un adecuado tratamiento del dolor. Incluso en nuestros días, que se ha avanzado en el estudio y la comprensión del dolor, es muy difícil comprender y tratar ciertos tipos de dolor, como los dolores agudos, neuralgias y el dolor producido por un cáncer. En 1986 se modificaron y agregaron algunos términos a la definición de dolor (como por ejemplo, el concepto de dolor crónico) (Merskey y Bogduk, 1994; Merskey, 2007). En años recientes, en la reunión anual de los miembros de la IASP (Kyoto, 2007), se acordó que los miembros de la IASP expresen sus puntos de vista si tuviesen alguna inconformidad sobre la terminología básica del dolor (*New pain terminology: A work in progres, Editorial of the Pain, 2008*) (Jensen y Gebhart, 2008) que se tiene hasta el momento, con el fin de que participen clínicos e investigadores básicos con el objetivo primordial de

mejorar los conceptos existentes o que sean ambiguos en todo lo relacionado con el tema del dolor (Devor, 2008; Merskey, 2009; Loeser y Treede, 2008).

La búsqueda de una definición acertada del dolor quizá puede resumirse en la siguiente frase: “Si tú no puedes medir o cuantificar algo, tú no puedes controlar algo” (Frampton y Hughes-Webb, 2011), hasta el momento a pesar de los avances en el campo de dolor no hemos sido capaces fidedignamente de definir, cuantificar y tratar el dolor, pero vamos en la búsqueda de comprender y definir el dolor con el objetivo de mejorar su tratamiento.

Es paradójico que el dolor tenga principalmente una función protectora (Fields y Levine, 1984), nos avisa de una lesión que debe ser tratada o evitada en el mejor de los casos (Serpell y cols., 1998). La intensidad con la que se siente el dolor se ve afectada por condiciones circunstanciales y el mismo estímulo puede producir respuestas diferentes en distintos individuos en condiciones similares. La naturaleza sumamente individual y subjetiva del dolor es uno de los factores que siempre ha dificultado su definición y por lo tanto, el tratamiento clínico efectivo (McGuire, 1984; Katz y Melzack, 1999; Perl, 2011). Asimismo, ya que en el proceso de la sensación dolorosa participan muchos factores endógenos, esto añade un grado más de dificultad a su estudio y tratamiento. Hasta el momento, no se conocen estímulos que desencadenen invariablemente una respuesta dolorosa en todas las personas, es decir estímulos dolorosos. Los soldados y deportistas no sienten dolor alguno hasta que son retirados del campo de batalla o de la competencia deportiva (Perl, 2011). La capacidad de detectar los estímulos nocivos es esencial del ser humano para la supervivencia y el bienestar. La importancia del dolor se ve ilustrada en las personas que sufren de malformaciones congénitas que las hacen incapaces de detectar los estímulos dolorosos. Estas personas no pueden sentir el dolor punzante de un objeto aguzado, el calor de una llama, o

incluso las molestias asociadas con lesiones internas, como la fractura de un hueso roto. Como resultado de ello, no presentan las conductas apropiadas de protección contra estas amenazas del entorno, muchos de los cuales pueden ser potencialmente mortales.

Al dolor se le considera también como un quinto signo vital, además de la respiración, frecuencia cardiaca, presión arterial y temperatura. Por lo que algunos clínicos sugieren evaluar la intensidad del dolor en todos los pacientes (al igual que se evalúa la presión arterial, la frecuencia cardiaca, la temperatura y la frecuencia respiratoria) en las personas hospitalizadas y lo registren en las historias clínicas, porque sus niveles de estos signos tienen la propiedad de variar de un tiempo a otro (Devi y Tang, 2008; Casey, 2011; Heinrich, 2012) y son clave para el bienestar de las personas. Aunque, debemos recordar que el dolor al tener un componente subjetivo lo hace menos fiable (Lorenz, 2009) con respecto a los cuatro signos vitales mencionados.

El estudio en animales ha contribuido enormemente a mejorar la comprensión del dolor, pero a pesar de todo lo logrado, aún no hemos sido capaces de poder cuantificar el dolor en humanos, siendo sumamente mucho más complicado en los animales, pero aun así éstos son valiosos modelos en el estudio del dolor, y de hecho nos están ayudando a comprenderlo mejor y cada vez controlarlo más efectivamente. *Sin olvidar, que el dolor es algo innato que aflora cuando llegamos a este mundo y se esfumará sólo al irnos del mismo.*

### **1.1.1 Receptores del dolor**

Los receptores que responden selectivamente a los estímulos que pueden dañar los tejidos o amenazan la integridad del cuerpo se denominan nociceptores y se clasifican de acuerdo a su respuesta a estímulos mecánicos, térmicos y

químicos (Messliger, 1997). Estos nociceptores responden directamente a algunos estímulos nocivos e indirectamente a los demás por medio de una o más sustancias químicas liberadas por células en el tejido traumatizado. Se han propuesto una variedad de sustancias que actúan como intermediarios químicos para el dolor: histamina, Potasio (K<sup>+</sup>) liberado de las células dañadas, bradiquinina, sustancia P y otros péptidos relacionados (péptido del gen relacionado a la calcitonina CGRP), acidez (disminuye en el pH local alrededor de los terminales nerviosos), ATP, la serotonina y la acetilcolina (Julius y Basbaum, 2001; Basbaum y cols., 2009). De esta manera, la nocicepción es el proceso por el cual un estímulo (termal, mecánico o químico intenso) es detectado por una subpoblación de fibras nerviosas periféricas, denominados nociceptores (Julius y Basbaum, 2001; Hwang y Oh, 2007). Los cuerpos celulares de los nociceptores están localizados en el ganglio de la raíz dorsal (en el caso de neuronas de todas las partes del cuerpo, excepto cara) y el ganglio trigeminal (terminaciones nerviosas en la cara) (Costigan y Woolf, 2000; Julius y Basbaum, 2001; Basbaum y cols., 2009). Existen dos clases de nociceptores: las fibras A- $\delta$  (mielínicas) y las fibras C (amielínicas) (Julius y Basbaum, 2001; Calvino y Grilo, 2006; Johaneck y cols., 2008), las primeras relacionadas con el primer dolor, dolor rápido o bien localizado, mientras que las últimas caracterizan el dolor lento o mal localizado (Basbaum y cols., 2009).

Para que un estímulo nocivo proveniente del entorno, pueda catalogarse como dolor, se debe producir en primer lugar la activación de los nociceptores periféricos ubicados en las terminales nerviosas de las neuronas de primer orden y tras la transducción las fibras A- $\delta$  y C se encargan de transmitir la información hacia la médula espinal (Basbaum, 1999; Julius y Basbaum, 2001; Calvino y Grilo, 2006; Basbaum y cols., 2009). Estas terminales, expresan además una serie de receptores que se han relacionado con el desencadenamiento del dolor o la

sensibilización periférica, estos receptores son el receptor TrkA (diana del factor de crecimiento neural, NGF) (Snider y McMahon, 1998; Basbaum y cols., 2009), neuririnas y arteminas, receptores del tipo purinérgico P2X3 (Cockayne y cols., 2000; Hwang y Oh, 2007) y se distingue también la expresión de diferentes receptores tipo canal iónico que le confieren sensibilidad al calor (TRPV1), frío (TRPM8), ácidos (ASICs) (Bevan y Yeats, 1991; Costigan y Woolf, 2000) e irritantes químicos (TRPA1) (Caterina y cols., 1997; Julius y Basbaum, 2001; Dhaka y cols., 2009; Venkatachalam y Montell, 2007; Rao y Mohamed, 2011) y estímulos mecánicos (Krishtal y cols., 1988ab; Hwang y Oh, 2007) (Fig. 1).

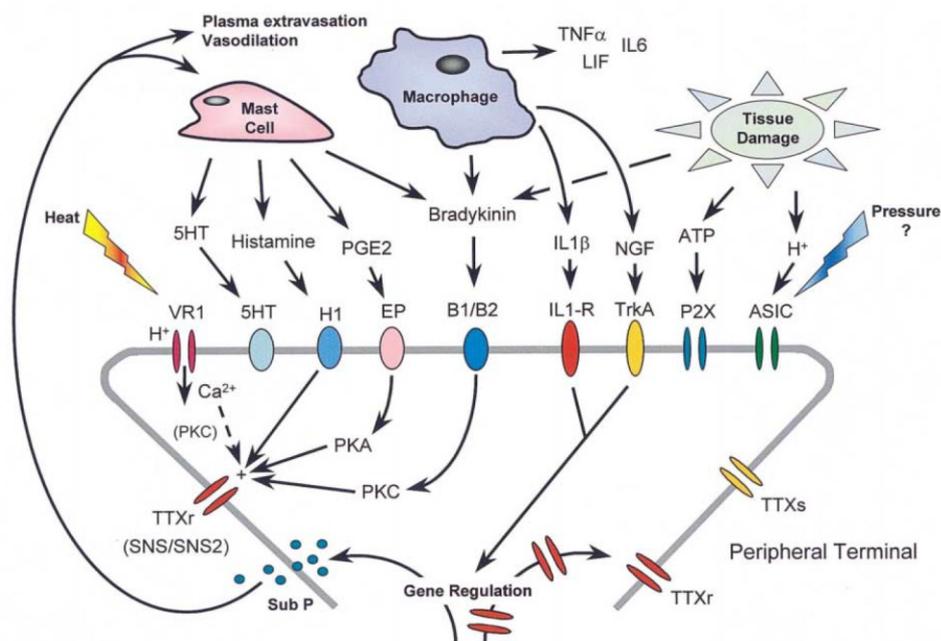


Fig. 1. Nociceptores de la periferia ubicados en las terminales nerviosas de la neurona pseudounipolar y sus mediadores endógenos: 5HT, H1, EP, RV1, B1/B2 IL1b, TrkA, P2x, ASIC, PGE2 IL1b, NGF, ATP, Heat. Tomado de Costigan y Woolf, 2000.

Para que un estímulo nocivo proveniente del entorno, pueda catalogarse como dolor, se debe producir en primer lugar la activación de los nociceptores periféricos ubicados en las terminales nerviosas de las neuronas de primer orden y

tras la transducción las fibras A- $\delta$  y C se encargan de transmitir la información hacia la médula espinal (Basbaum, 1999; Julius y Basbaum, 2001; Calvino y Grilo, 2006; Basbaum y cols., 2009). Según el tipo de fibras (A- $\delta$  y C) van a tener una sinapsis topográfica en el asta dorsal de la médula espinal (Basbaum y cols., 2009). Las fibras periféricas (de todas las partes del cuerpo excepto la cara) transmiten información hacia la médula espinal, específicamente hacia el asta dorsal de la médula espinal. Las fibras A- $\delta$  hacen sinapsis en las láminas I y V de Rexed (Calvino y Grilo, 2006), mientras que las fibras C lo hacen en la lámina I y II (Basbaum, 1999; Basbaum y cols., 2009) (Fig. 2).

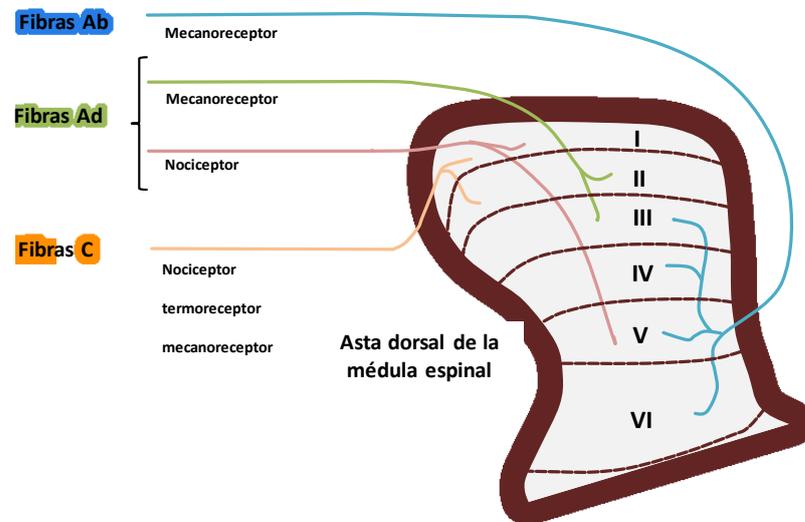


Fig. 2. Las VI primeras láminas de Rexed están localizadas en el asta dorsal de la médula espinal. Las fibras A $\delta$  llegan hacer sinapsis en las láminas I y V, mientras que las fibras C lo hacen en las láminas I y II. Tomado y modificado de Basbaum y cols., 2009

Una vez que la información de la periferia se transmite por sinapsis a las neuronas de segundo orden, los axones de estas neuronas cruzan hacia el lado contralateral de la médula espinal y ascienden por cinco vías ascendentes hacia centros superiores del SNC, siendo estas: la vía espinotalámica (neo y paleo-espinotalámica), espino-reticular, espino-mesencefálica, cérvicotalámica y espino-hipotalámica (Fig. 3). Estas vías proyectan a diversas regiones del tronco del encéfalo, diencefalo incluyendo el tálamo, sustancia gris periacueductal, formación

reticular parabraquial y núcleos de la porción rostroventral del bulbo raquídeo (Calvino y Grilo, 2006). Desde el tálamo parten proyecciones hacia áreas de la corteza sensitiva primaria, sensitiva secundaria parietal, el lóbulo frontal, zonas del lóbulo temporal, el sistema límbico o el hipotálamo (Willis y Westlund, 1997, Bolay y Moskowitz, 2002; Calvino y Grilo, 2006).

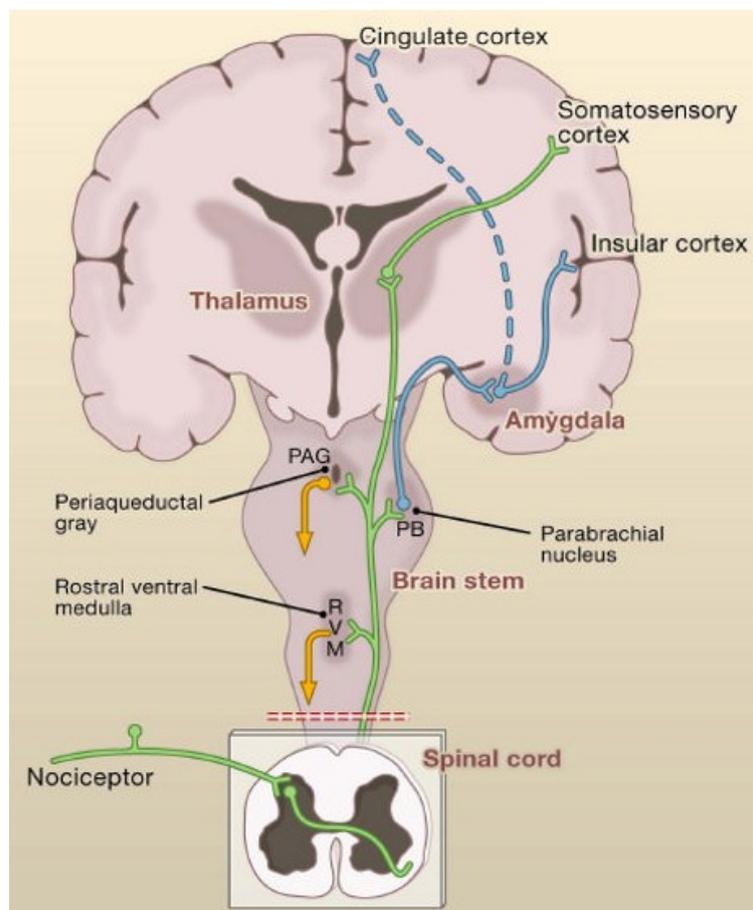


Fig. 3. Activación de los nociceptores y vías de conducción del dolor hacia centros superiores del SNC y la vía descendente del dolor. En verde y azul, las vías ascendentes y en naranja la vía descendente del dolor. Tomado de Basbaum y cols., 2009

Los neurotransmisores (NTs) relacionados con la transmisión del dolor y de su modulación son de dos tipos principalmente: los excitatorios e inhibitorios. Dentro de los excitatorios están el glutamato y la sustancia P (SP) (Trafton y Basbaum, 2000; Hökfelt y cols., 1975; Hylden y Wilcox, 1981; Duggan y cols., 1988; De Koninck y Henry, 1991), mientras en el caso de los inhibitorios, son el

GABA (Ácido Gamma Amino Butírico) y la Glicina. El glutamato en condiciones fisiológicas se libera en el asta dorsal de la médula espinal y activa receptores de tipo AMPA y Kainato (Fig. 4). Asimismo, la SP una vez liberado de la neurona nociceptiva, en el asta dorsal de la médula espinal, se une a receptores de neuroquininas (NK1) que se expresan en la médula espinal (Brown y cols., 1995; Trafton y Basbaum, 2000) y se ha mostrado, *in vivo* e *in vitro*, que los opioides al activar sus receptores presinápticos de la neuronas nociceptivas primarias contribuye a la menor liberación de la SP (Kuraishi y cols., 1983; Lang y cols., 1991) y mejorarían la analgesia, aunque no se conoce la importancia funcional de este proceso (Trafton y cols., 1999).

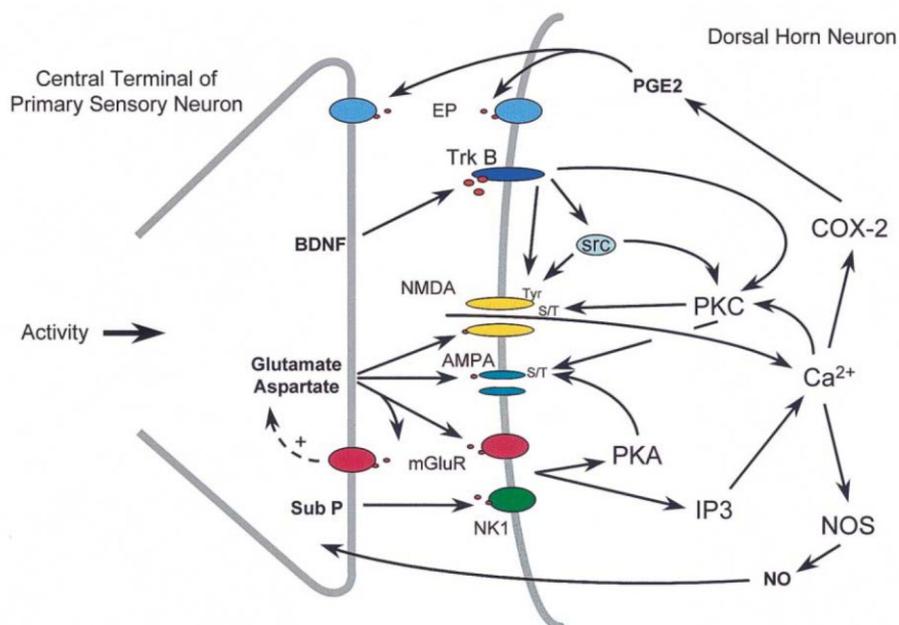


Fig. 4. Nociceptores localizados en el asta dorsal de la médula espinal. BDNF es el ligando de TrkB, SP de NK1, EP de PGE2, Glutamato de NMDA, AMPA de mGluR. PKA, PKC, IP3, COX-2, NOS, NO, son segundos mensajeros intracelulares, de los cuales el NO se comporta también como un NT. La activación de los nociceptores por estímulos dolorosos en la periferia activa las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, estas neuronas de primer orden liberan el BDNF (glutamato y SP que tras la activación de las neuronas de segundo orden, continúa con la conducción del impulso nervioso relacionado al dolor, hacia centros superiores del SNC. BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro; PKA: proteína quinasa A; PKC: proteína quinasa C; IP3: Inositol trifosfato; COX-2: ciclooxigenasa 2; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintasa; mGLU: receptores metabotrópicos de glutamato; PGE2: prostaglandina E2; EP, receptor de PGE2; SP, Sustancia P; NK1: receptor de neuroquinina 1; NMDA: N-metil-D- aspartato; AMPA: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico. Tomado de Costigan y Woolf, 2000.

En el caso de dolor agudo, a nivel del asta dorsal de la médula espinal se

libera glutamato que se une en sus receptores postsinápticos de tipo AMPA y kainato bajo estas condiciones los receptores de NMDA son silentes, pero en una situación que incremente la liberación de glutamato de los nociceptores será lo suficientemente intensa como para despolarizar las neuronas postsinápticas y activar los receptores AMPA quiescentes (Costigan y Woolf, 2000). Esto exacerbará las respuestas de las neuronas postsinápticas frente a un estímulo. Además, la concurrencia de activación de los receptores de glutamato y de SP en las neuronas postsinápticas contribuye a la sensibilización por aumento del calcio citosólico (Costigan y Woolf, 2000; Basbaum y cols., 2009). Este proceso se denomina como sensibilización central y es comparado con la potenciación a largo plazo (LTP) que ocurre en el hipocampo y que se puede denominar como LTP en la vía del dolor (Latremoliere y Woolf, 2009). También se puede producir una sensibilización periférica cuyo los nociceptores son activados constantemente por los estímulos nocivos o un daño de las fibras nerviosas, conduciendo en un incremento espontáneo de activación o alteración en su conducción o de las propiedades de los NTs (Costigan y Woolf, 2000; Basbaum y cols., 2009). Por otro lado algunas investigaciones indican que el glutamato sería el principal neurotransmisor del dolor agudo y la SP del dolor crónico, recordando que ambos NT se co-expresan en los terminales aferentes primarios de la médula espinal y probablemente se liberen juntos en el espacio sináptico (De Biasi y Rustioni, 1988). El sistema descendente o eferente del dolor, surgido a nivel central, regula los procesos de la sensación dolorosa. Este sistema tiene su origen en la corteza, mesencéfalo y bulbo raquídeo, e incluye estructuras como la sustancia gris periacueductal, *locus ceruleus* (Basbaum y Fields, 1984; Calvino y Grilo, 2006) (Fig. 3). Una vez que el estímulo llega al tálamo y corteza, mucho antes o una vez que hagan sinapsis las neuronas de segundo con las de tercer orden se activan

ciertos centros como la sustancia gris periacueductal, núcleo del rafe y actúan a nivel del asta dorsal de la médula espinal (Willis y Westlund, 1997; Vanegas y Schaible, 2004). También del *locus ceruleus* desciende fibras hacia el asta dorsal de la médula espinal (Millan, 2002; Heinricher, 2009; Basbaum, 2009). Estos centros, descritos tienen la característica de producir péptidos opioides endógenos (POE) (Herz y Millan, 1988; Willis y Westlund, 1997), por lo que su activación producirá la liberación a nivel descendente de POEs, específicamente en el asta dorsal de la médula espinal donde se ha encontrado una gran densidad de receptores opioides (Millan, 2002; D'Mello y Dickenson; 2008; Heinricher, 2009; Basbaum, 2009). Asimismo, participan otros NTs como la noradrenalina (NA) y la serotonina (5-HT). Estos últimos NT son dianas de algunos fármacos como el tramadol que producen analgesia al unirse a receptores opioides y además inhiben la recaptación de NA y 5-HT en el espacio sináptico del asta dorsal de la médula espinal (Millan, 2002).

Así como existe el sistema descendente del dolor se ha reportado también la existencia de un sistema de facilitación descendente del dolor (Zhuo y Gebhart, 1990, Zhuo y Gebhart, 1997; Calvino y Grilo, 2006) el cual provendría del mismo núcleo ventro rostral del bulbo (RVM) del cual proviene el sistema descendente del dolor (Calvino y Grilo, 2006).

## **1.2 Sistema opioide**

Los opioides se conocen desde la antigüedad, y se han utilizado como analgésicos y como sustancias de uso recreativo. El principal componente activo del opio es la morfina, que se une a receptores específicos en el organismo: los receptores opioides mu, delta y kappa ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ , respectivamente) (Georgoussi y cols., 2012). La existencia de estos receptores ubicados en la membrana celular en el sistema nervioso central (SNC) fue descrito por tres grupos independientes (Pert

y Snyder, 1973; Simon y cols., 1973; Terenius y cols., 1973). La clonación posterior de los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  permitió mejorar nuestra comprensión del sistema opioide endógeno (Chen y cols., 1993ab; Evans y cols., 1992, Kieffer y cols., 1992; Meng y cols., 1993; Thompson y cols., 1993; Yasuda y cols., 1993). Ulteriormente, se clonó el receptor de Nociceptina/Orfanina ORF (denominado ORL, opioid receptor like) (Mollereau y cols., 1994) que se considera como un receptor opioide porque comparte aproximadamente una homología del 50 % con el resto de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ ) (Mollereau y cols., 1994). Sin embargo, los ligandos opioides tienen baja afinidad de unión al receptor de nociceptina (ORL) (Butour y cols., 1997; Grond, 2002).

Los receptores opioides forman parte de un sistema analgésico endógeno ampliamente estudiado y caracterizado, el sistema opioide endógeno (Holden, 2005). Cada receptor opioide tiene sus propios ligandos endógenos, de origen peptídico que derivan de tres familias de péptidos opioides endógenos: la proopiomelanocortina (POMC), proencefalina (PENK) y prodinorfina (PDYN) (Trigo y cols., 2010). Estos precursores, POMC, PENK y PDYN han sido identificados, clonados y se ha demostrado que generan muchos péptidos activos, entre ellos las  $\beta$ -endorfinas, leu-encefalinas, dinorfinas y neoendorfinas respectivamente (Terenius, 2000; Kieffer y Gavériaux-Ruff, 2002). Estos péptidos opioides endógenos (POEs) exhiben diferentes afinidades por cada tipo de receptor opioide. Las  $\beta$ -endorfinas se unen preferentemente al receptor  $\mu$  que sobre el receptor  $\delta$  y  $\kappa$ , la afinidad de las encefalinas (Met y Leu) por el receptor  $\delta$  es 20 veces mayor que por receptor el  $\mu$  y la dinorfina A tiene preferencia por el receptor  $\kappa$  (Trigo y cols., 2010). Todos estos POE tienen una secuencia característica en el N-terminal Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-leu que es indispensable para activar los receptores opioides (Akil y cols., 1997). Otros dos nuevos péptidos se han propuesto como ligandos

endógenos de los receptores  $\mu$ , la endomorfina-1 y endomorfina-2 (Zadina y cols., 1997), sin embargo hasta la fecha ni los genes ni los precursores para la síntesis endógena han sido identificados (Trigo y cols., 2010).

### 1.2.1 Mecanismo de acción de los opioides

La mayoría de agonistas que se unen a los receptores (7 dominios transmembrana) acoplados a la proteína G (GPCR) del tipo Gi/o son analgésicos y en el caso de los receptores opioides también están acoplados a las proteínas G, del tipo Gi/o (Tso y Wong, 2003; Pan y cols., 2008; Trescot y cols., 2008; Trigo y cols., 2010). La activación de estos receptores por sus agonistas (endógenos y sintéticos) (Tabla 2) inicia una compleja cascada de señalización intracelular que produce una gran diversidad de efectos que pueden ser de acción inmediata y mediata. En el primer caso, los receptores opioides pueden disminuir la excitabilidad neuronal y de la liberación de neurotransmisores y en el segundo caso pueden regular el control de la transcripción de numerosos genes (Fig. 5) (Law y Loh, 1999; Trescot y cols., 2008). La activación de los receptores  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  induce que la subunidad  $\alpha$  de la proteína G inhibe la síntesis del cAMP por inactivación de la adenilato ciclasa (AC) (Standifer y Pasternak, 1997; Tso y Wong, 2003). Una vez que el cAMP es sintetizado este segundo mensajero activa la proteína cinasa A (PKA) el cual puede alterar la excitabilidad eléctrica neuronal, además puede activar al elemento de respuesta de cAMP (CREB) y mediar muchas respuestas intracelulares (Tso y Wong, 2003; Trescot y cols., 2008). El CREB es un factor de transcripción que ingresa hacia el núcleo y promueve la transcripción de muchos genes. Asimismo, la activación de los receptores opioides produce la apertura de los canales de potasio, lo cual se traducirá 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).

El principal uso clínico de los agonistas opioides es el tratamiento del dolor, siendo la morfina, hasta el momento, el fármaco que mayor analgesia produce (Gregori y cols., 2012), pero su uso crónico está relacionado a la tolerancia y adicción (Matthes y cols., 1996; Sora y cols., 1997). El fentanilo y sufentanilo se emplean también como coadyuvantes de la anestesia general y son 10 a 20 veces más potentes que la morfina (Stephan, 1989; Trescot y cols., 2008; Mercadante, 2012). Ante una intoxicación por el abuso de las sustancias opioides, tipo morfina y heroína, los efectos se pueden bloquear, en clínica, con sus antagonistas competitivos no selectivos de los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$ , como naloxona o naltrexona, aunque tienen una alta afinidad por el receptor  $\mu$  (Goodrich, 1990; Trescot y cols., 2008). La naloxona tiene una baja disponibilidad por vía oral, mientras que naltrexona presenta mejor biodisponibilidad por vía oral y con una larga duración de su acción (Handal, 1983; Trescot y cols., 2008).

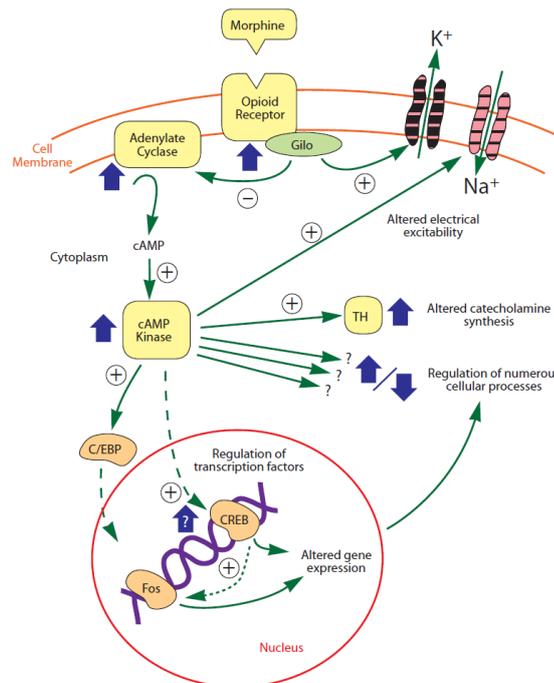


Fig. 5. Una vez activados los receptores opioides (acoplados a Proteínas Gi/o se desencadena una señalización intracelular que producirán desde una acción rápida, como la activación de los canales de potasio hasta la regulación de la transcripción de genes. Tomado de Trescot y cols., 2008.

## 1.2.2 Regulación del dolor por el sistema opioide

Los agonistas que actúan sobre los receptores opioides suprimen la excitabilidad neuronal a través de la activación de los canales de potasio rectificadores interiores acoplados a la proteína G (GIRK) (Schneider y cols., 1998; Marker y cols., 2006), inhibición de los canales de calcio dependiente de voltaje (VGCC) (Moises y cols., 1994ab; Acosta y López, 1999) incluyendo los canales tipo N, P/Q, L y R (Pan y cols., 2008; Wu y cols., 2004; Wu y cols., 2008; Wu y cols., 2009). La activación de los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  inhibe la liberación de glutamato y de SP de las neuronas nociceptivas primarias en el asta dorsal de la médula espinal (Kondo y cols., 2005). La estimulación de los receptores opioides  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  puede incrementar la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  (desde los compartimentos donde se almacena el  $\text{Ca}^{2+}$ ) a través de la activación de la fosfolipasa C (Spencer y cols., 1997; Chan y cols., 2000). El funcionamiento de este efecto no está claro, pero se cree que esto genere la hiperalgesia inducida por opioides (Pan y cols., 2008).

La morfina se metaboliza por demetilación y glucoronidación, siendo este segundo proceso el predominante, así se produce la morfina 6 glucorónido (M6G) y la morfina 3 glucorónido (M3G) en una razón de 6:1 y sólo un 5 % de la morfina es demetilado a normorfina (Trescot y cols., 2008). La M3G en altas concentraciones se cree que produce hiperalgesia (Smith, 2000).

Esta acción de los agentes opioides sobre el sistema aferente que lleva la información nociceptiva hacia el asta dorsal de la médula espinal indica que los receptores opioides disminuyen la liberación de los NT del dolor glutamato y SP de las fibras nociceptivas primarias y asimismo puede hiperpolarizar las neuronas postsinápticas, disminuyendo la excitabilidad de las neuronas y haciendo fallar la transmisión nerviosa (Pan y cols., 2008) (Figura 6). Por otra parte, los opioides pueden activar las conexiones excitatorias entre la sustancia gris periacueductal

(PAG) y núcleo reticular paragigantocelular, proyectando a la porción rostroventral del bulbo raquídeo, donde se localizan las neuronas del núcleo magno del rafe. Las neuronas del rafe, ricas en péptidos opioides, conectan a su vez con las neuronas nociceptivas en las láminas I, II, V, VI y VII de las astas dorsales de la médula espinal, a las que inhiben (Basbaum y Fields, 1984).

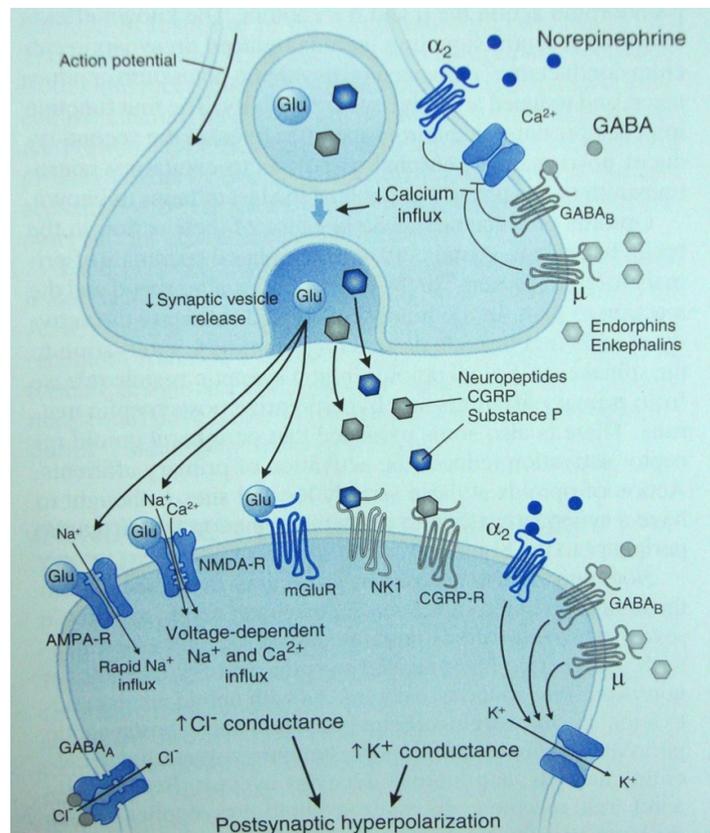


Fig. 6. Localización pre y post sináptica de los receptores opioides en la sinapsis. A nivel presináptico la activación de los receptores opioides produce el cierre de los canales de calcio, esta disminución hace que la sinaptotagmina (un sensor de calcio) no pueda unirse al calcio y por lo tanto las proteínas pre y post sinápticas de la maquinaria de la sinapsis no se acoplan y así se logra que no se libere el glutamato de la neuronas presinápticas. A nivel post sináptico los receptores opioides, específicamente el  $\mu$  hiperpolariza las neuronas postsinápticas al inducir la apertura de los canales de potasio que conlleva a la inhibición de la transmisión del dolor. Tomado de Golan, 2007

Estudios de hibridaciones in situ, inmunohistoquímica, han mostrado que en el asta dorsal de la médula espinal tanto en mRNA y la proteína de los cuatro tipos de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ , nociceptina) son expresados predominantemente en la lámina superficial I y II (según la clasificación de Rexed) donde la fibras

nociceptivas, fibras C y A $\delta$  terminan (Maekawa y cols., 1994; Robertson y cols., 1999; Chen y cols., 2002). Asimismo, el mRNA y proteínas de los receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ , nociceptina) se encuentran en el ganglio de la raíz dorsal (DRG) (Dado y cols., 1993; Maekawa y cols., 1994; Wang & Wessendorf, 2001; Pettersson y cols., 2002). Los niveles de expresión de  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  y nociceptina, son influenciados por diferentes condiciones de dolor. La lesión de un nervio reduce la expresión del receptor opioide  $\mu$  en el asta dorsal de la médula espinal (Porreca y cols., 1998; Zhang y cols., 1998) y los efectos analgésicos de los agonistas opioides se reduce en esta condición de injuria sobre de los nervios (Arner y Meyerson, 1988; Porreca y cols., 1998; Zhang y cols., 1998). El análisis de knockout del receptor opioide  $\mu$  ha mostrado que este receptor tiene un rol central en la analgesia inducida por los opioides (Matthes y cols., 1996; Simonin y cols., 1998; Zhu y cols., 1999). También el receptor opioide  $\delta$  presenta un rol en la analgesia, pues la administración intratecal del agonista D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>] -enkephalin (DPDPE) produce una analgesia dosis dependiente (Hammond y cols., 1998). Los receptores opioides pueden formar heterodímeros en las neuronas (Jordan y Devi, 1999; George y cols., 2000; Wessendorf y Dooyema, 2001; Law y cols., 2005; Snook y cols., 2006; Pasternak y Pan, 2011), los cuales alteren las propiedades de unión de los agonistas y los efectos funcionales (Jordan y Devi, 1999; George y cols., 2000). Mientras los heterodímeros de los receptores opioides  $\kappa$ - $\delta$  sinérgicamente incrementa la unión de sus agonistas, los receptores  $\mu$ - $\delta$  disminuyen la unión de sus agonistas (Jordan y Devi, 1999; George y cols., 2000).

### **1.3 Sistema opioide en el pez cebra**

En el pez cebra, al igual que en los mamíferos, se han identificado, clonado y caracterizado farmacológicamente los receptores opioides ZFOR1 (Barrallo y cols., 1998a y 1998b; Rodríguez y cols., 2000), ZFOR2 (Barrallo y cols., 2000), ZFOR3

(Alvarez, y cols., 2006), ZFOR4 (Pinal-Seoane y cols., 2006) y ZFORL (Rivas-Boyero y cols., 2011) y los precursores de los POE 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 concreto, desde 1998 hasta el 2000, hemos clonado cinco tipos de receptores opioides semejantes a los receptores opioides de los mamíferos: ZFOR1, ZFOR2, ZFOR3 y ZFOR4 actualmente se denominan ZfDOR1, ZfDOR2, ZfMOR y ZfKOR, respectivamente. Los nombres de sus correspondientes ortólogos en humanos y la nomenclatura actual frente a la nomenclatura empleada en la clonación se muestran en la tabla 1.

<i>Receptores opioides en el pez cebra</i>	
<i>Humano</i>	<i>Pez cebra</i>
<i>DOR</i>	<i>ZfDOR1</i>
	<i>ZfDOR2</i>
<i>MOR</i>	<i>ZfMOR</i>
<i>KOR</i>	<i>ZfKOR</i>
<i>ORL</i>	<i>ZfORL</i>

Tabla 1. Receptores opioides del humano y del pez cebra. DOR (receptor opioide delta), MOR (receptor opioide mu), KOR (receptor opioide kappa), ORL (receptor de nociceptina).

En general, la identidad de las proteínas del pez cebra con las del humano es menor del 70%, pero la conservación de los dominios funcionales, así como las regiones de unión a los substratos o ligandos son muy altos, cercanos al 100% de identidad con las del ser humano o con la de otros mamíferos, lo que le otorga al pez cebra ser una herramienta muy valiosa, para el estudio del descubrimiento de nuevos fármacos, sitios de unión de los fármacos, validación de fármacos

(Langheinrich, 2003). En el caso específico de los receptores opioides del pez cebra, estos presentan una identidad de entre 64-73% comparados con los receptores opioides del humano. El receptor ZfMOR es el que presenta una mayor homología (73%), seguido por ZfKOR (70%), ZfDOR1 (64%) y ZfDOR2 (65%) (Tabla 2). El receptor de nociceptina, antes denominado ORL y relacionado a los receptores opioides presenta una homología del 60-61% de homología con la del humano (Tabla 4), aunque varias investigaciones sugieren que su actividad farmacológica es diferente e incluso que puede antagonizar la actividad analgésica de los receptores opioides. En el presente trabajo, por el motivo explicado anteriormente el receptor de nociceptina se emplea como grupo externo para enraizar el árbol filogenético ya que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G, al igual que los receptores opioides (Fig. 7).

<i>Homología de receptores opioides en diferentes especies</i>					
<i>Pez cebra</i>	<i>zfDOR1</i>	<i>zfDOR2</i>	<i>zfKOR</i>	<i>zfMOR</i>	<i>zfORL</i>
<i>Humano</i>	64	65	70	73	60
<i>Rata</i>	63	63	67	68	61
<i>Ratón</i>	64	64	68	71	61

Tabla 2. Identidad de aminoácidos en porcentaje de los receptores opioides del pez cebra con diferentes especies de mamíferos.

La filogenia de los receptores opioides muestra que el receptor ZfMOR, está delineada en la rama de los otros receptores opioides mu de rata, ratón y humano, de manera similar encontramos los receptores ZfDOR1 y ZfDOR2 y ZfKOR delineados con sus respectivos homólogos de mamíferos. Esto indica que cada receptor opioide evolucionó de un ancestro común que con el paso del tiempo por

múltiples razones circunstanciales originó tres receptores opioides en los mamíferos, pero que el pez cebra además se duplicó uno de ellos por razones que desconocemos. Este receptor que se duplicó es el receptor opioide delta.

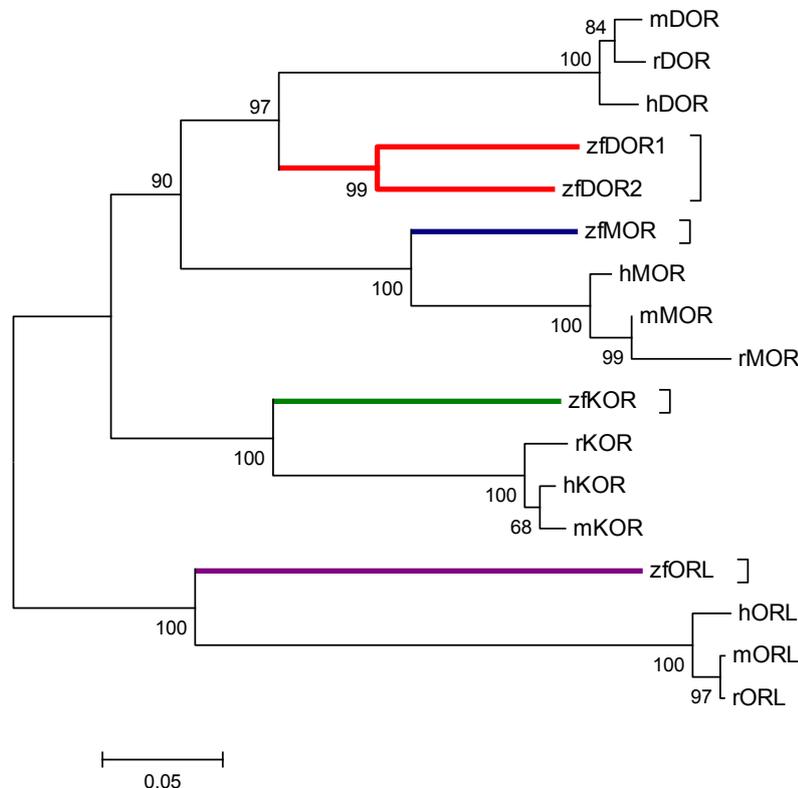


Fig. 7. Árbol filogenético de los receptores opioides generado mediante el método de “*neighborjoining*” a partir del alineamiento de las secuencias de amino ácidos de los receptores opioides de pez cebra (Zf), humano (h), ratón (m) y rata (r). Los números a la izquierda de las ramas representan la robustez de las ramas y la escala en la parte inferior de la filogenia representa la distancia de las ramas.

#### 1.4 Sistema de las neuroquininas

Cuando Von Euler y Gadum (1931) buscaban acetilcolina en el intestino de caballos, encontraron un nuevo agente, el cual bajaba la presión arterial en conejos atropinizados por vasodilatación periférica y estimulaba el tono y el ritmo del intestino aislado del conejo. A esta nueva sustancia aislada del extracto crudo de cerebro e intestino de caballos con propiedades hipotensivas y contractibilidad del

músculo liso Gaddum y Schild lo denominaron Sustancia P (del inglés *Substance P*), P refiriéndose al polvo obtenido del procedimiento de la extracción cerebro e intestino de caballos (Harrison y Geppetti, 2001).

Actualmente se conoce que la expresión de la SP está ampliamente distribuida en el SNC y el sistema nervioso periférico (SNP) y se libera a nivel central y terminales nerviosos periféricos actuando como un NT (Otsuka y Yoshioka, 1993). La estructura amino acídica fue identificada en 1971 (Chang y cols., 1971; Ballet y cols., 2011), H-Arg<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Lys<sup>3</sup>-Pro<sup>4</sup>-Gln<sup>5</sup>-Gln<sup>6</sup>-Phe<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup>-Gly<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup>-Met<sup>11</sup>-NH<sub>2</sub>, en el hipotálamo de bovino. Más de una década después la SP se introdujo como parte de la familia de las taquiquininas, junto con la neuroquinina A (NKA), neuroquinina B (NKB) que fueron descubiertos en 1984 (Maggi y Schwartz, 1997). Todos estos péptidos comparten la misma secuencia en el carboxilo terminal: Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (X es Phe o Val). La SP de mamíferos deriva del gen de la preprotaquiquinina-A (PPT-A), el cuál se originó de una duplicación de un gen ancestral (Carter y Krause, 1990). El gen de la PPT-A también codifica otras taquiquininas, incluyendo NKA, neuropéptido K (NPK), y neuropéptido  $\gamma$  (NP $\gamma$ ) (Carter y Krause, 1990). El procesamiento alternativo del gen PPT-A genera tres isoformas de transcritos de mRNA,  $\alpha$ PPT-A,  $\beta$ PPT-A y  $\gamma$ PPT-A, todos estos tres mRNA de PPT-A codifican el precursor de la SP. La expresión del mRNA de  $\alpha$ PPT-A es más abundante en el SNC mientras que en los tejidos periféricos predominan el  $\beta$ PPT-A y  $\gamma$ PPT-A (Kotani y cols., 1986; Carter y Krause, 1990; Pennefather y cols., 2004).

En el 2004 de acuerdo con la nomenclatura de los genes de las taquicininas en humanos se reemplazó los nombres previamente usados PPT-A (por *TAC1*), PPT-B (por *TAC3*) y PPT-C (por *TAC4*), por el comité de nomenclatura de la Organización del Genoma Humano (Human Genome Organization, HUGO)

([www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature)) (Patacchini y cols., 2004). En párrafos anteriores se presentó la nomenclatura de los genes tal como fueron clonados en su momento, pero a partir de este punto emplearemos la nomenclatura actual.

En humanos la expresión de TAC1 se ha encontrado en todos los tejidos, especialmente en todo el cerebro, corazón, colon, bazo, cerebro fetal, y glándulas mamarias (Page y cols., 2003; Pinto y cols., 2004). TAC1 al ser clonado en 1983 de cerebro de bovino fue inicialmente creído tener dos genes, uno que contenía la SP (TAC1) y la segunda conteniendo la NKA (TAC2) (Nawa y cols., 1983) (Fig. 8). En los siguientes años se comprobó que NKA se formaba por un procesamiento alternativo de RNA del mismo gen de  $\alpha$ TAC1 y  $\beta$ TAC1 (Nawa y cols., 1984; Page, 2005). En ratas los mRNA de  $\beta$ TAC1 y  $\gamma$ TAC1 son los más abundantes (Bannon y cols., 1992), mientras que en el humano lo es  $\beta$ TAC1 (Carter y Krause., 1990). El significado biológico de este procesamiento alternativo de los mRNA de TAC1 es desconocido, ya que no hay evidencias de si puede ser específico para algunos tejidos o no.

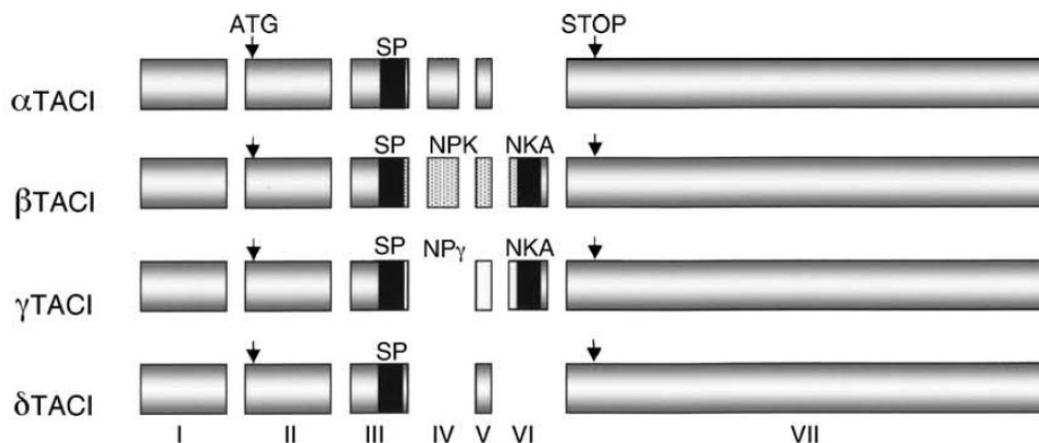


Fig. 8. Secuencia de los exones de TAC1 en humanos, se muestran las 4 diferentes isoformas de TAC1,  $\alpha$ TAC1,  $\beta$ TAC1,  $\gamma$ TAC1 y  $\delta$ TAC1. Las 4 isoformas contiene en su secuencia la región que codifica para la SP. NKA se codifica por la isoforma  $\beta$ TAC1 y  $\gamma$ TAC1, mientras que el NPK y  $NP\gamma$  son codificados por las isoformas  $\beta$ TAC1 y  $\gamma$ TAC1, respectivamente. Tomado de Page, 2005.

En la Fig. 8, se muestran los diferentes exones del gen de TAC1 en humanos (Page, 2005). Asimismo, el análisis de radioinmunoensayo en ratas mostró que hay mayores niveles de SP que de NKA (Takeda y cols., 1990). En la tabla 5 se indica los diferentes secuencias de amino ácidos que generan los genes de TAC en mamíferos (Page, 2005). Más detalladamente, la inmunoreactividad a la SP se ha encontrado en diferentes áreas del SNC: rinencéfalo, telencéfalo, ganglios basales, hipocampo, amígdala, áreas septales, diencefalo, hipotálamo, mesencéfalo, protuberancia del cerebro medio, bulbo raquídeo y la médula espinal. En la periferia se ha encontrado en el trigémino, ganglio dorsal y neuronas intrínsecas del intestino (Shults y cols., 1984; Lee y cols., 1985; Shimada y cols., 1987; Kiyama y cols., 1988; Hamid y cols., 1991; Sternini y cols., 1995).

Secuencia de amino ácidos de mamíferos codificados por los genes TAC1, TAC3 y TAC4

Taquicininas	Secuencias de los péptidos
<b>TAC1</b>	
SP	RPKPQQFFGLM-NH2
NKA	HKTD SFVGLM-NH2
NPK	DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTD SFVGLM-NH2
NP□	DAGHGQISHKRHKTD SFVGLM-NH2
NKA (3-10)	TDSFVGLM-NH2
<b>TAC3</b>	
NKB	DMHDFVGLM-NH2
NKB (50-91)	LYDSRSISLEGLLKVLSKASVGPKETS LPQKRDMHDFVGLM-NH2
<b>TAC4</b>	
<b>Humano</b>	
EKA	DGGEEQTLSTEAE TWVIVALEEGAGPSIQLQLQEVKTGKASQFFGLM-NH2
EKB	DGGEEQTLSTEAE TWEGAGPSIQLQLQEVKTGKASQFFGLM-NH2
EKA/B	GKASQFFGLM-NH2
hHK-1	TGKASQFFGLM-NH2
hHK-1 (4-11)	ASQFFGLM-NH2
EKC	KKAYQLEHTFQGLL-NH2
EKD	VGAYQLEHTFQGLL-NH2
<b>Conejo</b>	
EK-1	GKASQFFGLM-NH2
EK-2	VRGYQMGQRGLL-NH2
<b>Ratón/rata</b>	
HK-1	SRTRQFYGLM-NH2

Tabla 3. Secuencia de amino ácidos de las diferentes taquicininas en mamíferos, codificadas por lo genes de TAC1, TAC3 y TAC4. Modificado de Page, 2005.

La síntesis de SP se realiza en los ribosomas, y luego es confinado al pericarion y almacenado en vesículas para finalmente ser transportadas a las terminales nerviosas para su proceso enzimático final (Takahashi y Otsuka 1975; Brimijoin y cols., 1980; Merighi y cols., 1988; Plenderleith y cols., 1990), el

transporte se realiza tanto hacia el SNC como como a las terminales nerviosas periféricas, encontrándose la mayor acumulación de la SP en las terminales nerviosas periféricas más que en el ganglio dorsal (Harmar y cols., 1980).

#### 1.4.1 Receptores de las taquicininas

Los análisis farmacológicos comparativos de varias taquicininas (también llamados neurocininas) mostraron evidencias de la existencia de varios receptores de taquicininas y así Nakanishi y colaboradores clonaron el primer receptor relacionado a la SP, el receptor de Sustancia K (Masu y cols., 1987) denominado actualmente como NK2, luego se clonaron el receptor NK1 (Yokota y cols., 1989) y NK3 (Shigemoto y cols., 1990). Actualmente en mamíferos se conocen tres tipos de receptores de neurocininas o taquicininas denotados como NK1, NK2 y NK3, los cuales están heterogéneamente distribuidos dentro de cada especie. También se ha clonado una variante del receptor NK3, referido como NK3B o NK4 (Hökfelt y cols., 2001). Los péptidos de las taquicininas, SP, NKA y NKB se unen a tres receptores de neurocininas. Sin embargo, el orden de potencia de los receptores de las taquicininas es como se detalla: NK1, SP $\geq$ NKA>NKB; NK2, NKA>NKB>SP y NK3, NKB>NKA>SP (Hastrup y Schwartz, 1996; Lecci y Maggi, 2003) (Fig. 9).

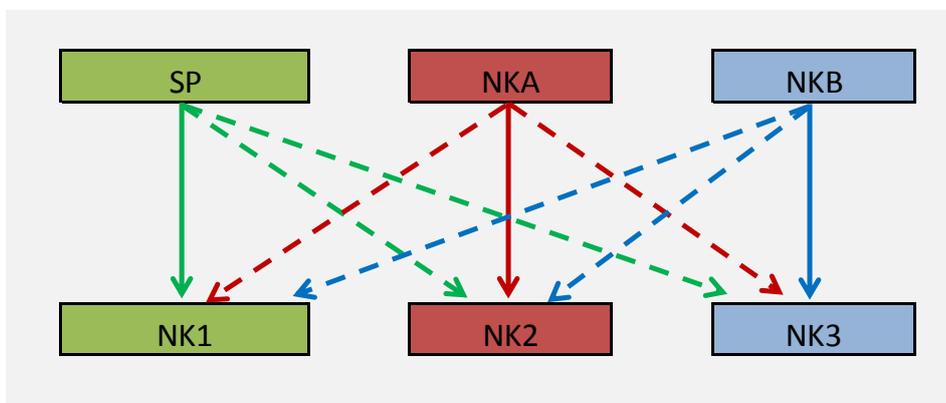


Fig. 9. Esquema que muestra que la SP, NKA y NKB, se pueden unir con cierta afinidad en los diferentes tipos de receptores de neurocininas: NK1, NK2 y NK3. En flecha verde (continua) se muestra que SP tiene una mayor afinidad por el receptor NK1, pero también puede unirse a NK2 y NK3 con menor afinidad (flechas verdes discontinuas). De la misma manera para NKA y NKB, estos tienen preferencia por los receptores NK2 y NK3 (flechas continuas, rojo y azul, respectivamente), asimismo pueden unirse en los diferentes de (NK1 y NK2 y NK3) dependiendo del péptido (flechas discontinuas en rojo y azul).

La nomenclatura de los receptores de taquicininas se decidió en un encuentro de investigadores del tema (Montreal, 1986), en el cual se designaron como NK1, NK2, NK3 de acuerdo al rango de la potencia de los ligandos de SP, NKA y NKB, respectivamente (Maggi y Schwartz, 1997).

La activación de estos receptores de taquicininas se ha mostrado en una amplia variedad de acciones biológicas, en la contracción del músculo liso, comportamientos emocionales, vasodilatación, inflamación neurogénica, hematopoyesis, activación del sistema inmune, estimulación de la secreción de glándulas y transmisión del dolor (Longmore y cols., 1997).

El receptor de la SP fue el primero en ser caracterizado en detalle y ahora es un modelo para el estudio de cómo interactúan los NTs, hormonas y fármacos antagonistas. Con el desarrollo del primer antagonista de NK1, CP96,345 se pudo demostrar que la SP se unía en las terminaciones extracelulares de los hélices transmembrana y especialmente en los lazos extracelulares del receptor, mientras que el antagonista (sustancia pequeña hidrofóbica no peptídica) se unía más profundamente entre los segmentos transmembrana (Fig. 10) (Gether y cols., 1993; Holst y cols., 1998). Este principio de interacción de los ligandos endógenos en relación a los antagonistas no peptídicos posteriormente se tornó en un fenómeno general para muchas hormonas peptídicas y receptores de neuropéptidos.

El receptor NK2 (NK2R) es expresado en bajas concentraciones en el SNC, sin embargo, su ligando endógeno se expresa en grandes cantidades, una pregunta que llama la atención es, por qué se expresa más el ligando endógeno cuando se expresan pocos receptores (Maggi y Schwartz, 1997). Ensayos por autoradiografía mostraron que NKA marcado radioactivamente tiene buena unión con el receptor NK1 (NK1R), incluso en las vías aéreas de cobayas donde se expresan NK1 y NK2 (Burcher y cols., 1989).

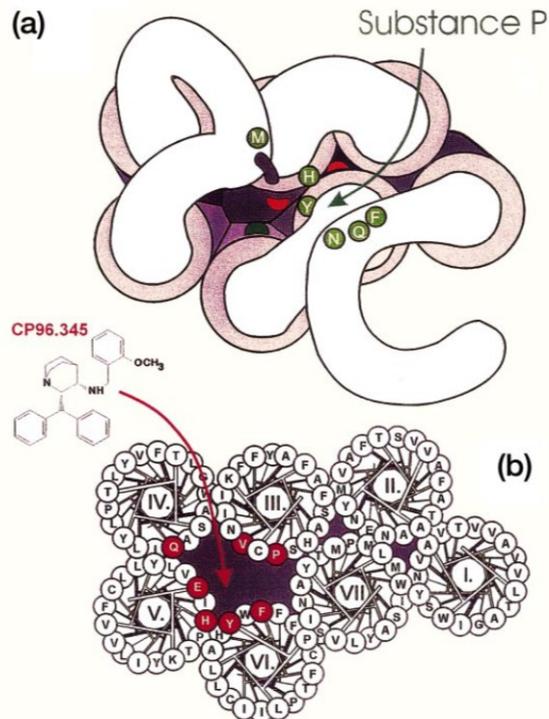


Fig. 10. Vista extracelular del receptor NK1. A) Modelo conformacional que muestra donde se une la SP en el receptor NK1. La SP se uniría en los lazos extracelulares del receptor y la extensión N-terminal (amino ácidos marcados de verde que participan en la unión), B) mientras que el antagonista que es generalmente una sustancia pequeña hidrofóbica no péptidica (CP96,345) se uniría más profundamente entre los segmentos transmembrana III, IV, V y VI (amino ácidos marcados en rojo). Tomado de Höekfelt y cols., 2001.

Esto muestra que estos ligandos pueden suplir la ausencia del otro ligando, o tener otras funciones con mayor o menor actividad. El dogma de los tres péptidos y de los tres receptores no se cumple con un análogo de la SP, el septide (Glp6, Pro9] SP (6–11)). El septide y otros agonistas con secuencia relacionada con los septide (en función, no en estructura) son potentes estimulantes de NK1, sin embargo, cuyo se emplea la SP marcado con radioligando no muestran apreciable afinidad por el receptor NK1. Esto planteó muchas cuestiones, como la posibilidad de que existan subtipos de receptores NK1 (Petitet y cols., 1992; Glowinsky, 1995). En algunas regiones anatómicas como la médula espinal de rata y el esfínter del iris del conejo el ligando de la NKA tiene mayor afinidad que la SP (Hall y cols., 1994). La NKA es más resistente a la inactivación por peptidasas que la SP, sugiriendo

que NKA puede actuar en los receptores NK1 ubicados en el SNC (Martling y cols., 1987; Devillier y cols., 1988; Ballet y cols., 2011). El receptor NK2 está restrictivamente expresado en la periferia y el receptor NK3 (NK3R) a nivel del SNC. El receptor NK1 que está tanto en el SNC y la periferia (Patacchini y cols., 2004; Ballet y cols., 2011), es el que está más distribuido y representaría el receptor primordial de las taquicininas con respecto a NK2 y NK3 (Patacchini y cols., 2004)

#### **1.4.2 Mecanismo de acción de las neurocininas**

Las taquicininas interactúan con receptores de membrana específicos pertenecientes a la familia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR). El receptor NK1 ha sido clonado en diferentes especies (rata, ratón) incluido en el humano. La SP a diferencia de otras taquicininas se une con mayor afinidad al receptor NK1 (Fig. 12), el cual está acoplado a la proteína Gq, cuyo segundo mensajero intracelular denominado inositol trifostato (IP3) producirá sus acciones finales (Regoli y cols., 1994). Además, se ha sugerido que el receptor NK1 puede acoplarse a la GPCR del tipo Gi/o y tendría acciones opuestas a las del tipo Gq. El receptor NK1 es expresado de forma constitutiva en el SNC y a nivel periférico y de manera inducible sólo en las células de la médula ósea (Pennefather y cols., 2004).

Por estudios de mutagénesis y unión por radio ligandos se ha determinado que la SP se uniría en los lazos extracelulares del receptor y la extensión N-terminal, mientras que los antagonistas que generalmente son sustancias pequeñas hidrofóbicas y de secuencia no peptídica, como el CP96,345 se uniría más profundamente entre los segmentos transmembrana III, IV, V y VI (Hökfelt y cols., 2001). Esto se puede apreciar en la representación del receptor NK1 de humano, en la que se muestran los residuos presumiblemente claves para la unión

de la SP con el receptor NK1 (Fig. 11). Además, se han detallado los aminoácidos relevantes para la unión de los antagonistas de la SP (Maggi y Schwartz, 1997).

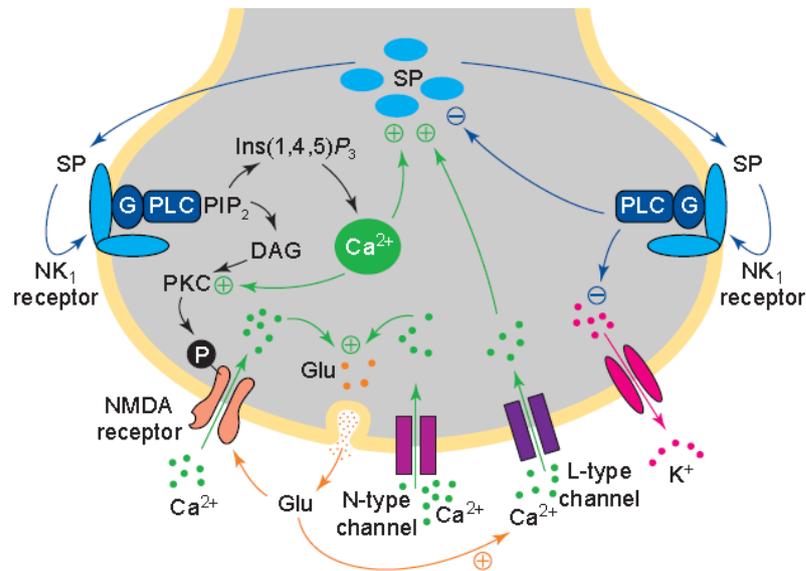


Fig. 11. Esquema que muestra la señalización intracelular que produce la activación del receptor NK1 por la SP. El receptor NK1 está acoplado a la proteína Gq, el cual tras ser activado activa la señalización de segundos mensajeros de IP3 y DAG. Además, el receptor NK1 puede activar la proteína Gi y producir la síntesis de cAMP. Estos segundos mensajeros, DAG, IP3 y cAMP a su vez van a regular otros mediadores que pueden afectar la expresión de muchos genes. DAG, diacilglicerol. Tomado de Malcangio y Bowery, 1999.

### 1.4.3 El receptor NK1 y su rol en el dolor

La ubicación específica de la SP en el SNC y las neuronas sensoriales aferentes primarias le otorga un rol similar al de un neurotransmisor excitatorio, y está relacionado con la trasmisión del dolor tanto agudo como crónico. La observación de que la SP era más abundante en el asta dorsal que en la ventral sugirió que fuese un NT primario sensorial (Hill, 2000; Harrison y Geppetti, 2001) y algunos actualmente lo catalogan como el NT del dolor tipo crónico (Seybold, 2009) aunque es muy difícil predecir a partir de las investigaciones que tipo de NTs o neuropéptidos son los más importantes en un tipo de dolor específico, como agudo o crónico (Otsuka y Yanagisawa, 1990). A nivel del asta dorsal de la médula espinal se ha encontrado receptores NK1 tanto en neuronas de segundo orden y las

células gliales que circunscriben las sinapsis, lo que implica que la SP y NK1 estén promoviendo la transmisión del dolor. Ante una estimulación inflamatoria periférica se libera SP en la médula espinal (Hökfelt y cols., 1975; Hökfelt y cols., 2001) y el mRNA de SP se incrementa en el asta dorsal de la médula espinal (Radhakrishnan y Henry, 1991).

Las terminaciones nerviosas de diámetro pequeño A $\delta$  y C terminan en las láminas I y II del asta dorsal de la médula espinal (Light y Perl, 1979), mientras la mayoría de las fibras cutáneas Ab terminan en las láminas III-VI (Yoshida y cols., 2006). La liberación de la SP de las fibras nociceptivas puede internalizar los receptores NK1 en el asta dorsal, lo que demuestra que la inflamación periférica puede modificar la expresión del receptor NK1 en la lámina I del asta dorsal de la médula espinal y que el receptor NK1 tiene un rol en la transmisión de estímulos nerviosos intensos y el mantenimiento de la hiperalgesia (Hökfelt y cols., 2001). El empleo de antagonistas de los receptores de NK1 en animales muestran que tienen un buen efecto analgésico (Rupniak y cols., 1995), pero dependiendo del animal empleado, pues CP-96,345 o CP-99,994 (antagonistas de NK1), tienen poca afinidad en cerebro de rata y una mayor afinidad en cerebro de cobayas y ratas del desierto (Gitter y cols., 1991; Beresford y cols., 1991; McLean y cols., 1993). Otro antagonista de NK1, el RP67580, tuvo una buena afinidad en ratones (Garrett y cols., 1992; Rupniak y cols., 1993).

Estudios preclínicos y en animales no muestran un efecto analgésico claro de los antagonistas de los receptores de NK1 (Rupniak y cols., 1995) por lo que se han diseñado nuevos agonistas-antagonistas mixtos, de opioides y de NK1 respectivamente (Ballet y cols., 2011). Más de 300 patentes de los receptores de NK1 se ha registrado desde 1991 cuando se descubrió y patentó el CP-96,345 (antagonista de NK1) (Huang y Korlipara 2010). Aunque, estos antagonistas de

NK1 si han resultado ser efectivos en el tratamiento de las náuseas postoperatorias como aprepitant introducido en la clínica en el 2003 (Patel y Lindley, 2003; Navari, 2004) y en el 2007 maropitant recibió su aprobación para su uso veterinario (Huang y Korlipara 2010).

El knock-out de TAC1 en ratones (produjo pérdida de la expresión de SP y NKA) muestra un incremento del potencial analgésico de morfina (Bilkei-Gorzo y cols., 2010). Asimismo, el knock-out de NK1 en ratones demuestra que estos receptores de la SP son importantes en la transmisión del dolor (Bester y cols., 2001). Por otro lado, la mayoría de estudios muestran que los antagonistas de receptores de NK1 tienen un efecto analgésico en animales (Rupniak y cols., 1995), pero que en humanos no son buenos analgésicos (Herbert y Holzer, 2002). Actualmente se están diseñando nuevos antagonistas de receptores de NK1, pero que a la vez presentan una secuencia de aminoácidos que tiene alta afinidad por los receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$ , que se denominan antagonistas-agonistas mixtos (Ballet y cols., 2011; Schiller, 2010) (Fig. 12).

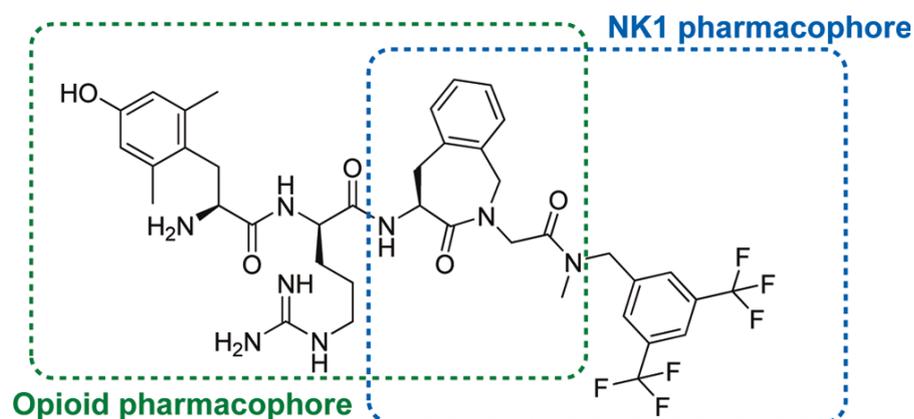


Fig. 12. Se muestra la estructura química de la quimera obtenida por un agonista de receptores opioides  $\mu$  y  $\delta$  y a la vez antagonista del receptor NK1: Ac-Aba-Gly-NMe-3',5'-(CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-Bn]-(H-Dmt-D-Arg-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>). Tomado de Ballet y cols., 2011.

Creer que solo un tipo de NT este mediando la nocicepción o que tenga preponderancia es una idea que en la práctica no es demostrable, ya que los antagonistas de NK1 no han resultado ser eficaces hasta el momento en el tratamiento contra el dolor. Es posible que en paralelo estén participando muchos otros NT como el glutamato, NKA, CGRP (que se expresa muchas veces en conjunto con SP y glutamato), óxido nítrico, etc. y estén regulando la transmisión sensitiva y nociceptiva. Es necesario seguir investigando con los agonistas antagonistas mixtos de los receptores de Nk1 y opioides  $\mu$  y  $\delta$ .

### **1.5 Sistema de las neuroquininas en el pez cebra**

Nuestro grupo de investigación ha clonado y caracterizado los receptores opioides y los POE (relacionados al proceso de analgesia) en el pez cebra, mientras que el sistema de las taquicininas (que participan en el proceso del dolor), aún no se ha descrito en el pez cebra. Al ser las taquicininas un importante componente que participa en diversos procesos biológicos y principalmente en el dolor, nos propusimos clonar el sistema de la taquicininas en el pez cebra y así mejorar la comprensión del dolor en el pez cebra y en el futuro poder desarrollar un modelo de dolor que complemente a nuestras investigaciones realizadas hasta el presente. Hasta el momento la familia de las taquicininas en el pez cebra no ha sido identificada, pero mediante una búsqueda en la base de datos de PubMed, Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) y ZFIN (<http://zfin.org/>) se encontraron secuencias homólogas del pez cebra con respecto al resto de mamíferos (humano, rata, ratón) tanto del precursor de la SP (Tac1) y de su receptor NK1.

## 1.6 microRNAs

Los microRNAs (miRNAs o miRs) se definen como pequeñas moléculas no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos (Hussain, 2012) (que fueron por primera vez descubiertos en larvas de gusanos) potentes reguladores de la expresión de genes en los mamíferos (Rand y cols., 2005; Breving y cols., 2010; He y cols., 2011). Los miRNAs son generalmente transcritas por la RNA polimerasa II (Cullen, 2004) como pri-miRNA (microRNA primario), luego es escindida por una RNasa denominada Drosha (junto con su subunidad reguladora DGCR8) (también denominado Pasha) originando así un *hairpin* precursor de 65 nucleótidos llamado pre-miRNA (precursor del miRNA) (Han y cols., 2004). Este último precursor es luego exportado del núcleo hacia el citosol por el Exportin 5/Ran-GTP (y su cofactor Ran unido a GTP) (Yi y cols., 2003). En el citosol, es nuevamente procesado por otra RNasa, *DICER* (como parte de RLC (*RISC Loading Complex*), para producir un dúplex intermediario de RNA de aproximadamente 22 pares de bases (pb) (Bersntein y cols., 2001). En la biogénesis del miRNA maduro la región del lazo (*loop*) terminal juega un rol importante, un lazo terminal flexible facilita el procesamiento de DROSHA y DICER (Zhang y Zeng, 2010). Asimismo, estas enzimas que participan en la biogénesis pueden alterarse en ciertos estados, como en el caso de Dicer1 que se encuentra disminuido en cerebro de alcohólicos humanos (Lewohl y cols., 2011). La unión del argonauta 2 (ago2) (una proteína del citosol) al dúplex de miRNA provoca la retención de la forma madura del miRNA en el complejo miRNA-ago2 (Fig. 13). Este último complejo formado es el que media los efectos directos de los miRNAs, silenciando en la mayoría de casos sus dianas al unirse en la región no codificante del mRNA 3'-UTR (Greco y Rameshwar y cols., 2007; Wu y cols., 2008).

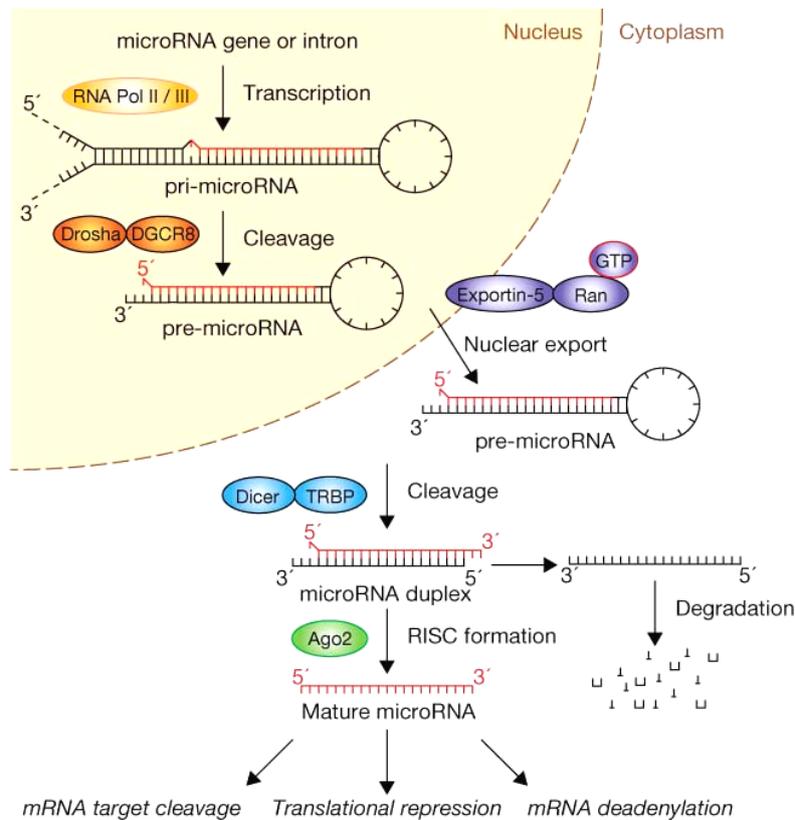


Fig. 13. Representación esquemática que muestra la síntesis del miRNA en el núcleo y que después de varios procesos es transportado al citoplasma donde reprime la expresión de ciertos genes diana. Tomado de Winter y cols., 2009

El ago2 es la única proteína humana con actividad endonucleasa (codificado gracias a su dominio PIWI), el cual estructuralmente recuerda un dominio RNasa H (Song y cols., 2004). Los argonautas, además pueden elevar la expresión de los miRNAs maduros post-transcripcionalmente, independiente de su actividad RNasa, mientras que la reducción de ago2 reduce la expresión de los miRNAs endógenos maduros (Diederichs y Haber, 2007).

Cuando la unión del miRNA con su diana es de manera complementaria casi perfecta, generalmente localizado dentro de la secuencia codificante del mRNA, produce la escisión y posterior degradación del mRNA (Yekta y cols., 2004) este mecanismo es utilizado por el miR-196. En el caso de que el miRNA se una con menor complementariedad, generalmente dentro de la región 3'UTR del transcrito, inhibe la translación de los mRNAs sin afectar la estabilidad del mRNA (Doench y

Sharp, 2004; Greco y Rameshwar, 2007) que es lo que sucede con gran parte de los miRNAs. En el caso de que el miRNA se una en la secuencia 5'UTR, inducen un aumento de expresión de sus diana más que degradarlo o silenciarlo, este es un mecanismo diferente a cuando se une en la secuencia 3'UTR. Asimismo, un miRNA puede regular la acción de cientos de genes y además los mRNA contienen múltiples sitios de unión a los miRNAs. En los últimos años se calcula que había más de 600 genes que codifican los miRNAs (Griffiths-Jones y cols., 2008), actualmente, en la base de dato miRBase (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>) se han registrado 1527 precursores de miRNAs y un total de 1921 formas maduras de miRNAs en el ser humano.

Los miRNAs se nombran de acuerdo con su descubrimiento como mir-1, mir-2 teniendo en cuenta la conservación de las especies con la excepción de lin-4 y let-7 que fueron los primeros miRNAs identificados (Pasquinelli y Ruvkun, 2002).

Diversos estudios sugieren que los miRNAs juegan un rol en el desarrollo del SNC y sistema nervioso periférico (SNP), algunas de ellas con un alto grado de especificidad temporal y espacial, sugiriendo que su estudio nos brindará conocimientos neurobiológicos importantes (Kosik y Krichevsky, 2005). En la actualidad se les reconoce a estas pequeñas moléculas como contribuidores claves en la regulación de la expresión de genes en el SNC (Zeng, 2009), dependiendo del tipo de miRNA pueden regular tanto el desarrollo como la función del SNC. Se ha sugerido que los miR-9, miR-124, miR-125 participen durante la diferenciación neuronal o el destino de la determinación celular, además de sus funciones que puedan tener en el cerebro adulto (Sempere y cols., 2004; Smirnova y cols., 2005). Los miRNAs 124 y miR-228 son preferencialmente expresados en las neuronas mientras que el miR-23, miR26 y miR-29 están restringidos a los astrocitos. Esto sugiere que los miRNAs puedan servir como marcadores del desarrollo neuronal.

Por otro lado se ha encontrado aumento de miR-146a en células del cerebro de pacientes con Alzheimer, este miRNA es estimulado por el factor nuclear kapa-beta (NF- $\kappa$ B) (Taganov y cols., 2006; Lukiw y cols., 2008). Asimismo, se ha relacionado una disminución de miR-29 y miR-107 con la enfermedad de Alzheimer, ya que normalmente estos miRNAs suprimen la expresión de  $\beta$  secretasa (enzima crítica para la formación de la proteína beta amiloide) (Hebert y cols., 2008; Wang y cols., 2008). El miR-124 tal vez confiera propiedades neuronales a las células, porque se encuentra de forma abundante y se ha visto en las células HeLa que una sobreexpresión de miR-124 disminuye la expresión de los genes que en las neuronas están ausentes (Lim y cols., 2005). Así mismo la expresión y la función de los miRNAs pueden ser influenciadas por señales externas, incluyendo agentes farmacológicos. Un ejemplo lo tenemos en los fármacos psicoterapéuticos (que administradas por larga data) pueden afectar la expresión de let-7b, let-7c, miR128a, miR-124a, miR-30c, miR-34a, miR-221 y miR-144 en hipocampo de ratas (Zhou y cols., 2009). Los miRNAs muestran una importancia casi similar a los factores de transcripción en muchos procesos y se perfilan como posibles dianas terapéuticas ya que ante la ausencia o sobreexpresión de ciertos miRNAs se puedan administrar los miRNAs deficientes o administrar un inhibidor de los miRNAs, esto tomará tiempo, pero son los horizontes que nos permite vislumbrar el avance de la ciencia en nuestros tiempos actuales.

### **1.6.1 microRNAs let-7d y miR-206**

El microRNA let-7d y el miR-206 son dos miRNAs que tiene la característica de estar relacionados al sistema opioide y con el de las taquicininas, respectivamente. Por medio de predicción bioinformática se ha determinado que el receptor opioide mu es un diana de let-7d (Chandrasekar y Dreyer, 2009) lo que sugiere que este

miRNA puede regular la expresión y por lo tanto también la función del receptor opioide mu. Por otro lado, el miR-206 se ha relacionado en la inhibición de la síntesis de la SP (Greco y Rameshwar, 2007) y se ha encontrado en el asta dorsal de la médula espinal y en el ganglio de la raíz dorsal (Kusuda y cols., 2011). Al estar la SP relacionado a la producción de dolor tras su unión en su receptor NK1, sugiere que este miRNA podría tener una función crítica en la regulación del dolor.

Lo anteriormente mencionado, sugiere plantear la existencia de miRNAs que están regulando el dolor, principalmente aquellos miRNAs que se están expresando en regiones relacionadas a la transmisión del dolor, como son el asta dorsal de la médula espinal, por ejemplo.

## 1.7 Cocaína

La cocaína, es una de las drogas de uso recreativo más consumidas, y la que más problemas de adicción ocasiona, por lo que es considerada droga de abuso (Goldstein y cols., 2009). El consumo prolongado de cocaína da lugar a graves efectos no sólo a nivel de SNC (alucinaciones y cambios celulares compensatorios), sino también en el sistema circulatorio (taquicardias, vasoconstricción) (Schindler y cols., 1995; Boghdadi y Henning, 1997; Jaffel y Kimmel, 2006) y respiratorio (fallo respiratorio global causado por una bronco constricción) (Boghdadi y Henning, 1997; Goldstein y cols., 2009). La cocaína es un alcaloide aislado a partir de las hojas de la planta *Erythroxylon coca*, originaria de Sudamérica (Bolivia, Perú, Colombia y Ecuador), que se cultiva hoy en estos y otros países del Oeste Sudamericano (Boghdadi y Henning, 1997; Grinspoon y Bakalar JB, 1981; Jaffel y Kimmel, 2006; Stolberg, 2011). La cocaína no es una droga nueva, pues los indios sudamericanos han masticado las hojas de la coca por cientos de años por sus efectos psicoactivos y su uso es propio de su cultura

(Boghdadi y Henning, 1997; Jaffel y Kimmel, 2006). Pequeñas cantidades de cocaína se encuentran en la saliva (al masticarse las hojas de coca) que es absorbida en la circulación, aunque es poco lo que se sabe acerca del abuso o la adicción de la hoja de coca en estas culturas. El único uso terapéutico legal en nuestros días ha quedado restringido como anestésico local para la cirugía de ojos (Grzybowski, 2007; Goerig y cols., 2012).

### **1.7.1 Mecanismos de acción de la cocaína**

El mecanismo de acción de la cocaína es fundamentalmente a nivel del SNC inhibiendo el transporte de neurotransmisores (NTs) como dopamina, serotonina y noradrenalina (Hurd y Ungerstedt, 1989; Sora y cols., 2001; Zahniser y Sorkin, 2004; Sager y Torres, 2011; Martín y cols., 2011). La inhibición de la recaptación de los mencionados NTs genera un aumento de noradrenalina, serotonina y dopamina en el espacio sináptico (Sora y cols., 2001; Schmitt y Reith, 2010; Sager y Torres 2011), produciéndose por lo tanto una sobre activación de sus receptores: adrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos. El incremento extracelular de los niveles de dopamina en el sistema mesolímbico cortical se ha postulado que media los efectos de recompensa de la cocaína (Diana, 2011). La activación continuada de estas poblaciones receptoriales origina los efectos estimulatorios de la cocaína y contribuyen a la aparición de la depresión nerviosa característica cuando cesa el consumo del mencionado alcaloide. El exceso de dopamina activaría un receptor dopaminérgico asociado a la proteína Gq que aumenta la concentración de calcio intracelular. Además se ha descrito una nueva acción de la cocaína a nivel intracelular produciendo la disociación del complejo Sigma 1 - Ankirina) (Su y Hayashi, 2001). Estas acciones en conjunto activan la transcripción de genes y la alteración del citoesqueleto (Fig. 14) (Su y Hayashi, 2001).

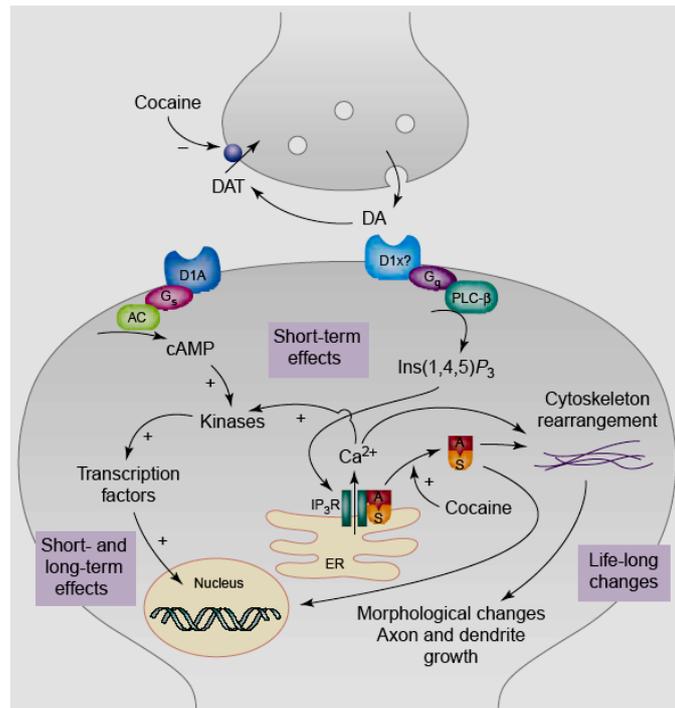


Fig. 14. Aumento del NT dopamina en el espacio sináptico por inhibición del transportador de dopamina por cocaína en la neurona presináptica. El exceso de dopamina activa un receptor dopaminérgico acoplado a la proteína Gq, que incrementa la concentración de un segundo mensajero, el calcio intracelular. Este incremento de calcio intracelular produce la disociación del complejo Sigma 1 – Ankirina, que tiene la capacidad de producir reordenamiento del citoesqueleto y producir cambios en la expresión de genes. Tomado de Su y Hayashi, 2001.

## 1.8 Interrelación sistema opioide, neuroquininas, miRNAs y cocaína

El sistema opioide endógeno, además de estar relacionado a los procesos de analgesia, forma parte del circuito de recompensa e interacciona con otros sistemas responsables de la adicción a drogas, como el sistema cannabinoide (Corchero y cols, 2004), sistema dopaminérgico e interviene asimismo en el control de la adicción al alcohol, a la nicotina y a la cocaína (Shippenberg y cols, 2007). Los receptores opioides tienen una particular ubicación en los centros del SNC relacionados con la adicción y la recompensa conjuntamente con los receptores dopaminérgicos que hace que sean claves en el estudio de la adicción a la cocaína y otras drogas (Dackis y O'Brien, 2002)(Fig. 15).

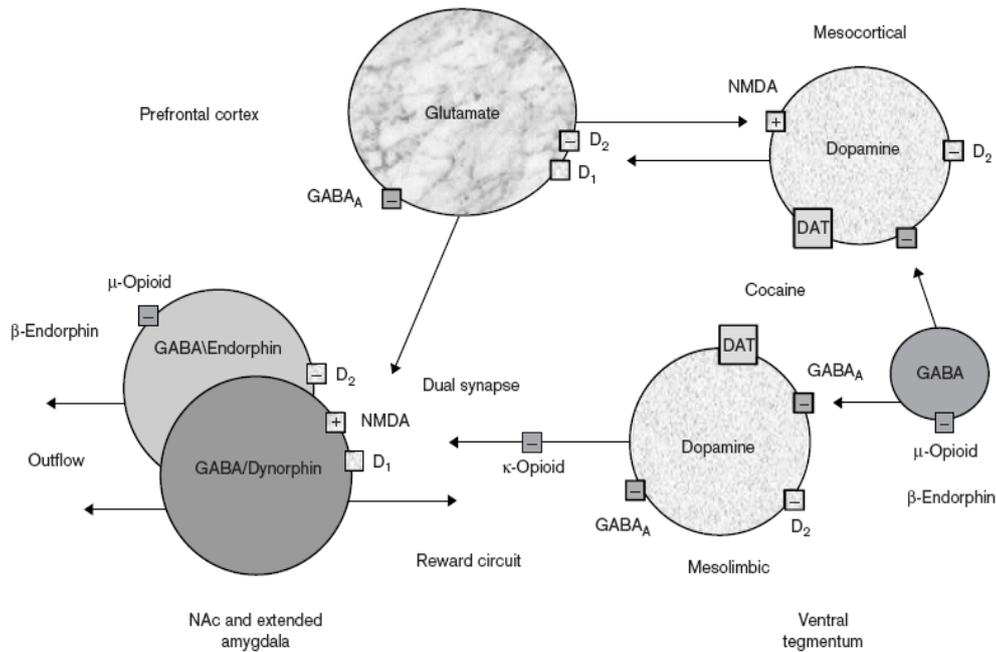


Fig. 15. Interrelación del sistema opioide, sistema dopaminérgico y otros sistemas en la adicción a la cocaína. Los receptores opioides se localizan a nivel de soma de las neuronas del área tegmental ventral y las terminales nerviosas pre y post sinápticas en el núcleo *accumbens*. Tomado de Dackis y O'Brien, 2002.

La cocaína a través de la inhibición del transporte de la dopamina y la continua activación de los receptores dopaminérgicos puede inducir la activación de los receptores opioides delta, y en consecuencia, aumenta el estrés durante la abstinencia a la cocaína (Ambrose-Lanci y cols., 2008). Esto sugiere la posibilidad de utilizar antagonistas opioides delta para disminuir los efectos del síndrome de abstinencia provocado por la cocaína. Por otro lado, el receptor opioide kappa y su ligando endógeno, la dinorfina, están implicados en la búsqueda impulsiva de cocaína tras una exposición previa a la droga. Un antagonista kappa podría atenuar los efectos de la abstinencia (Redfía y Chavkin, 2008). Otros estudios muestran un aumento de síntesis de péptidos opioides endógenos y el receptor opioide mu tras la administración de cocaína, contribuyendo a la sensación de recompensa

(Soderman y Unterwald, 2008).

En el caso del sistema de las taquiquininas, diversas investigaciones sugieren que la SP y su principal receptor NK1 juegan un rol en el proceso de la adicción de opioides y de la cocaína (Commons., 2009). La SP como la cocaína producirían un efecto similar en el aumento de los niveles de la dopamina en el espacio sináptico (Kombian y cols., 2009), este aumento de dopamina sobre activará receptores dopaminérgicos que en última instancia son los que están más relacionados con la adicción a nivel del núcleo *accumbens*. Este aumento de la cantidad de dopamina en el espacio sináptico estaría mediado por la activación del receptor NK1 por la SP (Kombian y cols., 2009) (Fig. 16).

Los receptores opioides así como la SP pueden ser regulados por acción de la cocaína así como también por ciertos miRNAs, let-7d y miR-206. Esta regulación puede inducir a una alteración de la expresión de los receptores opioides y de las neuroquininas que puede traducirse en la afectación de los procesos de la sensación dolorosa y la adicción. Estas posibles interacciones entre la cocaína, miRNAs, receptores opioides y de neurocininas nos permitirán comprender como la cocaína puede afectar la sensación dolorosa y la adicción.

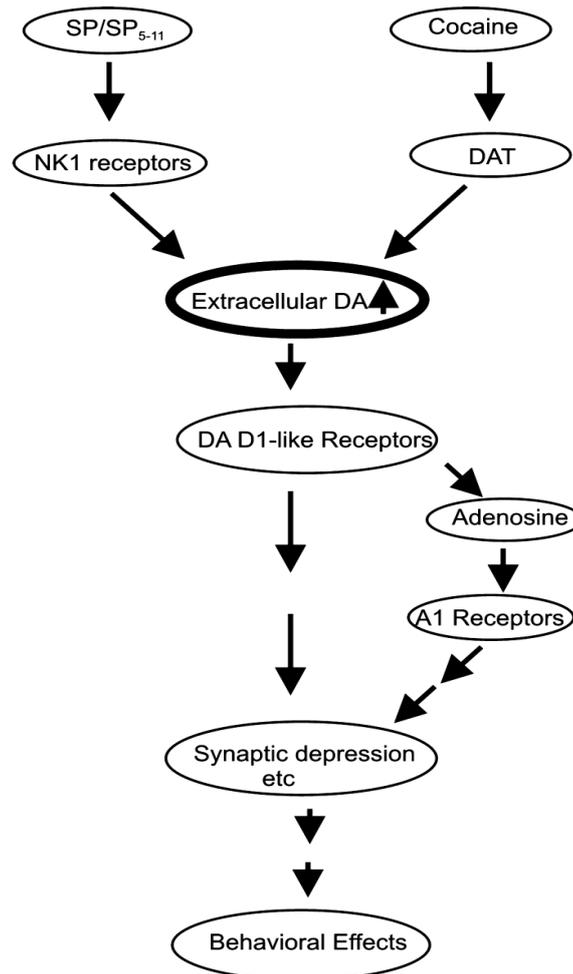


Fig. 16. Representación esquemática de la interrelación del sistema de las taquiquininas y la cocaína. Tanto la sustancia P y la cocaína aumentan la cantidad de dopamina en el espacio extracelular. Tomado de Kombian y cols., 2009.

### 1.9 El pez cebra como modelo de estudio

Hay controversias sobre si el pez cebra es un buen modelo experimental para el estudio de muchas enfermedades y diversos procesos fisiopatológicos en humanos. Puesto que un modelo debe reproducir exactamente todas las alteraciones que se encuentran en humanos y nos debe aportar datos que nos sirvan para mejorar la comprensión y el tratamiento de la enfermedad. En el caso del pez cebra este animal nos ofrece una alternativa al estudio de muchas patologías, pero no reproduce fidedignamente lo ocurrido en los humanos, por lo

que el término más adecuado sería el de herramienta de estudio que nos permita comprender o mejorar el tratamiento de ciertas enfermedades o patologías. No obstante, de la discusión de si el pez cebra es un buen modelo o herramienta de estudio, lo cierto es que este animal nos está brindando valiosa información de los procesos fisiológicos y fisiopatológicos que se vienen dando durante el desarrollo embrionario y la vida adulta. Y siendo la mayoría de estos procesos por lo general conservados entre los vertebrados, en el presente trabajo emplearemos el término de modelo experimental por la información que nos puede aportar el pez cebra para la comprensión de diversos procesos biológicos, fisiológicos, fisiopatológicos, terapéuticos, etc.

El pez cebra ha sido utilizado como modelo experimental para estudiar el desarrollo embrionario de los vertebrados ya que presenta una serie de ventajas sobre otros organismos que son utilizados como modelos experimentales, siendo relativamente fácil el manejo de sus embriones y la realización de sondeos genéticos que revelan las etapas y mecanismos de la embriogénesis. Actualmente se han empezado a aplicar los sondeos genéticos para el estudio de enfermedades humanas en el pez cebra y los resultados son ciertamente alentadores: determinadas mutaciones provocadas en el pez cebra mimetizan el fenotipo descrito en varios desórdenes que afectan al ser humano (Dooley y Zon, 2000). Por ejemplo, algunas de las mutaciones observadas afectan al desarrollo normal del corazón alterando su contractilidad pero sin modificar su morfología, de manera que imita la cardiomiopatía dilatada (Xu y cols., 2002). Asimismo, en los últimos años el pez cebra está siendo utilizado como organismo modelo para el descubrimiento y validación de nuevas dianas farmacológicas, así como en la búsqueda de nuevas drogas y estudios toxicológicos (Goldsmith, 2004). Por las ventajas que presenta el pez cebra, la industria farmacéutica está empezando a

explotar las semejanzas en regiones de unión a determinados fármacos y drogas entre las proteínas del ser humano y el pez cebra para el desarrollo de nuevas y mejores estrategias terapéuticas (Guo, 2004). Debido a su capacidad para incorporar moléculas disueltas en agua, el pez cebra puede emplearse para estudiar las interacciones entre el genoma y el medio ambiente (Fig. 17); puesto que los embriones modifican su comportamiento tras la ingesta de alcohol o cocaína (Dooley y Zon, 2000; Fishman, 2001; López-Patiño y cols., 2008).



Fig. 17. Peces cebra adultos. Las hembras se distinguen de los machos porque presentan una prominencia abdominal, mientras que los machos son delgados y mucho más estilizados que las hembras. En la parte superior de la foto se aprecia a un macho y en la inferior a una hembra. Los peces cebra a partir de los tres meses de edad ya son potencialmente fértiles

Varios autores ya han propuesto al pez cebra como un modelo para el análisis biológico de los efectos de diversas drogas como el alcohol (Gerlai y cols., 2000; Dlugos y Rabin, 2003) y la cocaína (Darland y Dowling, 2001), obteniendo resultados parecidos a los encontrados en ratones (Anichtchik y cols., 2004). Además, el pez cebra es un organismo en el que se pueden realizar análisis químicos de moléculas de bajo peso molecular, evitando el efecto materno que puede alterar los resultados si el mismo análisis se realiza sobre animales con desarrollo intrauterino (Pichler y cols., 2003) (Fig. 18). Por ello, este modelo es adecuado para realizar ensayos preclínicos frente a agentes tóxicos, y puesto que

los embriones y adultos modifican su comportamiento tras la exposición de cocaína (Darland y Dowling, 2001; Shang y cols., 2007; López-Patiño y cols., 2008a,b), el pez cebra podría ser utilizado como modelo para el estudio del fenómeno de la adicción.

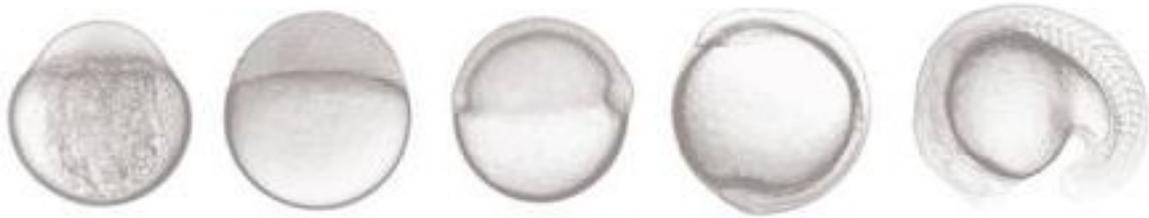


Fig. 18. Diferentes estadios de desarrollo del pez cebra en el que se puede apreciar que completamente transparentes, lo que le otorga muchas ventajas a este organismo para el estudio de diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

### 1.9.1 El pez cebra como modelo para estudio del dolor

Estudios en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) demostraron que esta especie tiene principalmente fibras A $\delta$  como aferentes somato sensoriales, mientras que las fibras C se encontraron en nervios trigeminales (Sneddon, 2003). La trucha arco iris posee nociceptores que detectan estímulos nocivos y el comportamiento y la fisiología de la trucha son adversamente afectados por estímulos que se conoce son dolorosos en humanos (Sneddon, 2003; Sneddon, 2004; Sneddon, 2009).

Estudios de comportamiento en peces mostraron que estos aprenden a evitar efectos nocivos y aversivos como el shock eléctrico, aunque los peces a quienes se les administró morfina fracasaron en aprender evitar el shock eléctrico (Ehrensing y cols., 1982). Una desventaja o ventaja de los peces es que el porcentaje de fibras A-delta (25%) es mayor con respecto a las fibras C (4%) en el nervio trigeminal (Sneddon, 2003). Esto indica que las fibras A $\delta$  predominan en la trucha arco iris y

los efectos de comportamiento a estímulos nocivos, así como veneno de abeja, fueron prolongados aproximadamente por 3 horas. Por lo que en teleósteos, las fibras A $\delta$  potencialmente tienen un rol dual, mediando los reflejos de comportamiento de escape o evitación, así como en la aparición de los estímulos prolongados (Sneddon, 2002). En anfibios, aves y mamíferos la proporción de fibras C está comprendido entre 50 a 65% del total (Lynn, 1994). Esto sugiere que las altas proporciones de fibras C en vertebrados superiores sea debido a la evolución de las especies y a las adaptaciones que han tenido que hacer ciertas especies en lograr vivir en la tierra les ha permitido incrementar la cantidad de fibras C por el incremento de injurias al que serán expuestos (Sneddon, 2003; Sneddon, 2004). En el medio acuático el entorno otorga cierta protección frente a potenciales sustancias que el medio terrestre al ser concentradas pueden producir más daño, ya que en el agua estas pueden diluirse y no causar daños significativos (Sneddon, 2003; Sneddon, 2004). En la trucha arco iris, la inyección subcutánea de ácido acético (0.1%) indujo comportamientos anómalos, como el de frotar la zona donde se administró la solución ácida y de incrementar la frecuencia respiratoria, lo cual no se observó en el grupo control. La administración de morfina aminora las acciones antes descritas (Sneddon, 2003; Sneddon, 2004), sugiriendo que la analgesia producida en la trucha arco iris estaría mediada por receptores opioides. Es muy interesante poder determinar en otros mamíferos acuáticos si poseen fibras C similares o diferentes a los vertebrados terrestres. Aunque la percepción del dolor en los peces es bastante controversial (Machin, 2001; Weber, 2011).

Estudios realizados en carpín (*Carassius auratus*) mostraron que el incremento de calor indujo una respuesta de escape donde la morfina no produjo respuestas analgésicas, pero si modificó el comportamiento de evitación al estímulo nocivo (Nordgreen y cols., 2009). Estos encuentros muestran que el carpín así como las

aves, reptiles y los mamíferos perciben el calor como nocivo, y que las respuestas de evitación observadas fueron causadas por activación de nociceptores sensitivos al calor (Nordgreen y cols., 2009).

### **1.10 Aportaciones de nuestro grupo de investigación al tema objeto de estudio**

La clonación y caracterización del sistema opioide endógeno, así como de los receptores cannabinoides en el pez cebra, y sus trabajos han demostrado la idoneidad del pez cebra como modelo para el estudio del entramado bioquímico tanto del dolor como de la tolerancia y dependencia a drogas, que pueden dar lugar a la adicción. A modo de resumen podemos detallar que en los últimos años se han clonado en nuestro laboratorio cinco receptores de pez cebra semejantes a los receptores opioides de mamíferos: ZfDOR1 (ZFOR1) (Zebrafish Opioid Receptor 1), que presenta homología con el receptor opioide delta de mamíferos (Barrallo y cols., 1998a y 1998b; Rodríguez y cols., 2000); ZfMOR (ZFOR2), que presenta homología con el receptor opioide mu (Barrallo y cols., 2000); ZfKOR (ZFOR3), que presenta homología con el receptor opioide kappa (Álvarez, y cols., 2006); ZfDOR2 (ZFOR4), que es un duplicado de ZfDOR1 (Pinal-Seoane y cols., 2006) y ZfORL, que presenta homología con el receptor ORL, hoy denominado receptor de nociceptina, (Rivas-Boyero y cols., 2011). También se han identificado los precursores de los ligandos endógenos opioides correspondientes a dichos receptores, con el objeto de profundizar en la funcionalidad del sistema opioide en este organismo modelo (González-Núñez y cols., 2003 a, b). Se ha estudiado también la expresión espacial y temporal de los receptores opioides y de nociceptina durante los diferentes estadios embrionarios del pez cebra (Sánchez-Simón y Rodríguez, 2008; Sánchez-Simón y Rodríguez, 2009) y la realización del

análisis funcional del receptor opioide mu (Marrón-Fernández y Rodríguez, 2009). Finalmente, nos hemos introducido en el estudio de los miRNAs y se ha relacionado al mir-133b en la regulación del sistema opioide y dopaminérgico (Sánchez-Simón y cols., 2010).

Dada la importancia y el impacto en el tratamiento de la adicción que la relación entre opioides y cocaína podría tener, nos hemos propuesto realizar un estudio más amplio y profundo sobre la alteración en los niveles de transcripción de los receptores opioides y de las neurocininas (también llamados neuroquininas) en la regulación de la adicción a la cocaína y el dolor con el objetivo de mejorar la comprensión del complejo mecanismo y entramado bioquímico que presenta la cocaína.

## **Hipótesis y Objetivos**



## 2. Hipótesis y Objetivos

La cocaína es una de las drogas ilícitas más consumidas y que más problemas ocasiona como consecuencia de la adicción, que produce (Somaini, 2011) fundamentalmente a nivel psicológico. La cocaína puede influir en la transcripción de los genes que codifican los receptores y los precursores opioides, receptores de neurocininas, dopaminérgicos, serotoninérgicos, etc. afectando así a los procesos de plasticidad neuronal. Debido a que el consumo de las sustancias adictivas como la cocaína es de forma crónica es evidente que la cocaína puede inducir cambios en la expresión de receptores opioides y de neuroquininas así como de otros receptores en el SNC. Por lo mencionado se hace necesario un mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares relacionados con la cocaína.

Teniendo en cuenta la conexión entre la adicción a la cocaína y la activación del sistema opioide endógeno, de las neuroquininas y la viabilidad del pez cebra como modelo de estudio de adicción y de dolor planteamos como hipótesis de este trabajo que la cocaína produce una alteración de la expresión de receptores opioides y de las neurocininas durante el desarrollo embrionario del pez cebra. La implicación del sistema opioide y de las neurocininas en la regulación de la adicción y el dolor por la cocaína nos ayudará a entender mejor las acciones que produce la cocaína y así buscar o diseñar tratamientos más apropiados contra la adicción

Para corroborar esta hipótesis, delineamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de la cocaína sobre la expresión de los receptores opioides en el pez cebra.
  - 1.1. Determinar el efecto de la cocaína en la expresión de los receptores opioides en diferentes estadios embrionarios.
  - 1.2. Estudiar la expresión espacial y temporal de los reguladores de la expresión

de los receptores opioides: microRNA, let-7d.

- 1.3. Estudiar la expresión de dre-let7d tras la exposición de cocaína.
2. Estudiar la acción de la cocaína en la proliferación celular y apoptosis.
3. Estudio de la microinyección de morfolidos de los receptores opioides y la expresión de dre-let-7d.
4. Determinar la existencia de la sustancia P y sus receptores en el pez cebra
  - 4.1. Clonar la sustancia P y su receptor en el pez cebra.
  - 4.2. Determinar la posible existencia de duplicados de sustancia P y su receptor en el pez cebra.
  - 4.3. Estudiar la expresión espacial y temporal de la sustancia P y sus receptores en el pez cebra.
  - 4.4. Conseguir un sistema de expresión estable de la sustancia P y sus receptores en una línea celular.
5. Efecto de la cocaína sobre la expresión de la sustancia P y sus receptores.
6. Efecto de la cocaína sobre la expresión del mir-206, modulador de la expresión de la sustancia P.
7. Estudio de la microinyección de morfolidos de los receptores opioides y la expresión de la sustancia P y sus receptores.

## **Material y Métodos**



### 3.1 Animales de experimentación

Se utilizaron peces cebra adultos (estirpe AB) procedentes de la Universidad de Oregón (The Zebrafish International Resource Center), Estados Unidos. La estirpe AB es la más utilizada en la mayoría de investigaciones experimentales por estar libre de mutaciones letales. Los peces cebra adultos fueron mantenidos en peceras de 25L (Zebrafish Biolabs, Madrid) en las instalaciones del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL) (Universidad de Salamanca), el fotoperiodo en el mantenimiento de los peces fue de 12h:12h de luz-oscuridad. Las larvas, alevines y los juveniles se mantienen en peceras de menor tamaño (6 L) con una bomba de aire y calentador (25-26°C). Los peces se alimentan tres veces al día: una con alimento seco y dos con alimento vivo (*Artemia franciscana*). La calidad del agua se evaluó por evaluaciones periódicas de pH, nitritos, nitratos, amonio y cloro. Los embriones del presente trabajo de investigación fueron obtenidos de la cría natural en parideras de una hembra y un macho de pez cebra. En este trabajo, hemos utilizado embriones fertilizados (provenientes de los peces de Oregon), que fueron seleccionados mediante un microscopio estereoscópico (Leica Z2000, Nussloch, Alemania), y mantenidos en una incubadora a 28,5 ° C, en placas Petri y placas multipocillos en un medio E3 estéril (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl, 0,33 mM de MgSO<sub>4</sub> en agua destilada; Sigma, Madrid, España). Las etapas de desarrollo de los embriones se determinaron como las horas posteriores a la fecundación (hpf). Todos los procedimientos y protocolos experimentales fueron de acuerdo con las directrices aprobadas en la *European Communities Council Directiva* el 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE), la legislación española vigente (BOE 67/8509-12, 1998) y siguiendo la Guía para el Cuidado y uso de animales de laboratorio con las adaptaciones y promulgada por el Instituto Nacional de Salud (INH) (USA).

### 3.2 Exposición de clorhidrato de cocaína a embriones de peces cebra

Con el fin de observar si la cocaína tiene efectos en la expresión de los genes de los receptores opioides y de las neurocininas, sin producir malformaciones importantes y la muerte en los embriones, expusimos a 1,5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína. La dosis fue seleccionada porque se encuentra en el rango de las concentraciones halladas en plasma humano (Mendelson y cols., 2003) y en el cordón umbilical de neonatos (Dempsey et al, 1999). Además, 1.5  $\mu$ M de cocaína no produjo efectos anestésicos en peces cebra adultos (López-Patiño y cols., 2008a,b), lo cual pudimos corroborar en embriones de pez cebra. El clorhidrato de cocaína empleado en el presente trabajo fue proporcionado por el Dr. Luis Fernando Alguacil de la Universidad CEU San Pablo, Madrid-España. Los embriones de peces cebra a las 5 hpf se expusieron a 1,5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína y cuyo estos embriones alcanzaron las 8, 16, 24, 48 y 72 hpf (Fig. 24), estos se recolectaron para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA.

Para el estudio del miRNA, dre-let-7d y sus precursores, el tratamiento de la cocaína fue a las 5 hpf y posteriormente los embriones fueron recolectados a las 24 y 48 hpf. Se eligió el estadio de 5 hpf de desarrollo (transición midblástula, como punto de inicio del tratamiento farmacológico, ya que a partir de ese momento ha finalizado la fase crítica del desarrollo embrionario. De esta forma se evitan malformaciones y mutaciones, que suelen ser frecuentes durante el inicio del desarrollo cuyo el embrión es expuesto a cualquier sustancia exógena.

En el caso del estudio de las neuroquininas, los embriones de pez cebra de 5 hpf fueron expuestos a 1,5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína y posteriormente a las 24 y las 48 hpf estos fueron recolectados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA.

### 3.3 Exposición de Células HEK-293 a cocaína

Las células HEK-293 no expresan los receptores de neurocinina (NK1R) del pez cebra por ello, con el objetivo de evaluar la expresión de los receptores de neurocinina propiamente dicho decidimos transfectar los receptores NK1 del pez cebra en células HEK-293. Las células humanas HEK-293 transfectadas con los receptores de Nk1 del pez cebra fueron tratadas con cocaína a la misma concentración que se empleó en el tratamiento de los embriones de peces cebra, 1.5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína. Las células HEK-293 transfectadas fueron tratadas durante 24 h. Previo a la exposición de clorhidrato de cocaína, determinamos que esta concentración mencionada no presentaba efectos tóxicos y alteración en el desarrollo de las células de cultivo.

### 3.4 Extracción de RNA total de embriones de pez cebra

Para el estudio de la expresión de los receptores opioides establecimos cinco grupos experimentales (8, 16, 24, 48 y 72 hpf) cada grupo experimental con su respectivo grupo control (embriones no expuestos a cocaína) en cada etapa de desarrollo. En el caso de dre-let-7d y sus precursores se estudió a las 24 y 48 hpf (grupos de tratamiento y control). Doscientos cincuenta embriones se utilizaron entre las 8-24 hpf y doscientos entre las 48-72 hpf (grupos experimentales y grupo control). Para la extracción de RNA total de tejido se empleó una modificación del método de Chomczynski y Sacchi. (1987), utilizando el reactivo Trizol™ (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA, EE.UU.) como reactivo para aislar el RNA total. El RNA total, incluyendo el miRNA, se extrajo utilizando el reactivo Trizol siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes y adaptado para los peces y embriones de peces cebra. Se utilizó 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido, y se procedió a la homogeneización del mismo mediante el empleo de pistilos y por pipeteo. Tras incubar el preparado durante 5

min a temperatura ambiente, se realizó una extracción selectiva del RNA por separación de fases mediante la adición de 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol inicial y centrifugación a 12000 g durante 15 min a 4 °C. El RNA obtenido en la fase acuosa se precipitó con un volumen de isopropanol igual a la mitad del Trizol utilizado en el primer paso y se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C. A continuación tras retirar el isopropanol, el *pellet* obtenido se lavó con un volumen de etanol 70 % igual al de Trizol utilizado en el primer paso y se centrifugó a 7000 g durante 5 min a 4 °C. Posteriormente, después de eliminar el sobrenadante y secar el RNA para eliminar cualquier resto de etanol, se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato 0,1%, Sigma), incubando a 60°C durante 10 min, para favorecer la disolución del *pellet*.

### 3.5 Tratamiento de RNA total con DNasa I

Los RNA obtenidos de las muestras fueron tratados con DNasa I (Roche, Madrid-España) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Aproximadamente 10-15 µg de RNA en 20.5 µl de RNA total, se trata con 1 µl de DNasa I 10 U/µl ( $10 \times 10^3$  units) y 2.5 µl de buffer de DNasa I 10X (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.9). Esta reacción se incubó a 37°C durante 15 min. La DNasa I requiere de cationes divalentes para su máxima actividad (activado por iones de magnesio y estimulado por iones de calcio), posteriormente con la finalidad de disminuir la actividad de la endonucleasa se añadió 1 µl de EDTA 0.2M (agente quelante que inhibe la actividad enzimática) y para inactivar completamente la actividad de la endonucleasa se incubó la reacción durante 10 min a 75°C.

### 3.6 Cuantificación de las muestras de RNA

La concentración del RNA se determinó por espectrofotometría con un equipo NanoDrop (NanoDrop 2000C espectrofotómetro, Thermo Scientific)

espectrofotometría a 260 nm, realizándose tres cuantificaciones y tomándose el promedio como valor de trabajo para los distintos experimentos. En todas las mediciones se comprobó que la relación A260/280 se encontrase cercana a 2, correspondiente a muestras puras de RNA.

### **3.7 Extracción de RNA total de células en cultivo**

Para la extracción de RNA a partir células en cultivo se partió de una placa de 24 pocillos utilizando un pocillo para cada extracción (3,8 cm<sup>2</sup> de área de crecimiento). Las células con una confluencia aproximada del 80% se levantaron por pipeteo y se centrifugaron a 750 g durante 10 min. El pellet celular resultante se resuspendió en 1 ml de Trizol y se procedió de igual manera que en el protocolo de extracción de RNA.

### **3.8 Obtención de cDNA**

Para la obtención del cDNA (DNA copia) se utilizó el kit ImProm-IITM Reverse Transcripción System (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente se desnaturalizó por calor una mezcla de 2 µg de RNA total y 0.5 µg del oligonucleótido oligo-dT a 70 °C durante 5 min (el volumen de RNA y oligonucleótido dT debe alcanzar como máximo 5 µl), tras lo cual se enfrió rápidamente en hielo. Este paso evita las posibles estructuras secundarias que puedan aparecer en los RNA. Posteriormente a esta reacción se añadió una mezcla preparada previamente que contenía 1 µl de transcriptasa inversa ImProm-IITM, 4 µl de buffer 5X ImProm-IITM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, una mezcla de dNTP (desoxinucleósidos trifosfato) 0.67 mM, 20U del inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNasin® y agua libre de RNasas (ddH<sub>2</sub>O tratada con DEPC) hasta un volumen final de 15 µl. La reacción se sometió durante 5 min a 25 °C, lo que permite que el cebador anille con el RNA molde; posteriormente se incubó a 42 °C durante 1 h, para que la retrotranscriptasa sintetice el cDNA. Finalmente la

enzima se inactivó incubando 15 min a 70°C las mezclas de la reacción.

Para comprobar que la síntesis de cDNA se había realizado con éxito, se utilizaron controles positivos de la técnica, es decir, genes que se expresan de forma constitutiva y nos permiten confirmar que el proceso de síntesis de cDNA se ha llevado a cabo de forma adecuada. En el caso del cDNA procedente de RNA de tejido de pez cebra se utilizó la amplificación del factor de elongación translacional de proteínas (EF1a),  $\beta$ -actina y la subunidad ribosomal 13. (rbp13). En el caso de cDNA sintetizado a partir del RNA de las células HEK-293 se amplificó la GAPDH humana (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa). También se llevaron a cabo controles negativos de la síntesis de cDNA para ello sustituimos el RNA por agua libre de RNAsas; de esta forma nos aseguramos que la síntesis de cDNA únicamente se lleva a cabo por la presencia del RNA de interés.

### **3.9 Síntesis de cDNA de microRNAs**

La síntesis de cDNA fue realizado empleando el kit de NCode™ miRNA First-Stry cDNA Synthesis (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. En primer lugar se incuba durante 15 min a 37°C una mezcla formada por 3  $\mu$ l de RNA total, 5  $\mu$ l de tampón de síntesis, 2,5  $\mu$ l de cloruro de magnesio, 1  $\mu$ l de ATP, 0,5  $\mu$ l de de polimerasa A y 13  $\mu$ l de agua libre de RNasa (DEPC), hasta completar un volumen 25  $\mu$ l. Siguiendo el protocolo, se añaden 4  $\mu$ l de la reacción anterior a 3  $\mu$ l del oligonucleótido universal y 1  $\mu$ l de tampón de hibridación, esta reacción se deja incubar por 5 minutos a 65°C. Finalizada esta reacción, se añaden 10  $\mu$ l de tampón de extensión y 2  $\mu$ l de retrotranscriptasa y se incuba durante 50 min a 50°C. Para concluir, se incrementa la temperatura de la reacción a 80°C durante 5 min con el fin de inactivar las enzimas que puedan inhibir los procesos

posteriores en la realización de la PCR a tiempo real (qPCR).

### 3.10 Tratamiento de cDNA con RNasa A

Las muestras de cDNA obtenidas fueron tratadas con RNasa A (20 ng / L para 15-20 µg de cDNA) durante 20 minutos a 37°C con el fin de eliminar los diferentes tipos de RNA (mensajero, ribosomal, de interferencia que pudiese encontrarse). Como el cDNA es un híbrido de doble cadena (DNA-RNA), la RNasa A no actúa sobre estas moléculas. Con el fin de eliminar la RNasa A, la reacción que se incubó previamente fueron purificados por columnas de sílice (QIAquick kit de purificación de PCR, QIAGEN). Para la purificación de cDNA se agrega 5 veces el volumen de tampón de unión (PB, Binding Buffer) y 1 volumen de isopropanol. La reacción formada se traslada a las columnas de sílice y se centrifuga durante 1 min a 13000 rpm (el resto de centrifugaciones se llevó a cabo a esta velocidad). Luego se añade 750 µl del tampón PE y se centrifugó. Nuevamente se centrifuga las columnas de sílice (descartado el volumen filtrado) con el objeto de eliminar restos del tampón PE. Finalmente, se añadió entre 30-35 µl de agua libre de nucleasas. La concentración del cDNA se determinó utilizando el equipo de NanoDrop (NanoDrop 2000C espectrofotómetro, Thermo Scientific), espectrofotometría a 260 nm, realizándose tres cuantificaciones y tomándose el promedio como valor de trabajo para los experimentos posteriores. En todas las mediciones se comprobó que la relación A260/280 se encontrase cercana a 1.8.

### 3.11 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando tres kits de PCR de acuerdo a las necesidades requeridas:

- ❖ *Master Mix* (Promega). Para ello, se mezclaron la mitad del volumen de la solución *Master Mix* 2X (tampón de la polimerasa pH 8.5, MgCl<sub>2</sub> 3 mM,

dNTPs 400  $\mu$ M, Taq DNA polimerasa 50 U/ml), 100 ng de DNA y 0.1-1  $\mu$ M de cada oligonucleótido. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 o 50  $\mu$ l. Este *kit* se utilizó para poner a punto las PCR de los oligonucleótidos de los genes empleados.

- ❖ *Amplitaq gold*, *Gene Amp* (que presentan una mejor eficiencia con respecto al *kit Master mix* de Promega) y *TaKaRa LA Taq™* que es una DNA polimerasa termoestable con actividad de lectura mejorada, además (bajo condiciones generales de PCR) *TaKaRa LA Taq™* tiene una alta eficiencia y fidelidad comparados con otras Taq DNA polimerasas.

Estos últimos tres kits se utilizaron para las PCR de fragmentos de más de 1000 pares de bases (ya que cometen menos error en la síntesis de DNA) para la clonación de los receptores opioides y de los receptores de las neuroquininas.

Los oligonucleótidos fueron suministrados por Invitrogen de forma liofilizada siendo reconstituidos con agua estéril libre de RNasas (Promega). Primero se obtuvo un stock a una concentración 100  $\mu$ M y posteriormente se hicieron alícuotas de trabajo de 10  $\mu$ M que se conservaron a -20 °C. En todos los casos se realizó una reacción sin DNA molde como control negativo y otra utilizando el control negativo de la síntesis de cDNA. La reacción de amplificación se llevó a cabo empleando el termociclador Perkin Elmer (Geneamp® PCR system 9700) y Veriti (Applied Biosystem®).

El programa utilizado para la amplificación fue el siguiente: un paso inicial de 94°C durante 5 min para permitir una desnaturalización completa de todas las hebras de cDNA. Este paso va seguido de 30 ciclos con la siguiente secuencia: 94°C durante 30 s para permitir la desnaturalización de las hebras de DNA, 55-60°C durante 30 s para permitir el anillamiento de los oligonucleótidos a las cadenas molde y 72°C durante otros 30 s para permitir la síntesis por parte de la

polimerasa. Una vez finalizados los 30 ciclos se añade un paso más de 72°C durante 10 min. Para garantizar que la polimerasa haya añadido una adenina terminal a todas las copias sintetizadas. Este hecho es de gran utilidad en el momento de clonar los productos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en vectores, como se explicará posteriormente. De forma esquemática el programa utilizado se puede representar como: 94°C, 5 min; 30 ciclos (94°C, 30 s; 55-64°C, 30 s; 72°C, 30 s); 72°C, 10min. Los cebadores utilizados y sus respectivos amplicones y las temperaturas de anillamiento se detallan en la tabla de oligonucleótidos empleados durante la presente investigación (Tabla 6 y 7).

Tabla 6. Oligonucleótidos para realizar las PCR y qPCR

	Gen	Forward	Reverse	Ta(°C)	Amplificación
Oligonucleotidos de qPCR	EF1 $\alpha$	GTACTTCTCAGGCTGACTGTG	ACGATCAGCTGTTTCACTCC	55	136
	Rbpl13a	TGGAGGACTGTAAGAGGTATGCTT	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	55	148
	B-actin	ACCACGGCCGAAAGAGAA	ATACCCAGGAAGGAAGGCTG	55	206
	ZfMOR	ACGAGCTGTGCA AGATTGTG	CCGATTGCAGATGAAAGGAT	55	187
	ZfDOR1	ACTATGAGAG CGTGGACCGTT	GCGGAGGAGAGGATCCAGAT	55	116
	ZfDOR2	TCAGG CAAAACAATCTGCATG	CAGGATCATCAGGCCGTAGC	55	138
	dre-let-7d-1	CGGTGTGAGGTAGTTGGTTGTAT	Universal qPCR Primer*	57	
	dre-let-7d-2	GTAGTTGGTTGTATGGTTTTGCATC	Universal qPCR Primer*	57	
	dre-let-7d	TGAGGTAGTTGGTTGTATGGTT	Universal qPCR Primer*	57	
	ago 2	CACCACAAGAATATGTCTTCAAACCA	ACCATGTGCTCAACTATTTACAG	58	187
	dicer	TCAGGTTGAACTTCTGAAGCAG	CTGAGCCACAGATGACGCT	58	175
	drosha	CTGAGAGACTTCGGCACCA	TCTCTGCTGCGGTGTCTC	58	199
clonación de receptores opioides	ZfMOR	CACCGAACGCACCTTGCCATGA	GTGATGACATCTCCAGGACTAG	55	1194
	ZfDOR1	ATGGAGCCGTCGGTCATTCCCG	CCCGTGGATCCTGTCCAGGCC	55	1144
	ZfDOR2	ATGGAGCCTCCAACAGTGAC	TCATGTGGGCTGCTTGATTG	58	1122
	ZfMOR-3UTR	GCAGGTATGACTAGTCTGGAG	TACTTGGCAGTCTGCGAGAAC	60	1040

\* Universal qPCR Primer NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR Kits (Invitrogen)

Tabla 6. Oligonucleótidos empleados para realizar la PCR convencionales y las qPCR de los receptores opioides, dre-let-7d y sus precursores y los genes de referencia. Se muestran de cada cebador las temperaturas de anillamiento usadas (Ta). Forward y Reverse (términos empleados de la terminología anglosajona).

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para las taquicinas

Gen	Forward	Reverse	Amplicon	Ta
<i>ef1a</i>	GTACTTCTCAGGCTGACTGTG	ACGATCAGCTGTTTCACTCC	136	55
<i>sp</i> (qPCR)	CAGTCGGATCCTTTCAGGGA	CGTTTCCCACATCAGACCGA	83	60
<i>sp</i> (ISH)	CGTTCAACATACTCGAACAAAACG	CGTTTCCCACATCAGACCGA	299	64
<i>ytac1</i>	CGTTCAACATACTCGAACAAAACG	CTCAGCCATATCACCACAATGTC	564	64
mir-206-1	GCTCAAGTTATGGAATGTAAGGAAG	oligo universal*		58
mir-206-2	TGTAAGGAAGTGTGTGGCTTCA	oligo universal*		58
mir-206	TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG	oligo universal*		58
<i>nk1a</i> (qPCR)	CGCTATTGCGCTCGACAGA	GAGTGTACTCGGGCCAGT	194	55
<i>nk1b</i> (qPCR)	CCTGCTGGCTCCCCTATCA	GAATCCCGCTCGAAACCT	173	55
<i>nk1a</i> (ribosonda)	CCTCCAGTCAAGAAACAATCGCT	GGTTGGCATTGTTTTCCATGAC	1364	59
<i>nk1b</i> (ribosonda)	ACTGTGCGCGCGTTTGGAGA	ACCGTTTTGGAGCTCACTAGC	1506	62
<i>nk1a</i> (intermedio)	TCCTCCCTCTCCTGGTGATG	CATCACCAGGAGAGGGAGGA		62
<i>nk1b</i> (intermedio)	ACATTAAGTGGCCGGAATACAGCA	TGCTGTATTCCGGCCAGTTAATGT		62
Nk1a-pEGFP-C3	*ctgta <u>CTCGAGG</u> ATTTCGTTCACTACTCC <sup>1</sup>	*tcgta <u>GGTACC</u> TCATTTCCTGTAGGTTATTAC <sup>2</sup>	1278	64
Nk1b-pDsRED1-N1	*tgata <u>AAGCTT</u> ATGGATCCGCTGTACATCAC <sup>3</sup>	*agata <u>CCGCGG</u> TGCTACGTTGTTACTGGAAT <sup>4</sup>	1236	64
<i>GADPH</i>	ATGAGAAGTATGACAACAGCCT	CAGTGATGGCATGGACTGTG	138	57

\* Universal qPCR Primer NCodeTM miRNA First-Strand cDNA Synthesis and qRT-PCR Kits (Invitrogen)

\*\* Las letras en minúscula al inicio de cada secuencia de oligonucleótidos fueron agregados para permitir el reconocimiento de las enzimas de restricción

1 y 2 secuencias de nucleótidos subrayados que son específicos para el reconocimiento de las enzimas de restricción XhoI y KpnI, respectivamente

3 y 4 secuencias de nucleótidos subrayados que son específicos para el reconocimiento de las enzimas de restricción HindIII y SacII, respectivamente

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para realizar la PCR convencionales y las qPCR de la TAC1 en el pez cebra y los receptores de neuroquininas, mir-206 y sus precursores. Se muestran de cada cebador las temperaturas de anillamiento usadas (Ta). Forward y Reverse (términos empleados de la terminología anglosajona).

### 3.12 PCR a Tiempo real (qPCR)

Para estudiar la expresión temporal de los receptores opioides, neuroquininas y microRNAs durante el desarrollo embrionario y la alteración que produce la administración crónica de clorhidrato de cocaína hemos empleado la técnica de PCR cuantitativa o PCR a tiempo real que ofrece mayores ventajas que la PCR básica como detección de concentraciones menores de producto de PCR, el resultado no se ve afectado por las bajas resoluciones que presentan los geles de agarosa, necesarios para visualizar la PCR básica y la característica esencial de la qPCR es la cuantificación absoluta en número de copias del transcrito del gen en estudio.

Para realizar la qPCR, primero se procedió a realizar la amplificación de los genes a estudiar por PCR *standard* (descrito en párrafos anteriores), para ello fue necesario en primer lugar obtener el producto por PCR para luego purificarlos por columnas (QIAGEN). Se amplificaron y purificaron los amplicones de los receptores opioides (ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfMOR), sustancia P (SP), receptores de neuroquinina (Nk1a y Nk1b), de los microRNAs (dre-let-7d, dre-let-7d-1, dre-let-7d2, miR-206, mir-206-1 y mir206-2) y del gen de referencia EF1 $\alpha$  (Tabla 6) que se utiliza como control positivo en su calidad de gen constitutivo, que se expresa igual en todas las células y se ha demostrado que muestra pocas variaciones tras las exposiciones de sustancias químicas o fármacos durante el desarrollo. Luego, es necesario poner a punto una recta patrón (standard curve) para cada uno de los genes de estudio descritos anteriormente. Para poner a punto la recta patrón se realizaron PCRs básicas con el termociclador GeneAmp (PCR System 9700) y Veriti (Applied Biosystem) para someterse el producto final de la reacción a electroforésis en un gel con 2% (amplicones de 100-300 nucleótidos) y de 0.5% (amplicones de 800 a 1500 nucleótidos) de agarosa BIORAD y 5  $\mu$ l de Red Safe

TM, un agente intercalante que permite visualizar el producto de reacción en el transiluminador (BIORAD), y recortamos dicho producto, que es purificado con el kit de extracción de PCR de geles (Gel Extraction kit de QIAGEN). Posteriormente, se cuantificó la concentración de cada producto, por triplicado y tomándose como valor el promedio de las lecturas de las muestras. De los DNA de obtenidos por PCR correspondiente a los receptores ZfDOR1, ZfDOR2, ZfMOR, SP, Nk1a Nk1b, dre-let-7d, dre-let-7d-1, dre-let-7d-2, dre-miR-206, mir-206-1 miR-206-2 y Ef1 $\alpha$ . Hacemos 10 diluciones 1/10 desde 0.1 ng/ml hasta 0.000000001 ng/ml. De los cuáles utilizamos 4 diluciones (0.01 ng/ml, 0.001 ng/ml, 0.0001 ng/ml y 0.00001 ng/ml). Según los resultados obtenidos de la qPCR diseñamos una recta patrón óptima para cada receptor, utilizando las diluciones seguidas con las que mejor pendiente se obtenga, (pendiente ideal de -3.3). Este número representa los ciclos de amplificación de diferencia en cruzar el umbral de fluorescencia propuesto por el programa automáticamente que se supone debe haber entre muestras cuyas concentraciones varían entre 1.0e+1. Una vez puesta a punto la recta patrón para cada receptor, se amplifica dicho receptor sobre 5 ng de cDNA de cada estadio embrionario de pez cebra.

Para realizar las qPCR a tiempo real, empleamos un agente intercalante que emite fluorescencia cuyo se une a DNA de doble cadena (el SYBR-Green). El SYBR-Green Power Master Mix® de Applied Biosystems (utilizando la detección del fluorocromo ROX como detector de fondo) contiene la DNA polimerasa AmpliTaq Gold, nucleótidos, Buffer, MgCl<sub>2</sub> y agua, todo en una concentración 2X, de manera que a cada reacción se añaden 10  $\mu$ l de SYBR-Green Power Master Mix®, 1  $\mu$ l de cDNA de concentración de 50 ng/ $\mu$ l, 1  $\mu$ l de oligonucleótido forward, 1  $\mu$ l de oligonucleótido reverse y 7  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. El programa que se empleó en el termociclador fue el siguiente: 50°C 2 min, 95°C 10 min y 36 ciclos de

95°C 15 s y 55°C 1 min. Todas las qPCR fueron realizadas por triplicado para cada muestra, y consideramos un mínimo de tres muestras y un máximo de 6.

### **3.13 Análisis de expresión de los receptores opioides y neuroquininas por qPCR**

El paquete informático que hemos utilizado para analizar los resultados establece una línea umbral a partir de la cual la cantidad de producto amplificado es suficientemente alta como para que el termociclador detecte fluorescencia producida por el SYBR-Green al unirse al DNA de doble cadena. El ciclo en el cual la reacción cruza este umbral se denomina valor Cq o ciclo de cuantificación (Bustin y cols., 2009). El valor Cq de las diluciones 1:10 a partir de las cuales se diseña la recta patrón para cada receptor debe diferenciarse en 3.3 ciclos, y por ello se considera este número como pendiente perfecta. Otro parámetro importante en el análisis de la cuantificación es el coeficiente de correlación (R2). Este valor indica la proximidad de las concentraciones resultantes entre sí en cada una de las reacciones que han tenido lugar considerándolas por triplicado. Mientras más se aproxime a 1, más fiable será el resultado final. A partir de la concentración que calcula el programa para cada muestra se puede hallar el número de copias de producto final de PCR (DNA) que hay en cada reacción mediante la fórmula siguiente:

1. Número de bases de la amplificación  $\times$  330 Da / base  $\times$  2 bases / par de bases (el producto purificado es de doble cadena de ADN) = X g / mol (peso de la amplificación).
2. Peso de la amplicon/ $6.023 \times 10^{23}$  = Y g / amplicón molécula.
3. Concentración de la dilución / Y g / amplicón molécula = Z moléculas / l.

### 3.14 Hibridación in situ (ISH) en embriones enteros

Embriones de peces cebra de las 24 y 48 hpf se decorionaron, luego fijados con 4% de PFA en PBS durante una noche a 4°C. Al día siguiente, se lavan dos veces en PBS (5 minutos cada uno), a temperatura ambiente. Finalmente, se mantienen las muestras en metanol absoluto a -20°C hasta su uso experimental. En el caso de embriones de 10 hpf, en primer lugar fijamos los huevos y luego se decorionaron para después conservarse en metanol a -20°C. Cuyo se continua con los experimentos de ISH los embriones se sacan de -20°C a temperatura ambiente por 10 minutos. Se rehidratan los embriones en diluciones sucesivas de metanol / PBS (75, 50 y 25%), de 5 minutos con cada dilución, y finalmente un lavado de 5 min repetido cuatro veces en el 100% PBT. Para permeabilizar los embriones, se utilizó la proteinasa K (10 µg/ml) a temperatura ambiente (TA) durante 2 min (10 hpf) 20 min (24 hpf) y 40 min (48 hpf). Se detuvo la digestión de proteinasa K mediante el lavado con PBST y luego se postfijó los embriones con 4% de PFA durante 30 minutos. Para eliminar el PFA residual se hicieron lavados de 5 min cuatro veces en 1x PBT. Después de 2 horas de pre-hibridación, las ribosondas de los receptores opioides ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2, SP, NK1a y NK1b se hibridaron durante toda la noche a 64°C. Al día siguiente, se realizaron lavados con la solución de prehibridación y TBS (50%/50%) por 20 minutos durante 2 horas. A continuación, los embriones fueron bloqueadas con tampón de bloqueo (suero de cabra + TBST) durante 2 h y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo contra antidigoxigenina conjugado a la fosfatasa alcalina (1:3000; Roche) a 4°C. El siguiente día, los embriones fueron lavados con la solución Xpho (1M Tris-HCl pH 9,5, MgCl<sub>2</sub> 1M, NaCl 4M y el 20% de Tween-20) durante 3 horas y, finalmente, la hibridación se desarrolló con NBT/BCIP (Roche) (preparación en fresco). La hibridación in situ del miRNA, dre-let-7 D (Exiqon), se realizó según el protocolo del

fabricante (miRCURY LNA™ sondas de detección microRNA para hibridación in situ, Exiqon).

### 3.15 Inmunohistoquímica (IHC)

La proliferación celular se analizó mediante la histona fosforilada-3 (H3P) como marcador de la división celular (Cui y cols., 2004) y el supresor de tumores p53 como un inductor de apoptosis de las células (Haupt y cols., 2003) en los embriones tratados con cocaína, con respecto al grupo control. Embriones a las 24 y las 48 hpf se fijó en el 4% PFA (Sigma) en tampón fosfato salino (PBS) durante la noche a 4°C y se almacenaron en metanol (Sigma) a -20 ° C. Cuyo llegó el momento de realizar los experimentos de IHC, los embriones fueron rehidratados en un 0,2% de PBS, dos veces durante 5 min. Cuyo se continua con los experimentos de IHC los embriones se sacan de -20°C a TA por 10 minutos. Se rehidratan los embriones en diluciones sucesivas de metanol / PBS (75, 50 y 25%), de 5 min con cada dilución, y finalmente un lavado de 5 min repetido cuatro veces en el 100% PBT. Para permeabilizar los embriones, se utilizó la proteinasa K (10 µg/ml) a TA durante 20 min. (24 hpf) y 40 min. (48 hpf). Se detuvo la digestión de la proteinasa K por lavados de PBST y postfijación con 4% de PFA durante 30 minutos. Para eliminar el PFA residual se hacen lavados de 5 min cuatro veces en 1x PBT. Posteriormente, se realiza el bloqueo en PBS-Tween 20 con un 10% (v/v) de suero de cabra (Sigma) y BSA al 1% (10 veces) durante 4 horas a temperatura ambiente. Para la inmunodetección, los embriones se incuban durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos anti-H3P (1:500; Abcam, Cambridge, Reino Unido) y anti-p53 (5:500; ZIRC) hechos en ratón y conejo respectivamente. A continuación, los embriones se lavaron en PBS y se incubó durante 1 h a TA en PBST y BSA al 1% (10x) con los anticuerpos secundarios (de cabra) Alexa-546 (anti-ratón) y Alexa-488 anti-conejo (ambos 1:500; Invitrogen, Barcelona, España). Después de

la incubación con el anticuerpo secundario los embriones fueron lavados de nuevo con PBS almacenados a 4°C para su posterior registro fotográfico.

### **3.16 Apoptosis por la técnica de TUNEL**

La técnica utilizada para determinar la apoptosis se realizó mediante la utilización del *kit In AP In Situ Cell Death Detection* (Roche Applied Science), siguiendo el protocolo del fabricante y modificado para embriones de pez cebra enteros. Al igual que en la ISH y la IHC los embriones se decorionaron, se fijaron y se almacenaron en metanol absoluto a -20°C. Luego se rehidrataron en diluciones sucesivas de metanol / PBS, se permeabilizaron con proteinasa K (10µg/ml) y se postfijan con PFA. Continuando con el protocolo. Se permeabiliza además con 0,1% Tritón X-100 (en el 0,1% de citrato de sodio recién preparada) durante 1h a TA. La Solución enzimática y del marcaje se mezcló en una razón de 1:5. Esta mezcla de la reacción TUNEL, fue introducido en el eppendorf que contenía a los embriones y se incubaron en la oscuridad durante 1 h a 37°C. Luego, tres lavados de 5 min (cada uno) en PBS se realizaron. El convertidor AP se incubó durante 30 min a 37°C. Después, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno en PBS. Finalmente se añadió la solución de sustrato. Comprimidos de Fast Red (Roche) se incubó durante 20-30 minutos a 15-25 ° C. Por último, se realizaron 3 lavados, con una frecuencia de 5 min.

### **3.17 Clonación de los receptores opioides y de las neuroquininas**

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR se visualizaron como bandas en un gel de agarosa. Las bandas de interés se aislaron y se purificaron usando el producto Gel Extraction kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, la agarosa conteniendo el DNA en un eppendorf se fundió a 60 °C durante 10 minutos en tampón PB suministrada por el fabricante (el triple de volumen por peso del gel). A esta mezcla, se añadió 1 volumen de isopropanol

por peso del gel para después mezclarse por inmersión, y luego este mix se pasó a unas columnas (QIAGEN) que presentaban una membrana de sílice especialmente diseñada para retener el DNA, luego se centrifugó durante 1 min a 13000 rpm (esta velocidad fue empleada en todas las demás centrifugaciones). Una vez descartado el volumen filtrado se añadió el tampón PB y se centrifugó. Posteriormente, se añadió el tampón PE y se realizó otra centrifugación por 1 min. Seguidamente se descartó el volumen filtrado y se centrifugó una vez más con el fin de eliminar restos del tampón PB. Finalmente se añade a la columna, pasado a un eppendorf nuevo estéril, 25- a 35 µl del tampón TE (Elution Buffer) y se dejó reposar por 2 minutos y por último se centrifugo para así obtener el cDNA purificado de nuestro interés.

Los oligonucleótidos empleados de los receptores opioides y de neuroquininas utilizados en la presente investigación fueron diseñados utilizando la aplicación de PCR Primer Stats, de la página Sequence Manipulation Suite, SMS ([http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_primer\\_stats.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html)) en base a la secuencia genómica generado por Ensembl ([http://www.ensembl.org/Danio\\_rerio/Info/Index](http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index)). Secuencias completas de taquicininas (SP) y receptores de neuroquininas se generaron por retrotranscripción. Los cebadores, oligodesoxinucleotidos, fueron comprados (ISOGEN, Life Science) (Tabla 6). Las temperaturas de los cebadores se muestran en la tabla 6 y 7. El programa utilizado para la amplificación de NK1a y Nk1b fue el siguiente: 5 minutos a 95°C seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 min a 62°C, y 3 minutos a 70°C. Al final de los ciclos, una temperatura de extensión final de 70°C se añadió durante 10 min. En el caso del gen de Tac1 el programa utilizado fue de 5 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 45 s a 95°C, 45 s a 60°C, y 45 s a 70°C y una temperatura de extensión final de 70°C durante 10 min.

### 3.18 Reacción de ligación

Los fragmentos de DNA purificados a partir de los geles de agarosa fueron ligados en el vector pCR®II-TOPO® (Invitrogen), que es un vector linearizado que presenta una desoxitimidina terminal en los extremos 3', de esta forma se mejora la eficiencia de inserción de los productos de PCR con desoxiadenosinas terminales, que son añadidas por polimerasas termoestables, y también se disminuye la recircularización del plásmido sin inserto.

En el caso de los vectores de expresión pEGFP-C3 y pDs1RED-N1 (Clontech®), se diseñaron oligos con la secuencia de los sitios de restricción de determinadas enzimas (Tabla 7). Estos vectores codifican proteínas fluorescentes verde y rojo respectivamente, los cuales nos permiten distinguir si nuestro gen de interés fue insertado correctamente o no. La reacción de ligación se llevó a cabo empleando 25–50 ng del vector pCR®II-TOPO®, 1 µl de tampón de la T4-ligasa (Invitrogen) a una concentración 10X en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó a 14 °C durante toda la noche.

### 3.19 Desfosfatación de los plásmidos

Un paso previo a la ligación de los insertos de la NK1a y NK1b en los vectores de expresión pEGFP-C3 y pDs1RED-N1 (Clonntech®) consiste en digerir con unas enzimas de restricción determinadas, que generan extremos cohesivos complementarios de los vectores que se pueden volver a autoligar. Para la desfosfatación utilizamos la fosfatasa alcalina (New England Biolabs). Añadimos 4 µl de la enzima al plásmido cortado y purificado (20 µl) junto con 3 µl de buffer CIP 10X (Calf Intestinal Phosphatase, denominado en español como fosfatasa alcalina intestinal) y completamos con agua hasta un volumen final de 30 µl. Posteriormente se incubó a 37°C durante 30 min y a continuación 10 min a 75°C para inactivar la enzima. Por último se purifica para evitar el exceso de

sales.

### **3.20 Preparación de medios y placas bacterianas**

Utilizamos distintos tipos de medios para el crecimiento bacteriano, por un lado medios sólidos para el aislamiento de colonias y medios líquidos para el crecimiento de una colonia. Los medios sólidos utilizados fueron el medio TYE (4g NaCl, 5 g triptona, 2.5 g extracto de levadura, 7.5 g agar y enrasar a 500 ml con agua bidestilada y esterilizado mediante autoclave; 25 ml/placa) y el medio LB (5 g NaCl, 5 g triptona, 2.5 extracto de levadura 7.5 g agar, enrasar a 500 ml con agua bidestilada y ajustar el pH a 7.4 y esterilizado mediante autoclave; 25 ml/placa). Los medios líquidos utilizados fueron 2XTY (16g de triptona, 10g de extracto de levadura, 5g de NaCl y agua destilada hasta completar un volumen de 1L y esterilizado mediante autoclave) y medio LB (igual que el de placa pero sin el agar). Los medios y las placas se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización comprobando periódicamente la posible aparición de contaminaciones.

### **3.21 Transformación de células super competentes**

Bacterias súper competentes TOP 10 `F (Invitrogen), 30 µl se incubaron con 20-50 ng del producto de ligación durante 60 min en hielo. Pasado este tiempo, las bacterias fueron sometidas a un choque térmico a 42°C durante 2 min y posteriormente se pasaron de nuevo a hielo durante 10 min. A continuación, se añadieron 200 µl de medio 2XTY y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min en agitación. Las bacterias así transformadas se sembraron sobre placas TYE suplementadas con 50 µg/ml de antibiótico (ampicilina o kanamicina). En el caso de que la construcción utilizada para transformar fuese pCR®II-TOPO® además se añadieron 50 µl de IPTG (isopropil-1-D-tiogalactopiranosido) (20 mg/ml) y 50 µl de X-Gal (5-bromo-4- cloro-3-indolil-D-galactopiranosido) (20 mg/ml) a cada una de las placas como método de selección. Las placas sembradas se

incubaron a 37°C durante toda la noche (14-16 h).

### **3.22 Selección de las colonias transformantes**

En el caso de utilizar el vector y pCR®II-TOPO® las colonias resultantes de la transformación se seleccionaron por el color, ya que cuando el inserto se introduce en el vector, se interrumpe el gen de la b-galactosidasa, inactivándolo y por tanto las células no son capaces de degradar un sustrato, el X-Gal, acumulándose éste en forma de precipitado blanco; esto hace que las bacterias portadoras del inserto formen colonias de color blanco mientras que las no portadoras del inserto forman colonias de color azul porque el producto de la degradación del XGal es azul. Aquellas bacterias que no hayan adquirido el plásmido no serán capaces de crecer ya que no tendrán el gen que confiere la resistencia al antibiótico de selección. Las colonias bacterianas recombinantes se sembraron en 6 ml de medio 2XTY suplementado con ampicilina o kanamicina, según el plásmido (50 µg/ml), y se dejaron crecer a 37°C con agitación constante durante 12 h para la posterior purificación del DNA plasmídico. Además cada colonia se sembró también en una placa con medio TYE con antibiótico a modo de réplica. Cuyo los plásmidos utilizados fueron pEGFP-C3 y pDs1RED-N1 (Clonntech®) la selección con color no se realizó ya que estos plásmidos no incluyen el gen de la beta-galactosidasa y por tanto todas las colonias son blancas.

### **3.23 Purificación del DNA plasmídico**

El DNA plasmídico se extrajo empleando el sistema comercial Rapid DNA Plasmid Miniprep Kit (Gene Dan); para ello, el cultivo bacteriano se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm y tras decantar el sobrenadante, el botón bacteriano se resuspendió en 200 µl de solución de resuspensión (suministrada por el fabricante). A continuación se añadieron 200 µl de solución de lisis (suministrada

por el fabricante) y la mezcla se incubó 60-90 segundos a temperatura ambiente. Seguidamente se añadieron 100 µl de solución de precipitación (suministrada por el fabricante), se centrifugó 1 min. 13000 rpm y se añadieron 150 µl de solución de neutralización (suministrada por el fabricante). Tras centrifugar 5 min a 13000 rpm, el sobrenadante se recogió en otro tubo y el DNA plasmídico se precipitó con 450 µl de isopropanol. Después de centrifugar 3 min. a 13000 rpm., se eliminó el sobrenadante, se añadieron 100 µl de solución purificante (suministrada por el fabricante) y se centrifugó 3 min. A 13000 rpm. El DNA se lavó con 750 µl de etanol 70 %, se centrifugó 2 min a 13000 rpm, se secó y se resuspendió en en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.50; EDTA 1 mM).

Para analizar si las colonias seleccionadas contenían el inserto de interés, 2–5 µl de cada preparación plasmídica se digirieron con las endonucleasas de restricción apropiadas, y la presencia de inserto se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa a diferentes concentraciones según el tamaño del fragmento esperado.

Aquellas colonias que contenían el inserto de interés se crecieron en un volumen de 40 ml de medio 2XTY suplementado con ampicilina o kanamicina, según el plásmido, a 37°C con agitación constante durante 14-16 h; parte del cultivo se almacenó a -80°C utilizando glicerol al 20 % como agente crioprotector. El resto se empleó para extraer el DNA plasmídico tal y como se ha descrito anteriormente.

### **3.24 Secuenciación automática del DNA**

Las reacciones de secuenciación automática de DNA se llevaron a cabo en el servicio central de secuenciación de la Universidad de Salamanca dotado de un secuenciador automático ABI Prism® (Applied Biosystems). Para ello se mezclaron en un tubo eppendorf 5 µl de DNA plasmídico, que equivalen a 400-

600 ng de DNA, con 3 pmoles de oligonucleótido. Las limitaciones del sistema de secuenciación que dependen de muchos factores como la pureza y calidad del material a secuenciar, su concentración, la calidad de las enzimas utilizadas para la misma, etc. hizo necesario en algunos casos la utilización de oligonucleótidos que anillaban en el interior de la secuencia de NK1a y NK1b para así poder definir sin lugar a duda la secuencia intermedia. Los resultados de la secuenciación, cromatograma y texto, fueron enviados por correo electrónico para ser analizados posteriormente.

### **3.25 Análisis de las secuencias**

El análisis de las secuencias recibidas desde el servicio de secuenciación automática de la Universidad de Salamanca se realizó con diversos programas informáticos. En primer lugar se visualizaron utilizando los programas EditView (ABI Automated DNA Sequencer Viewer, Perkin Elmer), Chromas 2.23 (Technelysum Pty Ltd.) Para manipular las secuencias, buscar los ORF, traducción de las secuencias de nucleótidos, obtener reversos complementarias se empleó la página web "The sequence Manipulation Suite", SMS (<http://www.bioinformatics.org/sms>). La página del NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a través del programa BLAST o FASTA permitió comparar nuestras secuencias con las encontradas en la base de datos Gen Bank. La página del EMBL (European Bioinformatics Institute: <http://www.ebi.ac.uk/>), también sirvió para comparar secuencias. Gracias a los programas MEGA5 software (<http://www.megasoftware.net>) o ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>) se realizaron alineamientos de secuencias y con el primero se obtuvieron filogramas y análisis filogenéticos (Tamura y cols., 2007). La búsqueda de sitios de corte con endonucleasas de restricción se llevó con la aplicación de la página web Biotools, Universidad de

Masachutes (<http://biotools.umassmed.edu/tacg4/index.php>)

### **3.26 Cultivos celulares**

Se utilizó la línea celular HEK-293 (células embrionarias de riñón humano; ATCC: CRL-1573). El medio utilizado para crecer las células fue DMEM (Gibco-BRL) (high glucose, no glutamate) suplementado con 2 mM Glutamina (Biowhittaker) 10 %, suero bovino fetal descomplementado (Sigma o Biowhittaker), 100 U/ml de Penicilina (Sigma), 0.1 mg/ml Estreptomicina (Sigma) y 25 µg/ml de fungizona (antifúngico de Biowhittaker). Tras suplementar el medio este fue esterilizado por filtración a través de filtros de 500 ml y de 0,22 µm de tamaño de poro (Corning). Las células se incubaron a 37°C, con CO<sub>2</sub> al 5 % y 95 % de humedad en un incubador Nuare o Forma Scientific. Se cambiaron de medio cada 2 ó 3 días y el crecimiento se llevó a cabo hasta un 90-95 % de confluencia, procediéndose seguidamente a la resiembra en nuevas placas.

Puesto que las células HEK-293 utilizadas no se adhieren fuertemente al sustrato para resuspenderlas se pudo utilizar el método de pipeteo aunque se optó en la mayoría de los casos emplear una solución de PBS EDTA 2 mM. El EDTA va a actuar quelando iones de calcio necesarios para la unión de las células al sustrato, de esta forma se levantan las células de la botella (flask) donde crecen y se puede propagar el cultivo. Una vez que toda la capa de células está levantada se pasan a un tubo de 50 ml y se centrifuga a 750 rpm durante 10 minutos a TA. Seguidamente se decanta el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en medio de cultivo y se distribuyó en nuevas placas.

### **3.27 Cultivo de células y transfección**

Las células humanas de riñón embrionario, HEK-293, no expresan receptores de SP y neurocininas, lo que proporciona que las acciones puras de los

receptores de SP pueden ser estudiados. Los receptores NK1a (1280 bp) y NK1b (11236 bp) del pez cebra se ligaron en el vector de expresión de mamíferos PCR<sup>®</sup> II (Invitrogen, San Diego, CA), y células HEK-293 se transfectaron usando el reactivo de transfección Effectene (QIAGEN), según las instrucciones del fabricante, y se seleccionan con geneticina 0.5mg/mL (G-418, Gibco-BRL vida Technology Inc., Grand Island, NY, EE.UU.). Después de aproximadamente 2 meses de período de selección, se realizó una retrotranscripción para confirmar la expresión de NK1a y NK1b en los clones seleccionados. Transfectadas establemente las células HEK-293 que expresan los genes de interés se cultivaron en medio Dulbecco modificado de Eagle (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina 100U/mL, estreptomycin y 0.1mg/mL 0.5mg/mL geneticina (todos de Gibco-BRL Life Technology Inc., Grand Island, NY, EE.UU.) a 37°C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en una incubadora (Thermo Fisher Scientific). Las secuencias de cebadores de NK1a y NK1b utilizados para la síntesis de cDNA con el objetivo de insertar en los vectores de expresión pEGFP-C3 y pDSRed1-N1 (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE.UU.) están detalladas en la tabla 7. El DNA de NK1a se ligó en pEGFP-C3 y Nk1b se ligó a pDsRED1-N1 (Fig. 19 A y B). Los sitios específicos añadido a los cebadores de forward y reverse correspondió a: NK1a (XhoI y KpnI) y Nk1b (HindIII y SacII). El programa de PCR realizado para NK1a y NK1b fue de la siguiente manera: 5 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 30 s a 95°C, 45 s a 64°C, y 2 min a 72°C. Al final de los ciclos, una temperatura de extensión final de 72°C se añadió durante 10 minutos. Los experimentos de PCR se realizaron empleando el kit de PCR de alta fidelidad *Takara LA Taq<sup>™</sup> Kit* (Takara Bio INC).

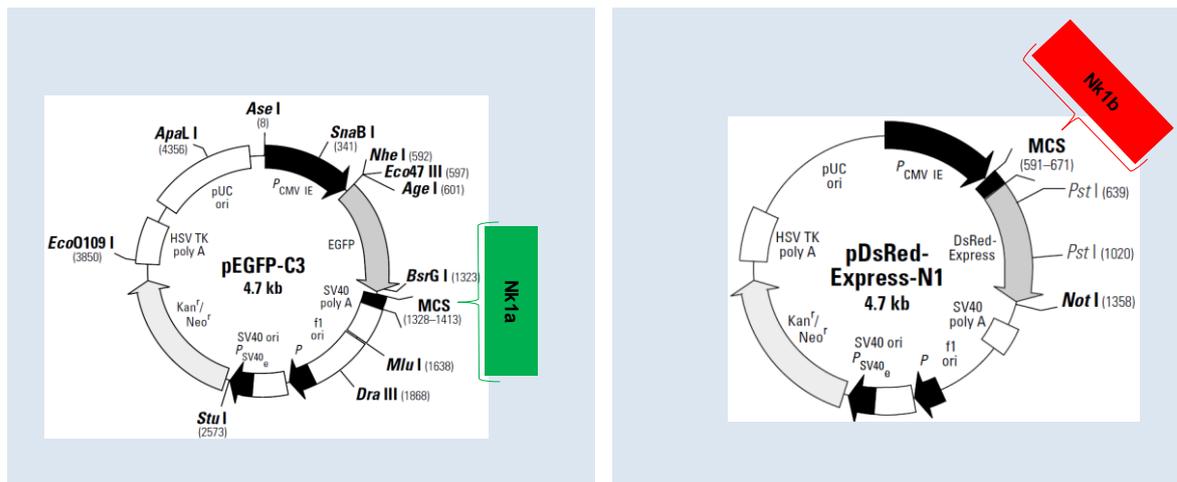


Fig. 19. A) Receptor Nk1a del pez cebra insertado en el plásmido pEGFP-C3. B) Construcción del receptor Nk1b del pez cebra en el vector plasmídico pDsRed-N1.

### Transfección de células HEK-293

La transfección se llevó a cabo utilizando el kit de *Effectene® Transfection Reagent* (Qiagen) y con una confluencia de las células HEK-293 entre 50 a 70%. El fundamento del kit está basado en que en primero se condensa el DNA (por el tampón de condensación) y luego tras la agregación del potenciador (*enhancer*) se forman micelas que permiten unirse a la membrana celular y atravesar la capa bilipídica e introducir el DNA dentro de la célula bacteriana. El día de la transfección se diluyó 1 µg de DNA en el tampón TE (pH 7-8), tampón de condensación (EC) hasta un volumen de 150 µl. Luego se agregó 8 µl de potenciador y se mezcló por vortex durante 1-3 s. Seguidamente, se incubó a RT (15-25°C) por 5 min, luego realizamos un centrifugado ultracorto con el fin de reunir las gotas dispersas de la mezcla. Añadimos, a la mezcla anterior 25 µl de *Effectene Transfection Reagent* y mezclamos por pipeteo durante 10 segundos. Esta nueva reacción se incubó durante 10 minutos a RT para permitir la correcta formación del complejo de transfección. Durante el tiempo de incubación aprovechamos para retirar el medio de los pocillos y lavar con 3 ml de PBS,

luego agregamos medio fresco (suplementado con FBS y penicilina-estreptomicina) a las células. Finalmente agregamos 1ml de medio fresco en la mezcla de transfección y pipeteamos dos veces e inmediatamente agregamos a los pocillos conteniendo las células HEK-293. Realizamos movimientos concéntricos con el fin de dispersar de manera uniforme el complejo de transfección formado. Las células HEK-293 se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> en una incubadora por 24 h, al evaluar las células HEK-293 transfectadas con nuestros plásmidos de interés por microscopia de fluorescencia (puesto que nuestros DNA fueron acoplados a GFP y DsRED), seleccionamos los pocillos donde se había realizado la transfección exitosamente. Se retiró el medio y se agregó medio fresco que contenía además del suplemento detallado en párrafos anteriores el antibiótico de selección, neomicina (Geneticin, Gibco). Estas células transfectadas exitosamente se crecieron y realizaron varios pases hasta obtener clones de solamente las células conteniendo nuestros genes de interés.

### **3.28 Obtención de clones estables**

Tras determinar el éxito de la transfección mediante la extracción de RNA y la realización de la RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos de la secuencia insertada, se procedió a la obtención de clones estables. Para dicho cometido se empleó G-418 (Neomicina) (Gibco-BRL) como antibiótico de selección, ya que el plásmido transfectado posee un gen marcador de resistencia a neomicina. Tras 48 h de la transfección las células se levantaron por pipeteo, y se centrifugaron a 750g durante 10 min. Posteriormente el botón celular se resuspendió en medio fresco completo y suplementado con G-418 a una concentración final de 500 µg/ml y se distribuyó en placas de 24 pocillos, 500 µl por pocillo. El objeto del pase de las células de cada pocillo de placas de 12

pocillos a 12 pocillos de placas de 24 es el de diluirlas para asegurar que las colonias estables que se formen crezcan lo más aisladamente posible. La selección se llevó a cabo durante un periodo mínimo de 2 meses, comprobándose mediante la técnica de RT-PCR que se mantenía la expresión del clon de interés.

### **3.29 Congelación de células HEK-293**

A partir de un cultivo celular en fase exponencial, con un 80% de la superficie del contenedor (*flask*) cubierto se levantaron con PBS EDTA 2mM y se centrifugaron a 750 g durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y a continuación se resuspendió en medio completo (DMEM suplementado con antibióticos, antifúngico, suero bovino fetal y L-Glutamina). La suspensión celular fue alicuotada en crioviales y se le añadió DMSO hasta una concentración del 5%, se mezcló bien. Para conseguir una congelación progresiva se mantuvieron los crioviales a 4°C (el menor tiempo posible) y luego se introduce los crioviales durante al menos 1 h a -20°C y finalmente conservarlos a -80°C hasta su utilización.

### **3.30 Descongelación de células HEK-293**

La descongelación de las células almacenadas a -80°C al contrario que su congelación es un proceso rápido. Los crioviales se pasan directamente de -80°C a un baño a 37°C. Inmediatamente tras la descongelación se añade medio para diluir la concentración de DMSO y que de esa forma no afecte a las células. Tras este paso se centrifugan a 750 g durante 10 min y el botón celular se resuspende en medio fresco completo y se siembra en un número de botellas (*flasks*) que depende de la cantidad de células que se añadió a cada criovial.

### **3.31 Análisis filogenético**

La predicción del ORF y su traducción en secuencias de aminoácidos se

realizó mediante la aplicación del programa informático Sequence Manipulation Suite (SMS), (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>), junto con el software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). La secuencia de amino ácidos de la Tac1 (precursor de la SP) y sus receptores Nk1a y Nk1b, así como de sus ortólogos en varias especies de vertebrados, fueron alineados por el formato NBRF (llamado también formato Pir), utilizando el software ClustalW.

El análisis evolutivo molecular genético se realizó por medio del software MEGA5 (Tamura y cols., 2011). La construcción de los árboles filogenéticos, fue inferido por el método Neighbour-Joining (Saitou y Nei, 1987). Además analizamos el cálculo de la proporción de diferencias de amino ácidos (p-distancia), el porcentaje de replicación del árbol filogenético (el bootstrap test, de 1000 repeticiones, denota la potencia de la rama). Los otros valores los asumimos por defecto del programa.

El Método de NJ tiene un alto grado de precisión (Zhang y Nei, 1997) y ha sido usado antes en los estudios de filogenia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Josefsson, 1999; Herrero-Turrión y Rodríguez 2008). Cada árbol filogenético fue enraizado con una familia de las GPCRs.

### **3.32 Preparación de ribosondas de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2) y de las taquicininas (SP, NK1a y NK1b)**

Las ribosondas que se utilizaron para las ISH fueron preparados en nuestro laboratorio, para lo cual empleamos cebadores específicos que nos amplificaran las secuencias completas del ORF de los receptores opioides y de las taquiquininas: ZfMOR (1194 pb), ZfDOR1 (1144 pb) y ZfDOR2 (1122 pb) (Tabla 6) (Fig. 20). En el caso de SP (299 pb), NK1a (1364 pb) y NK1b (1506 pb) (tabla 7) (Fig. 20). Las temperaturas de anillamiento se muestran en la tabla (Tabla 6 y 7). Las secuencias

obtenidas, se ligaron en el plásmido pCR®II-TOPO® y se realizaron las digestiones respectivas, así la electroforesis nos permitió determinar la presencia de nuestro insertos de interés. Una vez que el plásmido pCR®II-TOPO® tenía introducido nuestro inserto realizamos digestiones en las secuencias más cercanas de Sp6 o de T7 con el objetivo de realizar una transcripción de RNA a partir de DNA. Este RNA fue tratado con DNasa I con el objetivo de eliminar cualquier resto de DNA. Posteriormente se le añadió la digoxigenina para el posterior reconocimiento de esta por un anticuerpo contra la digoxigenina.

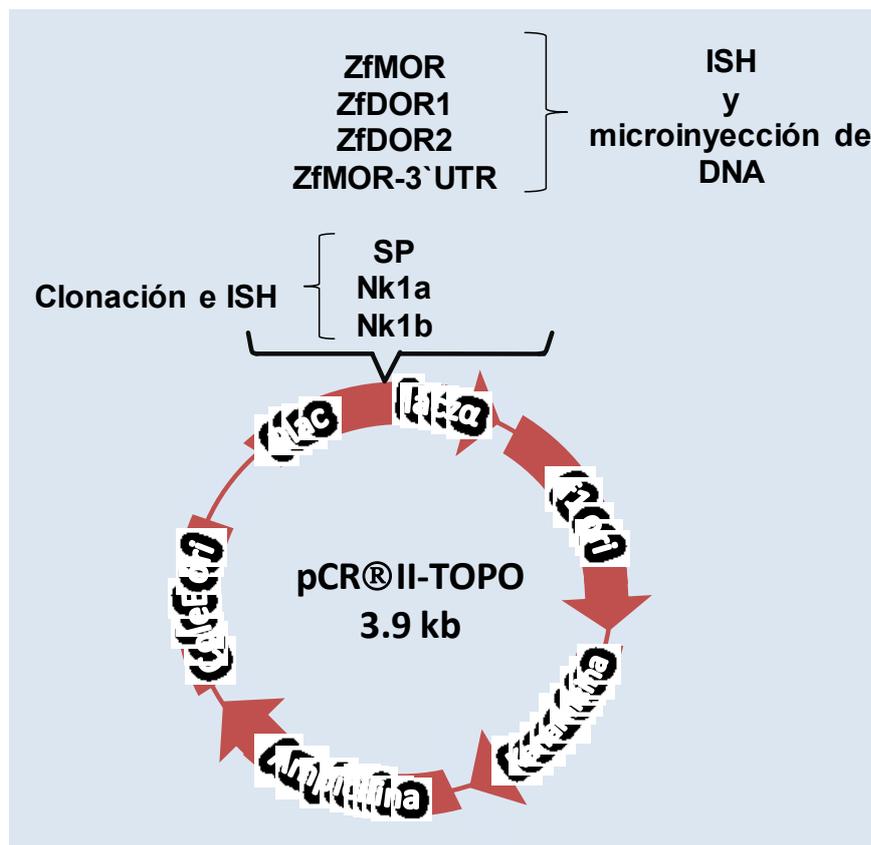


Fig. 20. A) Los receptores opioides ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2, y la secuencia ZfMOR-3'UTR se clonaron en el plásmido pCR®II-TOPO. Una vez clonados los receptores opioides en el plásmido se prosiguió con los diferentes pasos para la obtención de las ribosondas. Asimismo, el DNA de los receptores opioides sirvió para la microinyección de los receptores opioides y de la ZfMOR-3'UTR en mebriones de pez cebra. Por otro lado, el DNA de TAC1 (SP), Nk1a y Nk1b fueron clonados en el plásmido pCR®II-TOPO y posteriormente empleados para sintetizar las ribosondas de SP, Nk1a y Nk1b. Abreviaturas: ISH: hibridación *in situ*.

### 3.33 Microinyección de Morfolinos

Los morfolinos (MOs) pueden reducir la expresión de los genes, modificar o inhibir el procesamiento del mRNA y su maduración. Los MOs son cadenas cortas de aproximadamente de 25 subunidades de MOs. Los MOs no degradan directamente sus dianas, sin embargo, sí activan o permiten la actividad de la RNase H que degrada el RNA (dentro de la región de RNA que se hibrida con el MO), así de esta manera se puede reciclar la actividad de los MOs (Scherer y Rossi, 2003). Por su alta afinidad y especificidad, los MOs, dependiendo de su secuencia seleccionada de sus dianas pueden bloquear la translación (al unirse a la región 5' UTR de las primeras 25 bases de la codificación de la secuencia), modificar los procesamientos alternativos del pre-mRNA (al unirse a sitios específicos involucrados en el procesamiento alternativo) o inhibir la maduración y la actividad del miRNA (al unirse al miRNA maduro o el pri-miRNA). Lo que se resume que, los morfolinos mediante su unión a su región diana del transcrito impide el avance de la maquinaria de traducción, y de esta manera silencia la expresión (knockdown) y por lo tanto la función, de la proteína (Nasevicius y Ekker, 2000).

La inyección de morfolinos (Gene Tools), se ha realizado según la metodología desarrollada por Nasevicius y Ekker (2000). Para ello hemos empleado un sistema de microinyección y micromanipulación diseñado especialmente para la inyección de embriones de pez cebra, acoplado a un estereoscopio (Zeiss Discovery V8) y una cámara de alta resolución que permita la realización de vídeos y fotos.

En primer lugar se determinó la concentración a la cual se van a inyectar los morfolinos, luego se calibran los parámetros de presión y el tiempo del pulso adecuados al volumen a inyectarse, calculándose que en cada pulso se inyectan

aproximadamente 3nl de solución en el embrión. Una vez determinada la concentración que se empleará, se analizó la supervivencia embrionaria y posibles malformaciones que den lugar a resultados erróneos.

De las diferentes concentraciones inyectadas empleamos aquella que, produjo el menor daño posible y produzca el efecto que deseamos. Los capilares que nos permitieron la microinyección fueron confeccionados con un puller (Narishige). Por el calentamiento de los capilares y la fuerza gravitacional obtuvimos capilares de puntas muy delgadas.

Los MOs de los receptores opioides fueron diseñados y adquiridos de Gene Tool (Gene Tool, LLC Philomath, OR) con el propósito de determinar la relación entre los receptores opioides y el dre-let-7d y además también entre los receptores opioides y las neuroquininas (SP, Nk1a y NK1b). Las siguientes secuencias de los MOs de los receptores opioides fueron utilizados en la presente investigación:

- ❖ ZfMOR (AATGTTGCCAGTGTTTTCCATCATG)
- ❖ ZfDOR1 (GAATGACGAACGGCTCCATCGCTTC)
- ❖ ZfDOR2 (AAGCTGGCCATTGACGGAAATGC).

Estos MOs fueron diluidos (en agua esterilizada) a una concentración de 0,3 mM. Las siguientes concentraciones de MOs fueron empleados: 0,2  $\mu$ M (ZfMOR), 1  $\mu$ M (ZfDOR1), y 1 $\mu$ M (ZfDOR2) 1 $\mu$ M (ZfDOR1-ZfDOR2). Además de los cuatro grupos experimentales de los MOs (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfDOR1 ZfDOR2) se incluyó un grupo control, (microinyección de MO sin actividad biológica o MOs estándar). Para la microinyección realizamos microcapilares de vidrio en los cuáles introducimos el líquido de los MOs (Fig. 21A). Los MOs se microinyectaron en el vitelo (Fig. 21B) de los embriones de pez cebra, en la etapa de uno a cuatro células (Nasevicius y Ekker, 2000) con un sistema micromanipulador y microinyector de Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania).

### 3.34 Microinyección de DNA de los receptores opioides ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfMOR-3'UTR

Las secuencias completas de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2) y ZfMOR-3'UTR fueron amplificadas utilizando cebadores específicos (tabla 6). Los productos de PCR fueron purificados y clonados en el vector pCR®II-TOPO® (Invitrogen). Las células TOP 10® (Invitrogen) se transformaron con la construcción deseada. Se realizaron digestiones con la endonucleasa EcoRV HF (New England Biolabs) durante 1 hora a 37°C. Los productos purificados de la electroforésis fueron enviados para su secuenciación. Posteriormente el producto digerido con EcoRV, y ulteriormente purificado por el sistema de columnas (QIAGEN), se microinyecta en la única célula del embrión (Fig. 21C) (concentración de 500pg/3nl). La microinyección se siguió de acuerdo al protocolo descrito anteriormente para los MOs.

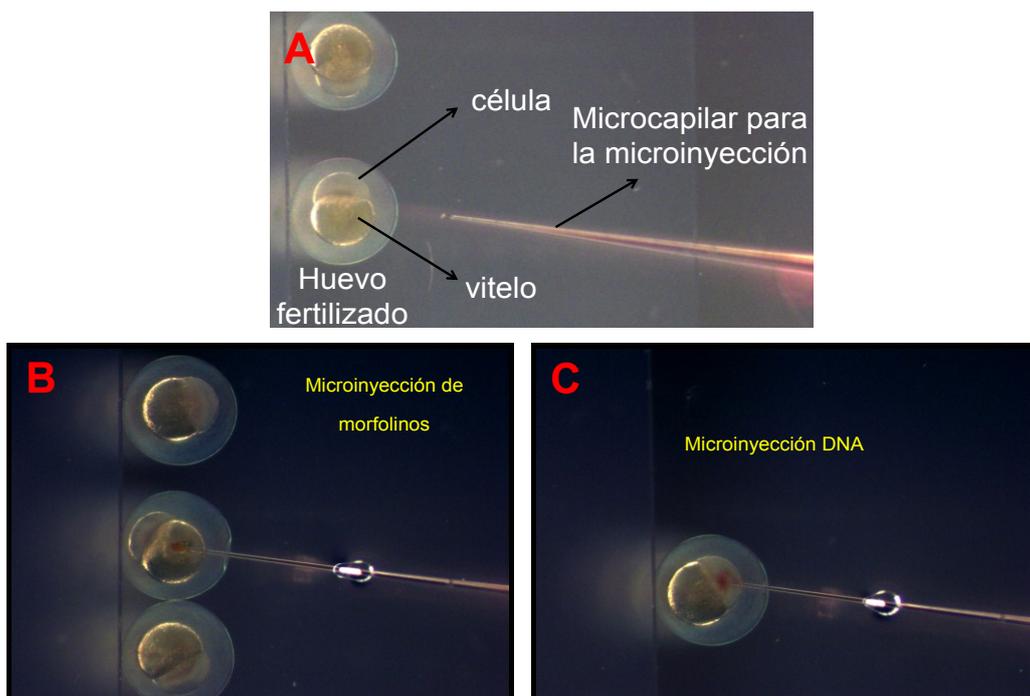


Fig. 21. A) Los huevos de pez cebra una vez recolectados, se seleccionan los fecundados para su posterior microinyección. Los microcapilares empleados fueron de vidrio y confeccionados en nuestro laboratorio. B) La microinyección de los Mos se realizó dentro del vitelo del huevo fecundado. C) La microinyección del DNA se realizó en la célula.

### 3.35 Análisis de las imágenes

Para la documentación de las imágenes obtenidas por técnicas de ISH, IHC y de TUNEL se empleó una cámara digital colocada en un estereoscopio de fluorescencia (Leica, Microsystem) con una ampliación de 6 y de 12X. En el caso de las células HEK-293 transfectadas con NK1a y NK1b (junto con la proteína fluorescente verde y rojo) fueron tomadas con microscopio invertido de fluorescencia (Leica, Microsystem) a 20X. El programa Photoshop CS4 software (Adobe System Inc.) se utilizó para procesar todas las imágenes obtenidas. Para el conteo de la proliferación celular y la apoptosis se empleó el ImageJ (freeware (NCBI)).

### 3.36 Análisis estadístico

Los resultados de la qPCR se representan como media  $\pm$  SEM. Antes de realizar los test de significancia, realizamos el test de normalidad (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) y al determinar que nuestros datos obtenidos tenían una distribución normal, empleamos pruebas de significancia estadística paramétricas. Al analizar sólo dos grupos (grupo tratamiento y el grupo control), empleamos el t-Student de dos colas, mientras que cuando comparamos más de dos grupos empleamos el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y los post-test de Tuckey o Dunnet, dependiendo de las comparaciones que se quisieron realizar entre los diferentes grupos. En todas las pruebas estadísticas la diferencia se consideró estadísticamente significativo si  $P < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, A, EE.UU.).

## **Resultados**



La cocaína además de producir adicción en las personas que consumen, puede inducir una alteración en la expresión de una diversidad de genes, entre ellos los receptores relacionados con el dolor: receptores opioides y receptores de la SP. Esta variación de expresión de los receptores mencionados puede inducir un aumento o disminución de la percepción de la sensación dolorosa o efectos en los procesos de adicción. Por otro lado, los receptores opioides y de la SP pueden ser regulados positiva o negativamente por ciertos miRNAs, como por ejemplo el let-7 y miR-206. De esta manera, agentes endógenos (miRNAs) y exógenos (cocaína) podrían estar regulando la sensación dolorosa.

Teniendo en consideración lo anteriormente expuesto, nos propusimos estudiar el efecto de la cocaína sobre la expresión de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2), de la SP y sus receptores, así como de su reguladores endógenos let-7d y mir-206 durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

#### **4.1 Efectos de la cocaína en la expresión de los receptores opioides**

##### **4.1.1 Expresión de los receptores opioides**

De los receptores opioides del pez cebra, que nuestro grupo ha clonado y estudiado, analizamos la expresión de los receptores opioides, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfMOR, tras la exposición de 1,5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína. En primer lugar expusimos 1,5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína a un grupo de embriones de pez cebra desde las 5 hpf y posteriormente a las 8, 16, 24, 48 y 72 hpf fueron recogidos y preservados en Trizol a -20°C. Los embriones fueron descongelados a temperatura ambiente para luego continuar con la extracción de RNA total de cada estadio embrionario (esto se realizó para los grupos expuestos a cocaína y el grupo control). Luego realizamos la retrotranscripción para obtener el cDNA (DNA copia

de RNA), de esta manera conseguimos un híbrido DNA-RNA sobre el que, posteriormente, realizamos una PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación, de entre 100 a 300 pares de bases de amplicón, del fragmento de interés: ZfMOR (187 pb), ZfDOR1 (116 pb), ZfDOR2 (138 pb), EF1 $\alpha$  (136 pb), Rbp13 (148 pb) y  $\beta$ -actina (206pb). Una vez realizada la PCR, los productos obtenidos se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 2% lo que nos permitió comprobar el tamaño, de nuestro fragmento de interés, y la ausencia de contaminaciones o amplificaciones inespecíficas (Fig. 22). Luego de purificar las amplificaciones de nuestros genes de interés, realizamos la cuantificación del cDNA (ng/ $\mu$ l) para después realizar diluciones seriadas (de acuerdo a lo mencionado en material y métodos) con el propósito de realizar una recta patrón de nuestros genes de interés y así posteriormente poder cuantificar su expresión en número de copias de mRNA. La expresión de nuestros genes de interés fue normalizado con respecto a un gen de referencia que sabemos siempre se debe expresar en todas las células. Existen muchos trabajos que indican que no existe un gen ideal, como gen de referencia, en el que su expresión sea estable bajo todas las condiciones. Sin embargo, el factor de elongación de las proteínas (del inglés: elongation factor (EF1 $\alpha$ ) es uno de los genes del pez cebra que muestra un mayor grado de estabilidad en su expresión, durante el desarrollo y por el tratamiento con fármacos o sustancias exógenas, con respecto a otros genes estudiados y empleados también como genes de referencia ( $\beta$ -actina y proteína ribosomal, Rbp13) (McCurley y Callard, 2008).

A diferencia del pez cebra, en el humano se emplea como gen de referencia preferentemente la enzima gliceraldehído deshidrogenasa fosforilada (GADPH) y la  $\beta$ -actina, pero en el pez cebra la GADPH muestra variaciones marcadas en sus niveles de expresión durante el desarrollo. La  $\beta$ -actina muestra una mejor

estabilidad con respecto al GADPH, pero es menos estable que el EF1 $\alpha$ .

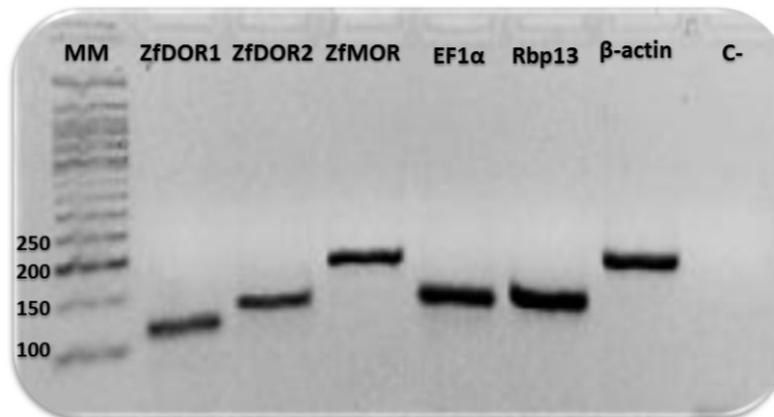


Fig. 22 Electroforesis, de los productos de PCR, en gel de agarosa al 2%, correspondiente a la expresión de los receptores ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfMOR en embriones de 48 hpf. Los amplicones se sitúan a la altura del tamaño esperado según el diseño de los oligonucleótidos para ZfMOR (187 pb), ZfDOR1 (116 pb), ZfDOR2 (138 pb), Ef1a (136 pb), Rbp13 (148 pb),  $\beta$ -actina (206 pb). Lo genes utilizados como control positivo fueron EF1 $\alpha$ ,  $\beta$ -actina y Rbp13. Marcador de peso molecular (MM) medido en pares de bases (pb). EF1 $\alpha$ : factor de elongación; Rbp13: proteína ribosomal y C-: control negativo.

#### 4.1.2 Efectos de la cocaína en la expresión *ef1 $\alpha$*

Previo al estudio de la expresión de los receptores opioides tras la exposición de cocaína en los diferentes estadios embrionarios de desarrollo, analizamos la expresión del gen de referencia, *ef1 $\alpha$* . (Fig. 23). Se puede apreciar un aumento de su expresión, a las 8 hpf (de  $3,173 \times 10^6 \pm 264640$  a  $3,565 \times 10^6 \pm 473957$  copias de cDNA), mientras a las 48 y 72 hpf una disminución de  $3,145 \times 10^6 \pm 98257$  a  $2,706 \times 10^6 \pm 211200$  y de  $3,165 \times 10^6 \pm 323125$  a  $3,016 \times 10^6 \pm 401885$  copias de cDNA, respectivamente). En los estadios de 16 y 24 hpf apreciamos una sutil variación (los cuales no son estadísticamente significativos). La poca variación de la expresión de Ef1a durante los diferentes estadios de desarrollo embrionario, indica que este gen puede ser empleado como un gen de referencia fiable, aunque debemos resaltar que durante la realización de nuestros experimentos evidenciamos en algunas muestras aisladas (las cuales fueron excluidas) que *ef1 $\alpha$*  puede sufrir una variación marcada en su expresión

(incremento o disminución que fue estadísticamente significativo) tras la exposición de cocaína con respecto al grupo control (datos no mostrados). En general, la expresión de *ef1 $\alpha$*  en los grupos expuestos a cocaína no mostró variaciones significativas con respecto a los embriones del grupo control.

De los resultados de qPCR que se describirán a continuación, todos fueron normalizados en base a la expresión de *ef1 $\alpha$* , como el gen de referencia, en los diferentes estadios embrionarios del desarrollo y expuestos a la cocaína.

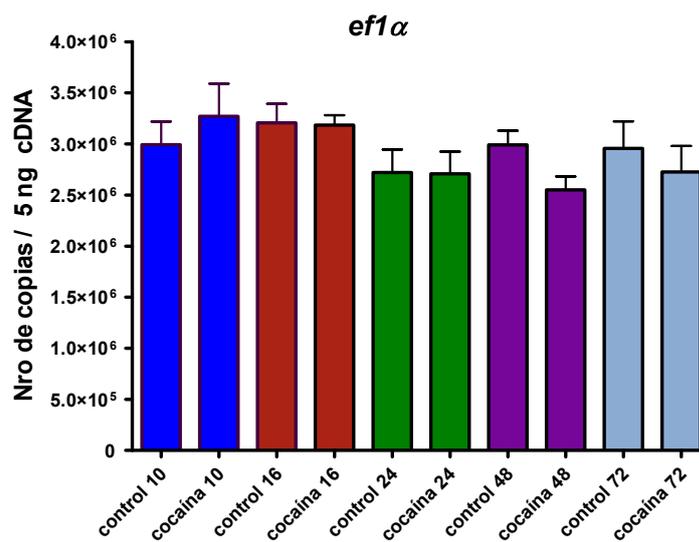


Fig. 23. Cuantificación absoluta de *ef1 $\alpha$*  de los embriones de peces cebra expuestos a 1.5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína comparados con el grupo control. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA total y sintetizar el cDNA de los estadios 8-72hpf. Cada barra representa el número de copias de mRNA de EF1 $\alpha$  en cada estadio  $\pm$  EEM (error estándar de la media). Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada experimento fue realizado por triplicado. Como análisis estadístico realizamos el T-test de 2 colas para muestras independientes. La significancia estadística fue asumida por un  $p < 0.05$ .

#### 4.1.3 Nomenclatura de genes y proteínas en el pez cebra y otras especies

Debemos resaltar que cada especie presenta un tipo de nomenclatura para referirse a los genes y proteínas, por ello para evitar confusión y uniformizar ciertos criterios de nomenclatura expuestos en el presente trabajo presentamos un cuadro representativo de la reglas de nomenclatura para cada especie, como por ejemplo muestra el gen y la proteína del receptor opioide mu (Tabla 8) y esto se puede

extrapolar a los otros receptores opioides.

**Tabla 8. Nomenclatura de genes y proteínas**

<b>Especies</b>	<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Base de datos</b>
<b>Humano</b>	<b><i>MOR</i></b>	<b>MOR</b>	<b>HGNC<sup>1</sup></b>
<b>Rata</b>	<b><i>Mor</i></b>	<b>MOR</b>	<b>RGD<sup>2</sup></b>
<b>Ratón</b>	<b><i>Mor</i></b>	<b>MOR</b>	<b>MGI<sup>3</sup></b>
<b>Pez cebra*</b>	<b><i>zfmor</i></b>	<b>ZfMOR</b>	<b>ZFIN<sup>4</sup></b>

1. <http://www.genenames.org/guidelines.html>

2. <http://rgd.mcw.edu/nomen/nomen.shtml>

3. <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/>

4. <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

\* En el caso del pez cebra según la nueva nomenclatura debería ser Zfmor o Mor, pero se sigue usando ZfMOR que es la nomenclatura con la que se clonó

Tabla 8. Los genes del ser humano se denotan en mayúscula y cursiva, mientras que la proteína se denota en mayúscula y en redonda. En el caso de Rata-Ratón, los genes se denotan en cursiva y con la primera letra en mayúscula y el resto en minúscula, mientras la proteína se denota en mayúscula y en redonda. Finalmente en el caso de los genes del pez cebra se expresan en minúscula y cursiva, mientras la proteína se denota la primera letra en mayúscula seguido de minúsculas y en redonda. En el caso del pez cebra al haberse clonado y elegido una nomenclatura antes del establecimiento de un consenso general se sigue empleando su nomenclatura de las proteínas con la que fueron clonados los receptores opioides. Según la nomenclatura actual debería nombrarse a la proteína del receptor opioide mu del pez cebra como Zfmor o Mor simplemente, pero por las razones explicadas y no crear más confusión, sólo para nombrar a las proteínas, en el presente trabajo de seguiremos empleando la nomenclatura antigua de proteínas de los receptores opioides ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfKOR.

#### 4.1.4 Efectos de la cocaína en la expresión de *zfmor*

El receptor opioide mu (Barrallo et al., 2000; GenBank acceso No.: NM\_131707) es uno de los receptores opioides que más estrechamente está relacionado con la analgesia y algunos de los efectos adversos más conocidos, como la tolerancia y adicción (Matthes y cols., 1996). De la figura 24, observamos que la administración crónica de clorhidrato de cocaína induce un aumento de la expresión del receptor opioide mu en el pez cebra en los estadios de 8 hpf (de  $69,06 \pm 8,850$  a  $479 \pm 115,0$ ) y 16 hpf (de  $297,33 \pm 36,76$  a  $401,3 \pm 36,74$ ) siendo este aumento en ambos estadios estadísticamente significativo. A las

24 hpf la expresión de *zfmor* se incrementa ( $268,4 \pm 23,4$  copias a  $411 \pm 50,51$  copias de cDNA), siendo estadísticamente significativo. Por otra parte, en estadios más desarrollados, 48 y 72 hpf, se puede evidenciar una disminución de la expresión de *zfmor*, siendo sólo estadísticamente significativo a las 48 hpf (de  $736,8 \pm 77,05$  a  $301,5 \pm 40,32$ ) cuando la organogénesis primaria ha terminado.

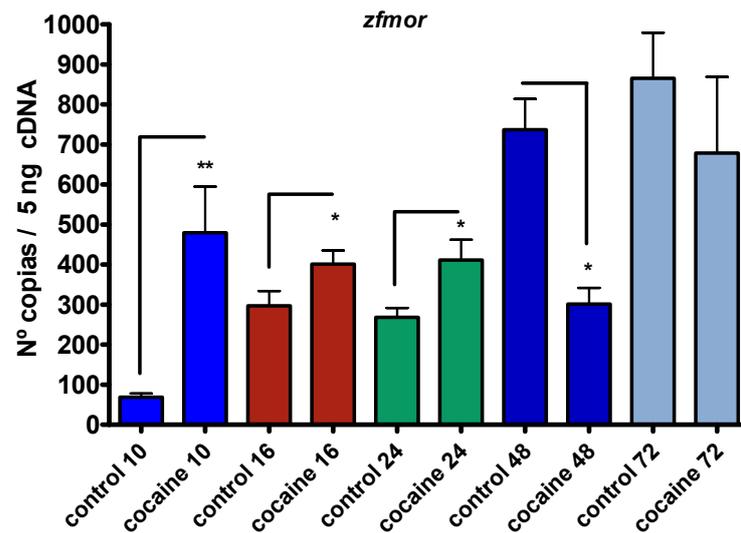


Fig. 24. Cuantificación absoluta del receptor opioide mu, durante el desarrollo del pez cebra, expuestos a  $1.5 \mu\text{M}$  de clorhidrato de cocaína con respecto al grupo control. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios 10-16hpf y 150 para los estadios de 24-72hpf. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *zfdor1*  $\pm$  EEM. Cada barra representa el número de copias de cDNA del receptor ZfMOR  $\pm$  EEM. En cada estadio se realizaron tres experimentos (cada uno por triplicado). T-test de dos colas para muestras independientes. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$

#### 4.1.5 Efecto de la cocaína en la expresión del receptor *zfdor1*

La exposición de  $1,5 \mu\text{M}$  de clorhidrato de cocaína a los embriones del pez cebra indujo cambios de expresión del mRNA del receptor ZfDOR1 (Barrallo et al., 1998a.b; GenBank acceso No.: NC\_007130.2) en los diferentes estadios que estudiamos. En la figura 25, observamos que la cocaína produce un aumento de expresión de mRNA del receptor ZfDOR1 en los estadios de 8, 16, y 24 hpf, mientras que a las 48 hpf por el contrario, se aprecia una

disminución, siendo tanto el aumento como la disminución estadísticamente significativo. A las 72 hpf, el estadio más desarrollado, observamos que la cocaína no produce un cambio significativo en la expresión del receptor *zfdor1*, donde solo apreciamos una tendencia a la disminución.

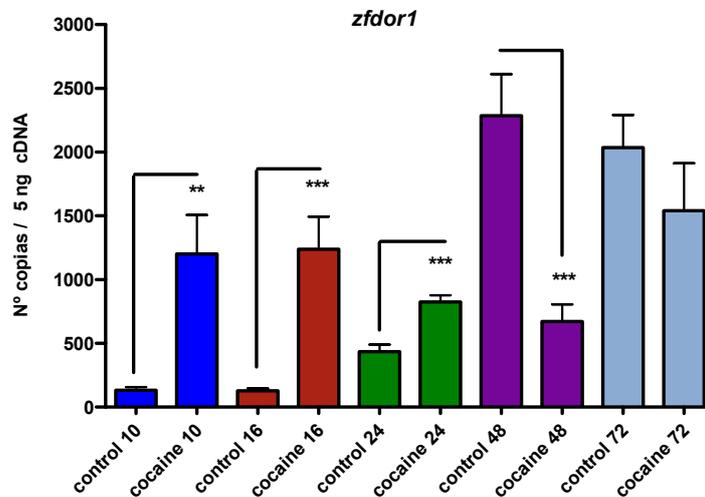


Fig. 25 Representación gráfica de la cuantificación absoluta del receptor opioide *zfdor1* del pez cebra en desarrollo expuestos a 1.5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína con respecto al grupo control. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios 10-16hpf y 150 para los estadios de 24-72hpf. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *zfdor1*  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba de t-student de dos colas para muestras independientes. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

#### 4.1.6 Efecto de la cocaína en la expresión de *zfdor2*

El receptor ZfDOR2 (Pinal-Seoane et al., 2006; GenBank acceso No.: NM\_212755) es un duplicado del gen ZfDOR1, en general muestra un patrón de expresión diferente al de ZfDOR1 tras la exposición de cocaína. A las 8 y 72 hpf observamos que la cocaína induce un aumento y disminución de la expresión de *zfdor2*, respectivamente. Estos cambios encontrados son estadísticamente significativos (Fig. 26). El resto de estadios, 16, 24 y 48 hpf no muestran variaciones significativas tras la exposición de cocaína.

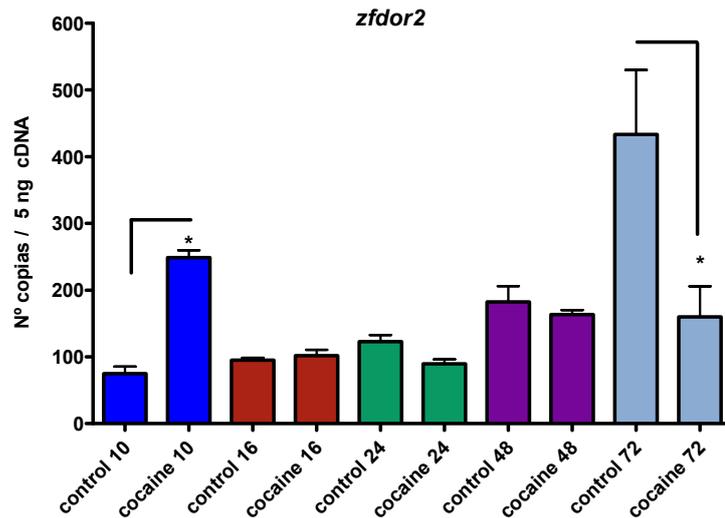


Fig. 26. Representación gráfica de la cuantificación absoluta del receptor opioide *zfdor2* del pez cebra en desarrollo expuestos a 1.5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína con respecto al grupo control. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios 8-16hpf y 150 para los estadios de 24-72hpf. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *zfdor2*  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba de t-student de dos colas para muestras independientes. \*  $P < 0.05$ .

#### 4.1.7 Efecto de la cocaína en la expresión de los receptores opioides *zfmor*, *zfdor1* y *zfdor2* mediante ISH

La alta expresión de los receptores opioides analizados por qPCR en una etapa temprana del desarrollo embrionario del pez cebra (10 hpf) (Fig. 27A, B y C) nos llamó la atención, ya que la presencia de los receptores opioides en estadios tempranos de desarrollo significaría que estos receptores tendrían un papel importante durante la embriogénesis. Por lo tanto, en base a nuestros resultados de qPCR decidimos estudiar la distribución espacial de los receptores opioides mediante ISH.

Esta es la primera vez que los receptores opioides se muestran durante el final del proceso de la gastrulación del pez cebra (aproximadamente 10 hpf). *zfmor* se expresó en la placa neural, en las futuras estructuras cefálicas, a lo largo de todo el eje embrionario, y en la futura región de la cola (Fig. 27A, C y E). Además, *zfmor* se expresó en la región anterior de la placa precordial (Fig. 27C) (vista del

polo vegetal). Una vista dorsal (Fig. 27E) mostró que *zfmor* se expresa en el sitio de las futuras estructuras cefálicas de la placa neural, también en la futura región de la cola. Los embriones expuestos a cocaína a las 5 hpf indujo un aumento en la expresión de *zfmor* en las futuras estructuras cefálicas, a lo largo de todo el eje embrionario, y la región de la cola (Fig. 27B, D y F).

En relación a la distribución espacial de *zfdor1* (Fig. 27G, I y K) y *zfdor2* (Fig. 27 M, O y Q) estos genes se expresaron en regiones similares a la observada para el receptor *zfmor*, es decir en las en las futuras estructuras cefálicas, a lo largo de todo el eje embrionario y la futura región de la cola. Los embriones expuestos a clorhidrato de cocaína mostraron un incremento en la expresión de *zfdor1* (Fig. 27H, J y L) y *zfdor2* (Fig. 27N, P y R) en las regiones mencionadas.

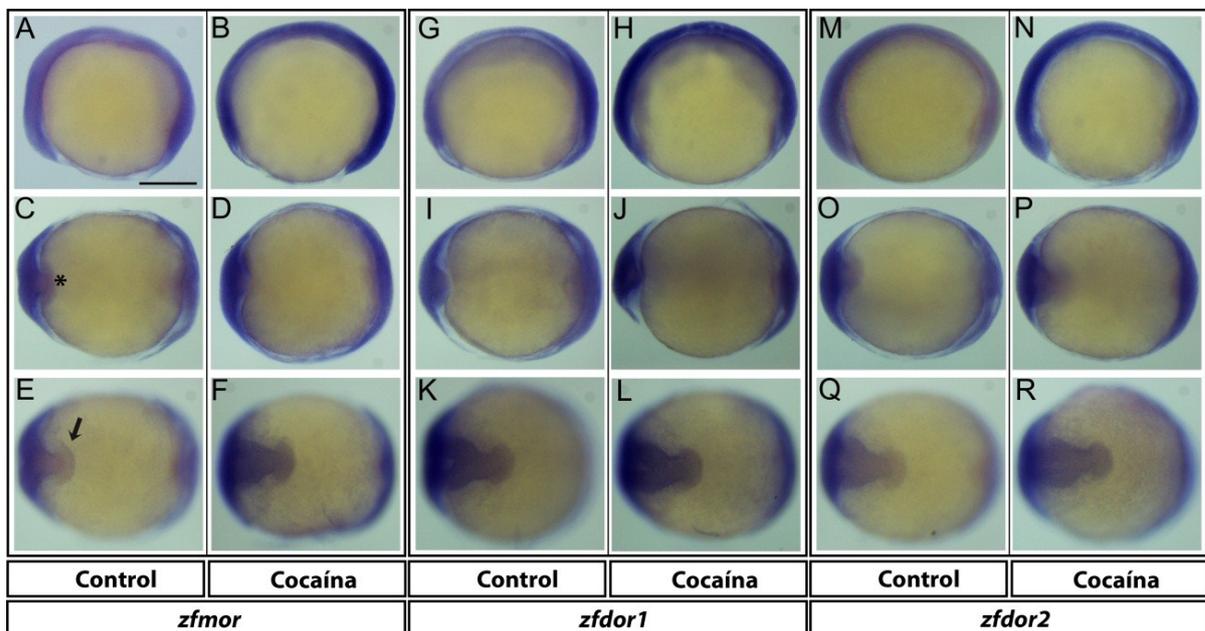


Fig. 27. Expresión de *zfmor* (A, C y E), *zfdor1* (G, I y K) y *zfdor2* (M, O y Q) durante la etapa de gástrula tardía (aproximadamente a las 10 hpf). En todas las figuras la parte anterior está a la izquierda. Para cada receptor opiode en el lado izquierdo y derecho se muestran los embriones expuestos y no expuestos a cocaína, respectivamente. A y B, vistas laterales (se aplica para G y H, M y N). C y F, vista de los embriones desde el polo animal (se aplica para I y L, O y R). La flecha indica el desarrollo del SNC. El asterisco muestra el *Polster*. La barra de escala: 250 micras en A (aplica de A-R).

Además, estudiamos la expresión de los receptores opioides ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2 (a las 24 y 48 HPF, con sus respectivas ribosondas). La expresión de *zfmor* fue encontrado en el SNC, en el telencéfalo, diencefalo, techo óptico, el cerebro medio, el límite de mesencéfalo-rombencéfalo (MHB), cerebelo, los ojos y somitas embriones (Fig. 28A, C y E). Los embriones expuestos a la cocaína incrementaron su expresión de *zfmor* en el techo óptico, el cerebro medio, rombencéfalo (Fig. 28B, D y F). A las 48 hpf la distribución de *zfmor* fue distribuida en las mismas regiones observadas a las 24 hpf, y además se expresó en el fascículo longitudinal medio (MLF), notocorda, aleta pectoral y el hogar (Fig. 28G, I y K). La cocaína indujo una disminución en la expresión de *zfmor* en el telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, MLF y rombencéfalo (Fig. 28H J y L) a las 48 hpf.

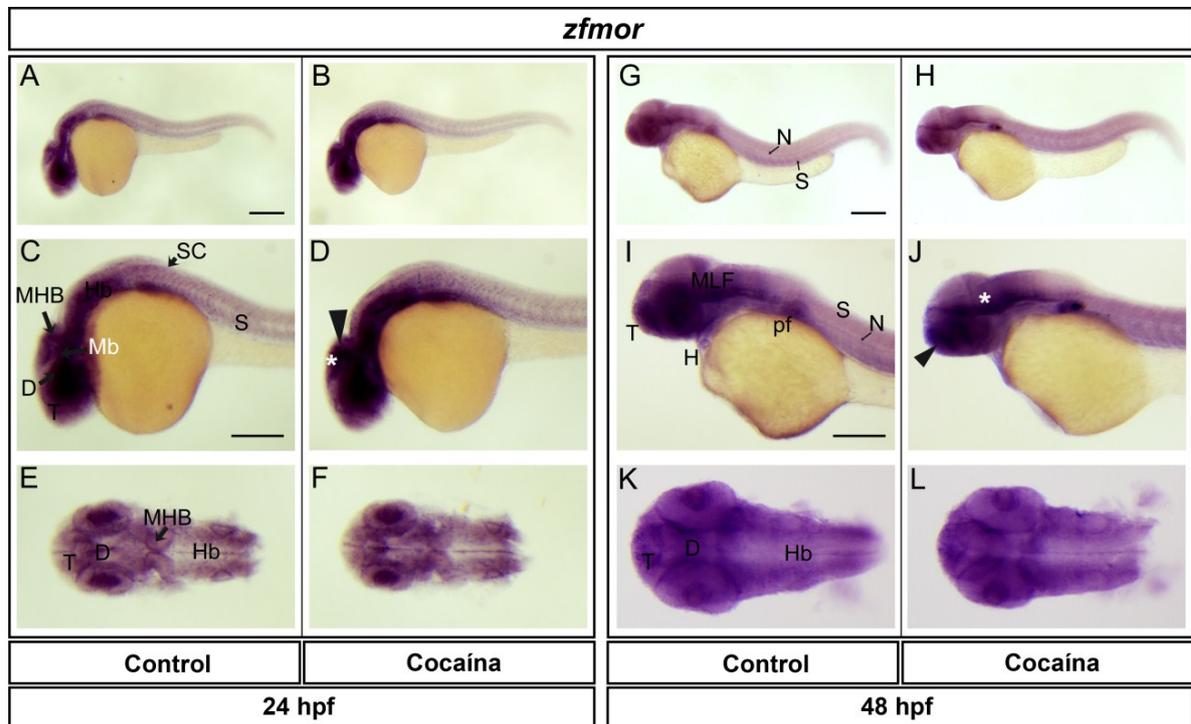


Fig. 28. Distribución espacial de *zfmor* a las 24 y 48 hpf. Vista lateral (A-D, G-J), vistas dorsal (E-F, K-L). a las 24 hpf, *zfmor* se distribuye en el telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo (techo óptico), MHB, rombencéfalo, la médula espinal, los ojos y somitas. Los embriones expuestos a cocaína incrementan su expresión en el techo óptico y el MHB (cabeza de flecha y asterisco, respectivamente). A las 48 hpf *zfmor* se expresa de forma similar que a las 24 hpf, y adicionalmente en la aleta pectoral MLF, notocorda y el corazón. La cocaína induce una disminución de *zfmor* en el telencéfalo y el MLF (cabeza de flecha y asterisco, respectivamente). Abreviaturas: T: telencéfalo, Mb: mesencéfalo, Hb: rombencéfalo, D: diencefalo, N: notocorda; S: somita; PF: aleta pectoral; H: corazón. Barra de escala: 200 micras en A (se aplica a B, G y H) y 250 micras en C e I (se aplica a C-F e I-L).

En el caso de *zfdor1*, este receptor mostró una distribución en las mismas áreas que *zfmor* a las 24 hpf: telencéfalo, diencéfalo, techo óptico, el cerebro medio, MHB, cerebelo, médula espinal y somitas (Fig. 29A, C y E). A las 48 hpf *zfdor1* se expresó en las mismas regiones que a las 24 hpf y además en MLF, notocorda, corazón, aleta pectoral y somitas (Fig. 29G, I y K). Los embriones expuestos a cocaína mostraron un leve incremento de *zfdor1* en el SNC a las 24 hpf (telencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo) (Fig. 29B, D y F), mientras que a las 48 hpf la expresión de *zfdor1* se redujo en el telencéfalo y el MLF (Fig. 29H, J y L).

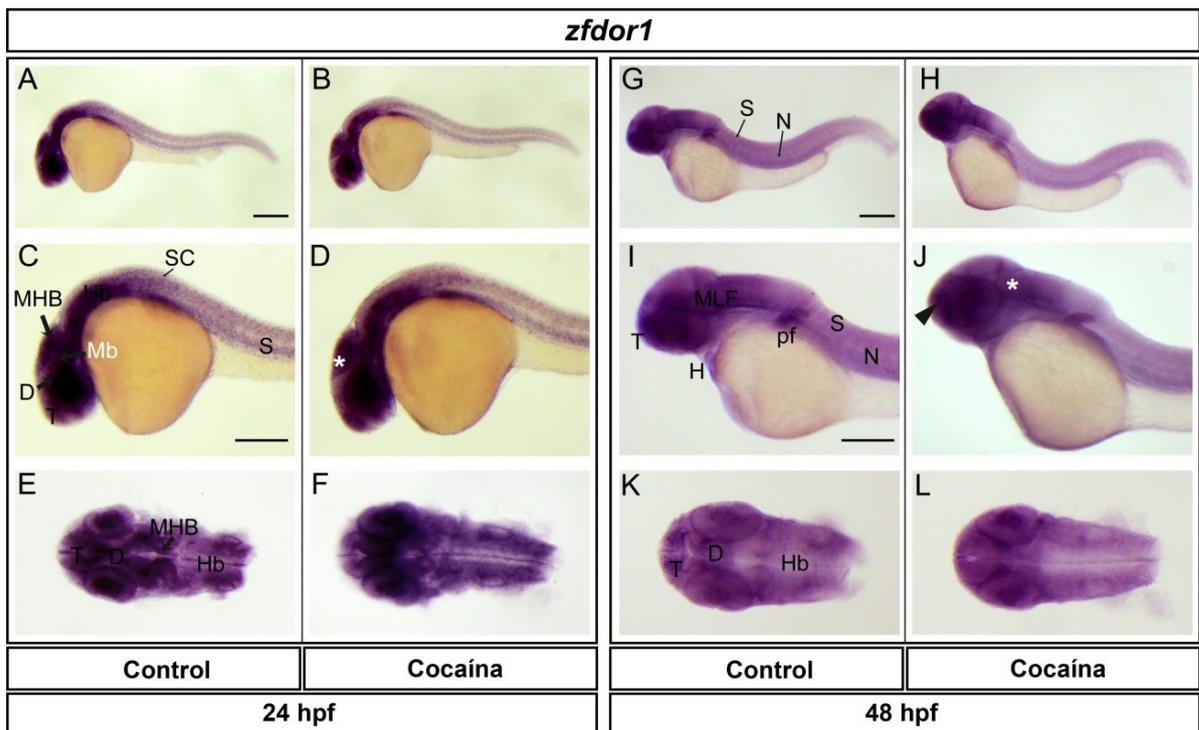


Fig. 29. Distribución espacial de *zfdor1* a las 24 y 48 hpf. Vista lateral (A-D, G-J), vistas dorsal (E-F, K-L). El receptor *zfdor1*, a las 24 hpf, se distribuye en el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo (techo óptico), MHB, rombencéfalo, la médula espinal, los ojos y somitas. Los embriones expuestos a cocaína aumentan su expresión en el techo óptico (asterisco). A las 48 hpf *zfdor1* se expresa de forma similar que a las 24 hpf, y además en la aleta pectoral MLF, notocorda y el corazón. La cocaína induce una disminución de *zfdor1* en el telencéfalo y el MLF (cabeza de flecha y asterisco, respectivamente). Abreviaturas: T: telencéfalo, Mb: mesencéfalo, Hb: rombencéfalo, D: diencéfalo, SC: médula espinal; N: notocorda; S: somita; PF: aleta pectoral; H: corazón. Barra de escala: 200 micras en A (se aplica a B, G y H) y 250 micras en C e I (se aplica a C-F e I-L).

En cuanto al duplicado del receptor opioide delta, *zfdor2*, este receptor a las 24 hpf, al igual que *zfmor* y *zfdor1*, se expresó en las mismas regiones del SNC y de la periferia (telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, MHB, cerebelo, los ojos y somitas) (Fig. 30A, C y E). A las 48 hpf de desarrollo embrionario *zfdor2* se distribuyó en las mismas regiones que a las 24 hpf antes descritas y adicionalmente en el MLF y la notocorda (Fig. 30G, I y K). Cuando los embriones fueron expuestos a la cocaína a las 5 hpf, estos no mostraron cambios evidentes en la expresión *zfdor2* analizados a las 24 hpf (Fig. 30B, D y F) y a las 48 hpf (30H, J y L), excepto en la médula espinal donde se observó un incremento en la expresión de *zfdor2* a las 24 hpf con respecto a los embriones del grupo control.

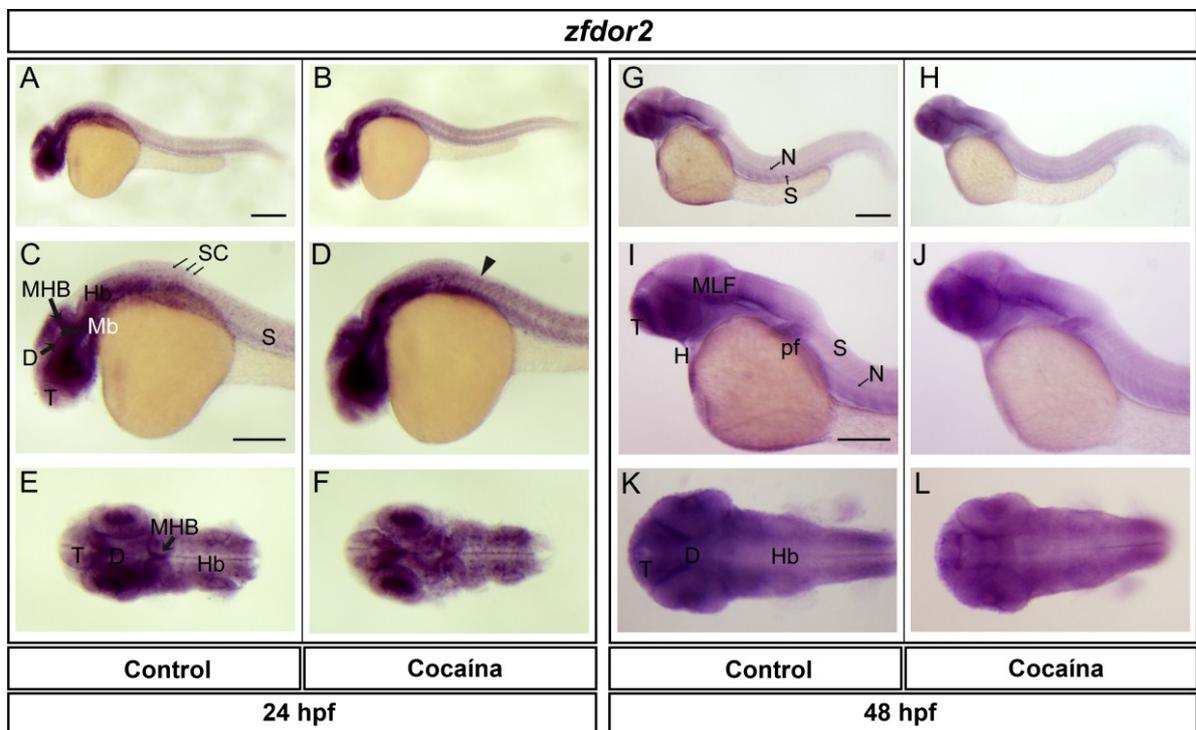


Fig. 30. Distribución espacial de *zfdor2* a las 24 y 48 hpf. Vista lateral (A-D, G-J), vistas dorsal (E-F, K-L). A las 24 hpf *zfdor2* se distribuye en el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo (techo óptico), MHB, rombencéfalo, la médula espinal, los ojos y somitas. A las 48 hpf *zfdor2* se expresa de forma similar que a las 24 hpf, y adicionalmente en la aleta pectoral, MLF, notocorda y el corazón. Tras la exposición de cocaína los embriones expuestos a cocaína nos mostraron cambios evidentes, excepto un incremento en la expresión en la médula espinal a las 24 hpf (cabeza de flecha). Abreviaturas: T: telencéfalo, Mb: mesencéfalo, Hb: rombencéfalo, D: diencéfalo, SC: médula espinal; N: notocorda; S: somita; PF: aleta pectoral; H: corazón. Barra de escala: 200 micras en A (se aplica a B, G y H) y 250 micras en C e I (se aplica a C-F e I-L).

#### 4.1.8 La cocaína modula la expresión de *dre-let-7d* y sus precursores (RT-qPCR).

El miRNA *let-7d* de humanos presentó un alto grado de homología con el *dre-let-7d* del pez cebra (72%), además *dre-let-7d* muestra una alta homología (de 63 a 81%) con los otros miembros de la familia de miRNAs *let-7* de humanos (*let-7a*, *7b*, *7c*, *7e*, *7f*, *7g* y *7i*) (Fig. 31D). Para determinar si la cocaína afecta a la expresión de *dre-let-7d* (MIMAT0001762) y sus precursores, *dre-let-7d-1* (MI0001868) y *dre-let-7d-2* (MI0001870) (las secuencias se obtuvieron de miRBase: [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) los embriones fueron expuestos a 1,5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína a las 5 hpf y cuando alcanzaron las 24 y 48 hpf de desarrollo embrionario, los embriones fueron sacrificados. El perfil de expresión, determinada por qPCR, mostró una mayor expresión de *dre-let-7d* a las 48 hpf en relación a las 24 hpf. Por otra parte, los embriones expuestos a la cocaína mostraron un incremento en los niveles de expresión de *dre-let-7d* a las 24 y las 48 hpf (Fig. 31A) con respecto a sus grupo control, siendo la diferencia estadísticamente significativa sólo a las 48 hpf ( $P=0.003$ ). El precursor *dre-let-7d-2* presenta una mayor expresión con respecto a *dre-let-7d-1* a las 24 hpf, mientras que a las 48 hpf *dre-let-7d-1* se expresó casi tres veces más con respecto a *dre-let-7d-2*. Cuando los embriones fueron expuestos a la cocaína, éstos mostraron un aumento de *dre-let-7d-1* (Fig. 31B) a las 24 y de 48 hpf, se encontraron diferencias significativas sólo a las 48 hpf ( $P=0.0003$ ). Además, tras la exposición de cocaína, *dre-let-7d-2* muestra un aumento de su expresión a las 48 hpf (Fig. 31C) ( $P=0.04$ ), mientras que no se observan cambios sustanciales a las 24 hpf.

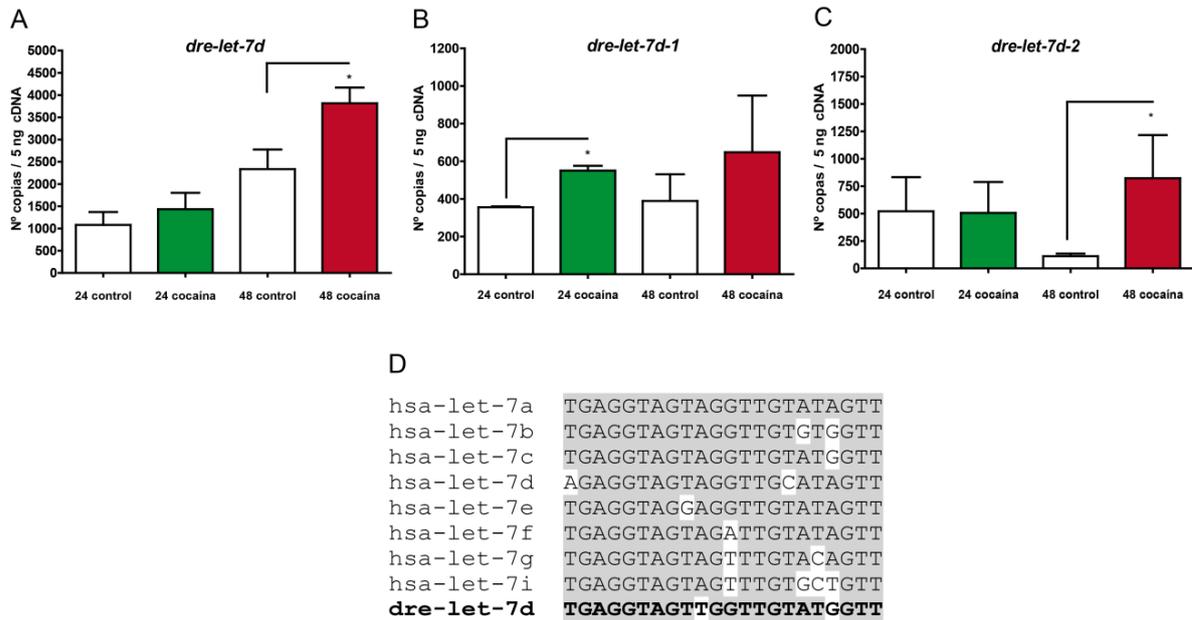


Fig. 31. Efectos de la cocaína sobre la expresión de los niveles de mRNA *dre-let-7 D* (A), *dre-let-7d-1* (B) y *dre-let-7d 2* (C) en los embriones expuestos y no expuestos a cocaína. Los niveles de expresión génica se cuantificaron como intensidad de fluorescencia, utilizando la qPCR y se normalizaron con la expresión del gen de referencia *ef1a*. El RNA total se aisló a partir de doscientos embriones y se utilizó para sintetizar cDNA. Las barras de los gráficos representan la media de copias de mRNA en cada estadio de desarrollo  $\pm$  EEM. Los datos provienen de tres experimentos independientes y cada uno se realizó tres veces por qPCR. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t Student de dos colas. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

D) Secuencias de DNA del miRNA let-7d en vertebrados, humano y pez cebra. Las secuencias conservadas se muestran sombreadas de color gris. Las abreviaciones de humano (*Homo sapiens*) y el pez cebra (*Danio rerio*) se denotan como *has* y *dre*, respectivamente. Los números de accesos (de acuerdo con miRBase) de los diferentes miRNA let-7d fueron: HSA-let-7a (MI0000060), HSA-le-7b (MI0000063), hsa-let-7c (MI0000064), hsa-let-7d (MI0000065), HSA-let-7e (MI0000066), HSA-let-7f (MI0000067), hsa-let-7 g (MI0000433), HSA-let-7i (MI0000434) y dre-7d-(MI0001868).

Los resultados de la expresión por qPCR de los precursores de *dre-let-7d-1* y *dre-let-7d-2* y del miRNA maduro *dre-let-7d* también fueron normalizados tomando como gen de referencia la expresión de *ef1a*. La expresión del gen de referencia que empleamos, *ef1a*, no muestra variaciones significativas en su expresión en los embriones expuestos a cocaína con respecto a los embriones del grupo control. Como se observa en la figura 32 observamos que la cocaína induce un aumento de la expresión de *ef1a* a las 24 hpf (de  $2,026 \times 10^6 \pm 95840$  a  $2,242 \times 10^6 \pm 326400$  copias de cDNA), mientras a las 48 hpf induce una disminución de  $2,279 \times 10^6 \pm 8920$  a  $1,939 \times 10^6 \pm 111200$  copias de cDNA. Las variaciones observadas pueden considerarse dentro de lo normal, por la

variabilidad existente entre cada uno de los individuos. La exigua variación en la expresión de *ef1 $\alpha$*  en los estadios de 24 y 48 hpf corrobora que este gen puede ser empleado como un gen de referencia fiable durante el desarrollo y tras la exposición de fármacos (en nuestro caso clorhidrato de cocaína) (Fig. 32).

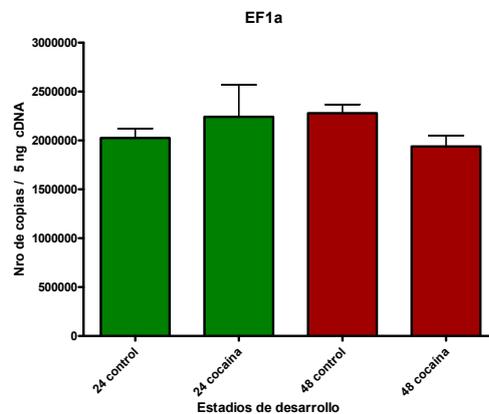


Fig. 32. Cuantificación absoluta del gen de referencia *ef1 $\alpha$*  en embriones del pez cebra expuestos a 1.5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína comparados con el grupo control. Dosecientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios 24 y 48 hpf. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *ef1 $\alpha$*  en cada estadio  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. \*  $P \leq 0.05$ . Prueba t-student de dos colas para muestras independientes.

#### 4.1.9 Efectos de la cocaína en la expresión espacial de *dre-let-7d*.

Utilizando sondas LNA<sup>TM</sup>, encontramos que la distribución de *dre-let-7d* en el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, MHB, rombencéfalo, los ojos y somitas (Fig. 33A, C y E) a las 24 hpf. A las 48 hpf de desarrollo *dre-let-7d* se distribuyó en las mismas regiones que las observadas a las 24 hpf y adicionalmente en el MLF y la notocorda (Fig. 33G, I y K). Los embriones expuestos a la cocaína según la ISH mostraron un incremento en la expresión de *dre-let-7d* a las 24 hpf en el telencéfalo, mesencéfalo, MHB y rombencéfalo (Fig. 33B, D y F). Asimismo, a las 48 hpf la cocaína regula la expresión de *dre-let-7d* en el telencéfalo y MLF (Fig. 33H, J y L). Es importante destacar que la exposición de cocaína a los embriones de pez cebra produce un aumento en la expresión de *dre-let-7d* según lo observado por ISH (Fig. 33A) a las 24 hpf, este resultado es similar al incremento observado por los experimentos realizados por qPCR.

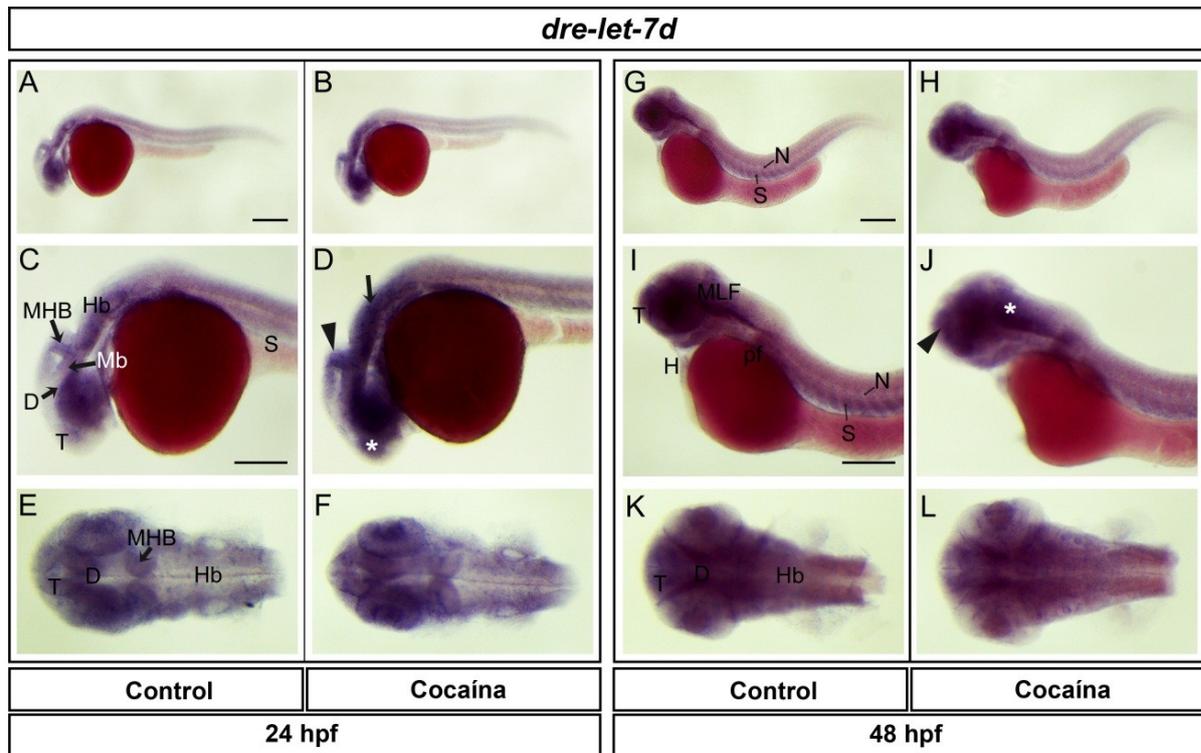


Fig. 33. Distribución espacial de *dre-let-7d* a las 24 y 48 hpf. Vistas laterales (A-D, G-J), vistas dorsales (E-F, I-L). *dre-let-7d* muestra una distribución en el telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, (techo óptico), MHB, rombencéfalo, ojos y somitas. Tras la exposición de cocaína los embriones muestran un incremento de su expresión en el telencéfalo, MHB y el rombencéfalo (asterisco, cabeza de flecha y flecha, respectivamente). A las 48 hpf de desarrollo, *dre-let-7d* se expresa en regiones similares a las expresadas a las 24 hpf, pero adicionalmente se expresa en el telencéfalo, notocorda, aleta pectoral, y corazón. La cocaína induce un incremento en el telencéfalo, y MLF (cabeza de flecha y asterisco, respectivamente). Abreviaciones: T: telencéfalo, Mb, mesencéfalo, Hb: rombencéfalo, D: diencéfalo, N: notocorda; S: somita; pf: aleta pectoral; H: corazón. Barra de escala: 200  $\mu$ m en A (aplica para B, G y H) y 250  $\mu$ m en C (aplica para D, E, F, I, J, K y L).

#### 4.1.10 La microinyección de DNA de los receptores opioides y del 3'UTR-ZfMOR afecta la expresión de *dre-let-7d* y sus precursores

Según los resultados mostrados en los apartados anteriores, determinamos que la cocaína afecta la expresión de los receptores opioides, del miRNA *let-7d* y sus precursores *dre-let7-d-1* y *dre-let7-d-2*. Los miRNAs regulan la expresión de genes por su unión a la región 3'UTR (mayoritariamente), 5'UTR (algunos miRNAs) de miRNAs específicos y también en la secuencia del mRNA que será traducida a proteína (CDC), Inhibiendo así la translación y promoviendo la degradación de la transcripción. Por ello, con el fin de evaluar si algún(os) receptor(es) opioide del

pez cebra (ZfDOR1, ZfDOR2, ZfMOR) es un diana potencial del miRNA dre-let-7d, microinyectamos la secuencia nucleotídica completa de los receptores ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y además la región 3'UTR-ZfMOR. Nuestra hipótesis fue: la sobreexpresión de la(s) diana(s) de dre-let-7d, por microinyección, en estadios iniciales del desarrollo del pez cebra produce un incremento de la expresión de dre-let-7d y sus precursores. Para concretar nuestra hipótesis nos propusimos como objetivo clonar e insertar los receptores opioides y la región 3'UTR-ZfMOR en el vector pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup>. Por ello realizamos PCRs de ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y 3'UTR-ZfMOR y por electroforesis en gel de agarosa, con el empleo de un transiluminador de luz UV, observamos las bandas correspondientes a los amplicones esperados (según el diseño de los oligonucleótidos) (Fig. 34).



Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa de los receptores opioides (que incluye todo el ORF), ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y 3'UTR-ZfMOR. Las bandas visualizadas, correspondientes a los amplicones esperados, ZfMOR (1194 pb), ZfDOR1 (1144 pb), ZfDOR2 (1122 pb) y 3'UTR-ZfMOR (1040 pb). C-: control negativo.

Una vez visualizados los productos de PCR, estos fueron recortados y purificados por un sistema de columnas de sílica. Los productos de PCR purificados luego fueron ligados en el vector bacteriano pCR<sup>®</sup> II-TOPO<sup>®</sup>. Insertado nuestra secuencia de interés en el vector realizamos la siembra de los vectores plasmídicos en placas de agar con la finalidad de obtener colonias bacterianas que

expresen nuestro inserto de interés en grandes cantidades. De las numerosas colonias que crecieron en las placas de agar seleccionamos varias para realizar las minipreps con el propósito de obtener DNA plasmídico que hubiese incorporado nuestro inserto de interés. Para corroborar que nuestras secuencias de interés estaban contenidas en el plásmido realizamos digestiones con enzimas de restricción que nos digiriesen en sitios específicos del plásmido y de nuestro inserto (Fig. 35). Para determinar los amplicones del producto de la digestión empleamos el software *Serial Cloner* en el cual introducimos nuestra secuencia de interés insertado en el vector pCR® II-TOPO® para realizar una digestión virtual con enzimas de restricción que reconociesen secuencias en el plásmido y en el inserto de nuestro interés.

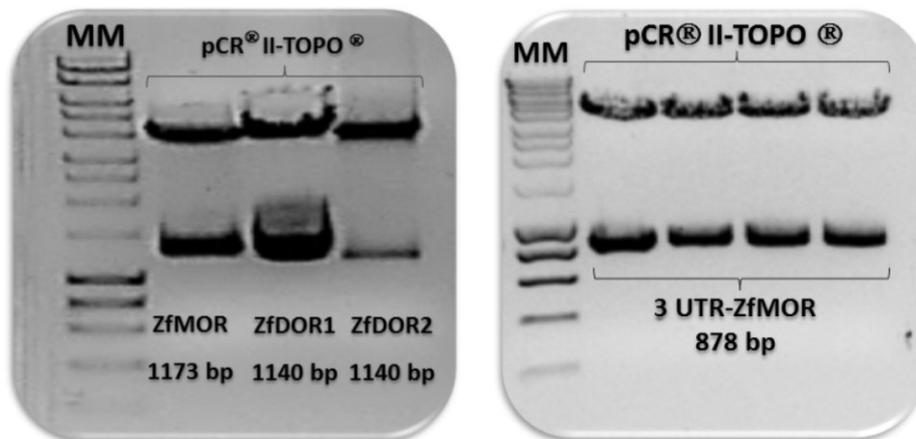


Fig. 35. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de los receptores opioides, ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y 3'UTR ZfMOR insertados en el vector plasmídico pCR® II- TOPO®. Los receptores opioides fueron digeridos con EcoRI y la región 3'UTR-ZfMOR fue digerido con HindIII.

La concentración de 500pg/3nl de DNA, de nuestros genes de interés, se microinyectaron en el vitelo de embriones de peces cebrá (en el estadio de 1 a 4 células). Para obtener la secuencia de DNA exclusivamente de los receptores opioides realizamos las digestiones con EcoRI que digiere las secuencia de DNA casi exclusivamente de los receptores opioides clonados en el plásmido pCR®II-TOPO® con una mínima proporción de nucleótidos del plásmido (EcoRI esta

flanqueando, en todos los casos, las secuencias de nuestro interés). En el caso de la secuencia ZfMOR-3'UTR se digirió con la enzima HindIII. Realizadas las digestiones enzimáticas estos fueron visualizados en el de agarosa al 0,8% por la exposición a la luz ultravioleta, luego purificamos por el sistema de columnas de sílica (a partir de los geles) (Fig. 35). Una vez, que los embriones microinyectados (con las secuencias de DNA de los receptores opioides) han alcanzado las 48 hpf, estos fueron recolectados para la extracción de RNA, posterior obtención de cDNA. De este último producto utilizamos 5ng/μl de cDNA para realizar las qPCR.

Para determinar si los precursores del miRNA let-7d (dre-let-7d-1 y dre-let-7D-2) y el miRNA maduro dre-let-7d son reguladores endógenos de los receptores opioides, se microinyectó las secuencias de DNA de los receptores opioides ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2, y se evaluó la expresión de dre-let-7d y sus precursores por qPCR. La microinyección de DNA de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2) en el estadio de una célula, indujo un incremento en la expresión de *zfmor*, *zfdor1* y *zfdor2* ( $P=0.03$ ,  $P=0.0002$  y  $P=0.03$ , respectivamente) a las 48 hpf (Fig. 36A). El transcrito de *zfmor* alcanzó una mayor expresión con respecto a los receptores opioides delta *zfdor1* y *zfdor2*. Estos resultados muestran que la sobreexpresión de los receptores opioides es consecuencia de la microinyección del DNA de los receptores opioides.

Cuando la secuencia de DNA de ZfMOR se inyectó se observó que dre-let-7d-1 (Fig. 36B) disminuye su expresión, mientras que dre-let-7d-2 (Fig. 36C) incrementó la transcripción de mRNA a las 48 hpf, en ambos casos los cambios fueron estadísticamente significativos. La microinyección de DNA de ZfMOR-3'UTR no produjo cambios en la expresión de dre-let-7d-1 (Fig. 36D), sin embargo si produjo una disminución de la expresión de dre-let-7d-2 (Fig. 32E,  $P=0.002$ ) a las 48 hpf. De acuerdo a nuestras observaciones, la microinyección de DNA de ZfDOR1 no

alteró la transcripción de dre-let-7d1 (Fig. 36F), pero sí la expresión de dre-let-7d-2, que mostró un aumento de la expresión de mRNA (Fig. 36G,  $P=0.02$ ). Cuando el DNA de ZfDOR2 se microinyectó en el estadio de una célula y los embriones fueron posteriormente analizados a las 48 hpf, dre-let-7d-1 (Fig. 36H) ni dre-let-7d-2 (Fig. 36I) mostraron cambios sustanciales en su expresión. Finalmente, la microinyección de DNA de ZfMOR incrementó la expresión de miRNA maduro dre-let-7d, mientras que la microinyección de DNA de ZfDOR1 produjo una disminución de dre-let-7d (Fig. 36J) en el estadio de las 48 hpf de desarrollo embrionario.

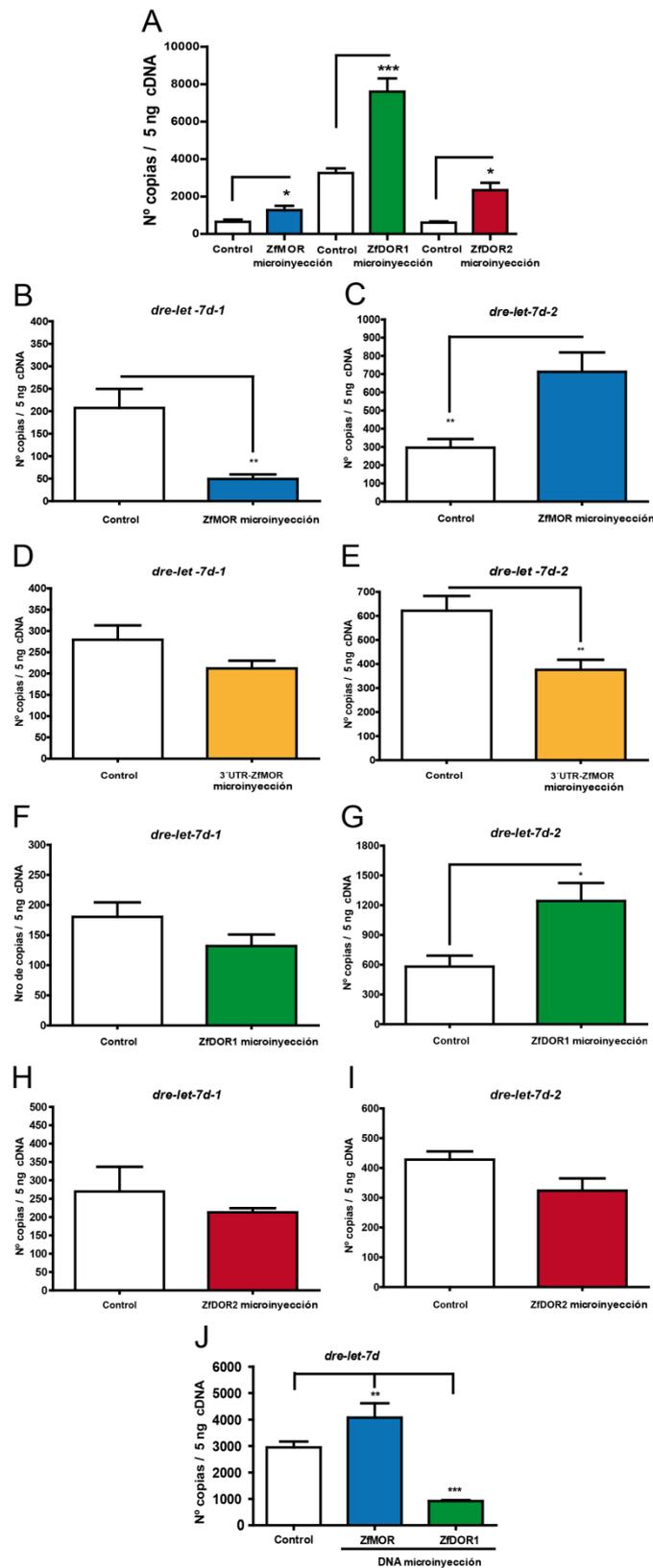


Fig. 36. (A) Cuantificación de la expresión de *zfmor*, *zfdor1* y *zfdor2* por qPCR las 48 hpf. Expresión de *dre-let-7d-1* (B, D, F y H), *dre-let-7d-2* (C, E, G e I) y *dre-let-7d* (J) tras la microinyección de DNA de: 3'UTR-ZfMOR, ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2. Los niveles de expresión génica se cuantificaron como intensidad de fluorescencia, utilizando la técnica de la qPCR. La expresión de los mRNA se normalizó en base a la expresión de *ef1a*. Doscientos embriones se utilizaron para extraer el RNA y sintetizar el cDNA. Las barras de error representan la media de copias de mRNA en cada estadio de desarrollo  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. A-I: los valores de P fueron calculados por la prueba de t-student de dos colas para muestras independientes (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ ). J fue analizado empleando el análisis de varianza (ANOVA) con el *post hoc* de Dunnett: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 4.1.11 Efecto de la cocaína en la expresión de proteínas implicadas en la biogénesis del miRNA.

La biogénesis de los miRNAs se inicia en el núcleo con la transcripción de pri-miRNA (Breving y Esquela-Kerscher, 2010), luego la enzima Drosha procesa el pri-miRNA y produce el precursor del pre-miRNA. Posteriormente, una vez que el precursor del MiRNA es exportado al citoplasma la enzima Dicer fragmenta el pre-miRNA en un miRNA maduro (Jaskiewicz y Filipowicz, 2008). De entre todas las proteínas argonautas, el Ago2 es una de los componentes catalíticos de RISC (Song y cols., 2003) que exclusivamente presenta una actividad endonucleasa, siendo así la unidad efectora del miRNA (Meister y cols., 2004; Rand y cols., 2005). De acuerdo a lo mencionado anteriormente, los cambios producidos por la acción de la cocaína en la expresión de las proteínas relacionadas en la biogénesis de los miRNAs podrían tener consecuencia en la expresión de los precursores del miRNA y del miRNA maduro. Para poder estudiar estas proteínas implicadas en la biogénesis del miRNA diseñamos oligonucleótidos específicos para Ago2, Dicer y Drosha, y realizamos PCR básicas (Fig. 37).

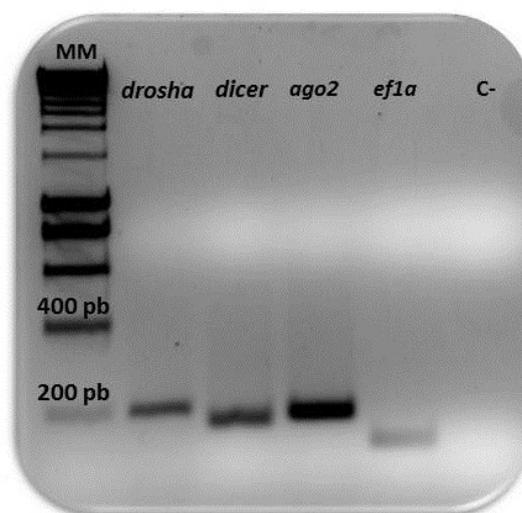


Figura 37. Electroforesis en gel de agarosa de las proteínas implicadas en la biogénesis de los miRNAs. Drosha, Dicer y Ago2. Las bandas visualizadas, correspondientes a los amplicones esperados, *drosha* (199 pb), *dicer* (175 pb), *ago2* (175 pb) y *ef1a* (136 pb). Abreviaturas: MM: marcador de peso molecular; C-: control negativo.

Una vez que comprobamos que nuestros oligonucleótidos son específicos estudiamos la expresión de mRNA de *ago2*, *dicer* y *drosha* por qPCR. Nuestros resultados obtenidos por qPCR muestran que los embriones expuestos a cocaína inducen una alteración en la expresión de mRNA de Drosha, Dicer y Ago2, tanto a las 24 y 48 hpf. La expresión de *drosha* muestra un incremento por efecto de la cocaína (de 1362 a 2198 copias de mRNA) ( $P=0.02$ ) a las 24 y a las 48 hpf (de 1530 a 2309 copias) ( $P=0.0001$ ) (Fig. 38A). Asimismo, la cocaína indujo un incremento de *dicer* a las 24 hpf (de 904,9 a 2076 copias) ( $P=0.002$ ) y a las 48 hpf (a partir de 2485 copias 845.8) ( $P=0.001$ ) (Fig. 38B). Por último, *ago2* incrementó su expresión a las 24 (de 835.6 a 1098 copias) y 48 hpf (de 1066 a 1939 copias) (Fig. 38C) por efecto de la cocaína, en ambos casos los cambios en la expresión fueron estadísticamente significativos ( $P=0.0001$  y  $P=0.0002$ ), respectivamente.

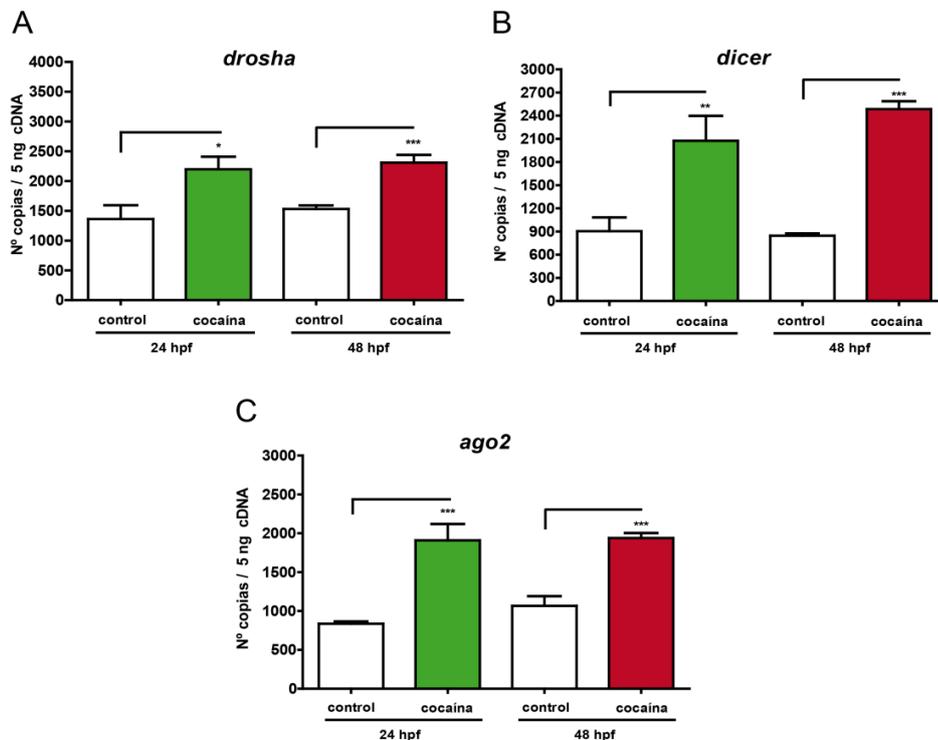


Fig. 38. Efectos de la cocaína en la expresión de mRNA de las proteínas implicadas en la biogénesis de los miRNAs: Drosha (A), Dicer (B) y Ago2 (C). Los niveles de expresión génica se midieron como intensidad de fluorescencia utilizando la qPCR y se normalizaron con respecto a la expresión *ef1a*. Doscientos embriones se utilizaron para extraer el RNA y sintetizar cDNA. Las barras de error representan la media de copias de mRNA en cada estadio de desarrollo  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Los valores de P fueron calculados empleando la prueba de t-student de dos colas para muestras independientes (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ ).

#### 4.1.12 El silenciamiento de los receptores opioides sobre la expresión de *dre-let-7d* y sus precursores (estudios de qPCR).

Dado que los receptores opioides (MOR) se consideran dianas de la familia del miRNA *let-7d* (Chandrasekar y Dreyer, de 2009; He et al, 2010), hipotetizamos que el silenciamiento de los receptores opioides afecta la expresión de *dre-let-7d* y sus precursores. Por lo tanto para determinar nuestra hipótesis microinyectamos MO de los receptores de opioides (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfDOR1-ZfDOR2 (ZFDPOR1 y 2)). La microinyección de los MOs de los receptores opioides no alteró la morfología de los embriones durante el desarrollo, sin embargo se produjo un retraso en el desarrollo de los embriones microinyectados con MOs comprados con respecto al grupo control (sin microinyección de embriones MOs).

El silenciamiento de la expresión de los receptores opioides, ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZFDPOR1 y 2, por microinyección de los MOs en el vitelo (en el estadio de 1 a 4 células) afectó la expresión de *dre-let-7d* y sus precursores a las 48 hpf. Cuando los MOS de ZfDOR1 y ZfDOR1 y 2 fueron microinyectados observamos una disminución de *dre-let-7d-1* (Fig. 39A). Además, los MOs microinyectados de ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2 produjo una disminución de *dre-let-7d-2* a las 48 hpf (Fig. 39B). Asimismo, la microinyección de los MOs de ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfDOR1 y 2 indujeron una disminución de la expresión del miRNA maduro *dre-let-7d* en el pez cebra (Fig. 39C,  $P=0.05$ ). Para determinar que los cambios observados tras la microinyección de los MOs eran debidos a la acción de los morfolinós sobre sus dianas, empleamos dos grupos controles; uno denominado grupo MO control (al cual se le microinyectó un MO sin actividad biológica) y el otro grupo control (en el que se microinyectó el medio E3). De acuerdo con nuestras observaciones, ni el grupo MO control ni el grupo control mostraron variaciones sustanciales uno respecto al otro, indicando que los MOs de

los receptores opioides están ejerciendo su acción sobre el mRNA de los receptores opioides. Además, descartamos que la presión ejercida por el volumen microinyectado del MO control afecte la expresión de los precursores y el miRNA maduro de *let-7d* (Fig. 39A, B y C).

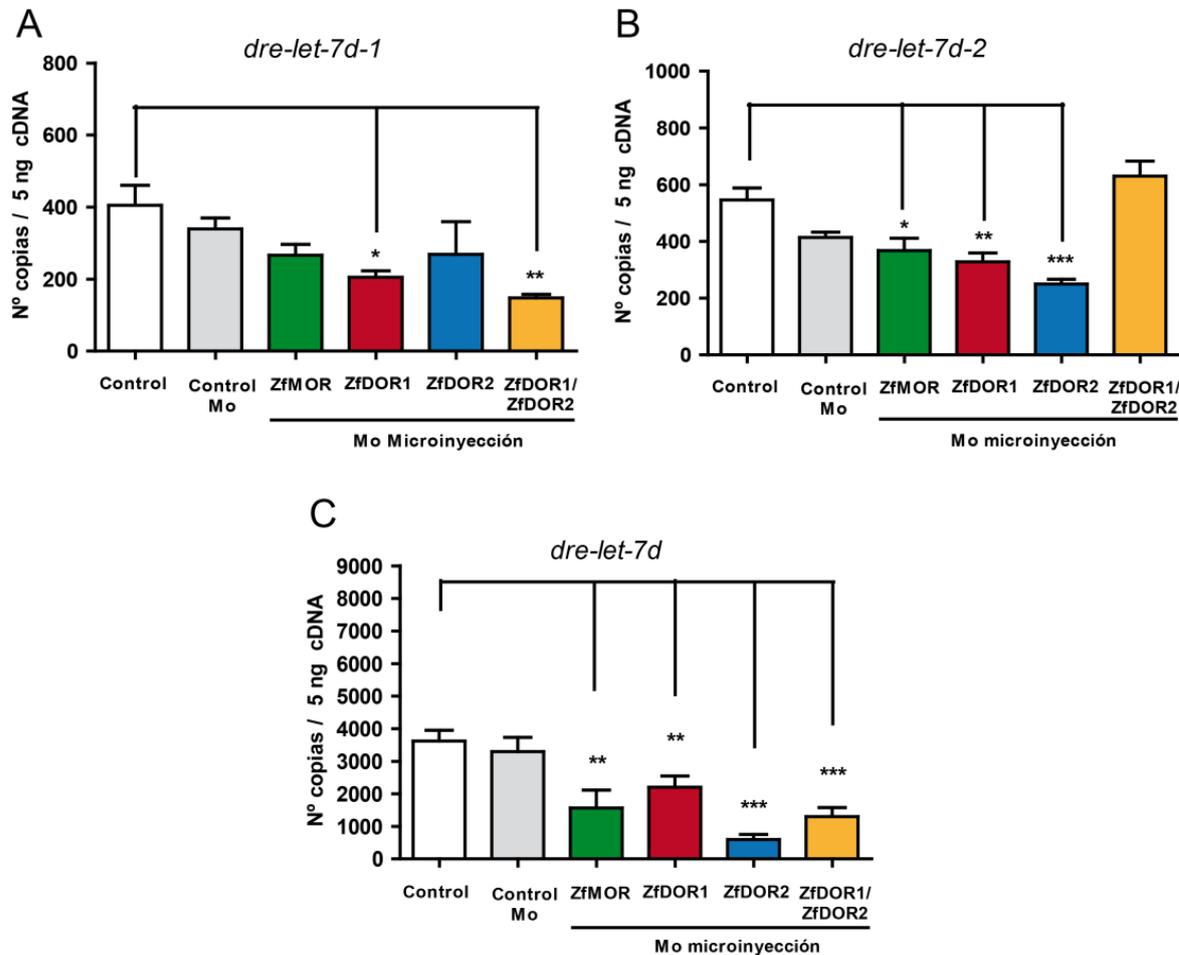


Fig. 39. Efectos de la microinyección de los MOs de los receptores opioides sobre los niveles de expresión de mRNA de *dre-let-7d-1* (A), *dre-let-7d-2* (B) y *dre-let-7d* (C) a las 48 hpf. Los MOs de ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 ZfDOR1 y 2 se microinyectaron en el vitelo en el estadio de desarrollo de uno a cuatro células. Ciento cincuenta embriones fueron utilizados para la extracción de RNA. Cada barra representa el número de copias de cDNA  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno fue realizado por triplicado. El análisis estadístico fue realizado empleando el análisis de varianza (ANOVA de una vía) con el *post hoc* de Dunnett: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 4.1.13 Efectos de la cocaína en los procesos de proliferación y apoptosis.

Los estudios de inmunohistoquímica (IHC) mostraron que la cocaína aumentó el número de células proliferativas (Fig. 40A y B) a las 24 hpf en 80% de H3P (H3P medida en porcentaje) (Fig. 40I) ( $P=0.030$ ). Asimismo, a las 48 hpf la cocaína indujo un aumento de H3P (Fig. 40C y D) en 5% con respecto al grupo control (Fig. 35I). En el caso de las células apoptóticas, los embriones expuestos a cocaína incrementaron la proteína p53 o conocida también como pro-apoptótica (p53 medido en porcentaje) (Figura 40A y B) en 65% a las 24 hpf ( $P=0.0495$ ) (Fig. 40J). A las 48 hpf la cocaína disminuyó p53 (Fig. 40C y D) en 17% (Fig. 40I). Finalmente, mediante la técnica de TUNEL encontramos que el número de células apoptóticas (medida en porcentaje) se incrementó por efecto de la cocaína a las 24 hpf (Fig. 40E vs. F) en 77% ( $P=0.0012$ ) (Fig. 40K) y la disminución a las 48 hpf (Fig. 40G vs. H) en 22% ( $P=0.0394$ ) (Fig. 40K).

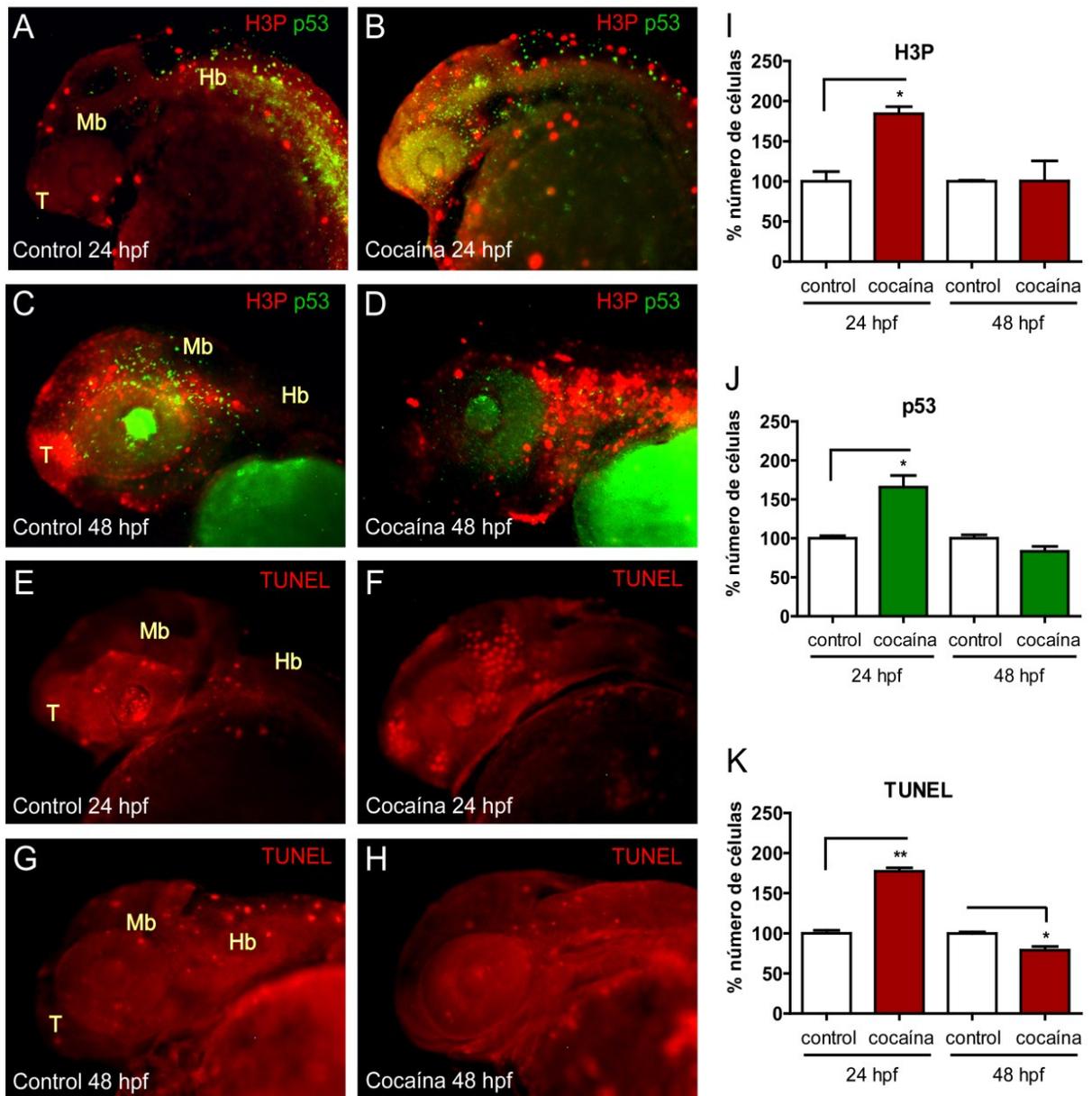


Fig. 40. Análisis de los procesos de proliferación y apoptosis en embriones de pez cebra por IHC y TUNEL. Vistas laterales de embriones no expuestos a cocaína (A, C, E y G) y expuestos a cocaína (B, D, F y H). Los embriones expuestos a cocaína mostraron un aumento de células apoptóticas (P53) a las 24 hpf (A vs. B) y la disminución a las 48 hpf (C vs. D), este hallazgo fue similar con el método de TUNEL a las 24 (E vs. F) y 48 hpf (G vs. H). El número de células proliferativas (en porcentaje) (H3P) se incrementa tanto a las 24 y 48 hpf (A vs. B y C vs. D, respectivamente). I, J y K muestran el porcentaje de los cambios de H3P, p53 y la apoptosis a las 24 y 48 hpf. Abreviaturas: H3P: Histona-3 fosforilada; p53: proteína p53; TUNEL: del inglés Terminal *Transferase dUTP Nick End Labeling*. Abreviaciones: T: telencéfalo, Mb, mesencéfalo, Hb: rombencéfalo. Barra de escala de 150  $\mu$ m. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t Student de dos colas para muestras independientes: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

## 4.2 Clonación de Tac1 y los receptores de neurocinina en el pez cebra

### 4.2.1 Clonación de Tac1 en el pez cebra

Considerando la secuencia completa de *tac1*, empleando oligonucleótidos específicos (Tabla 7) amplificamos solamente la secuencia de la SP (299 pb) (Fig. 41A) sin la presencia de NKA y NP $\gamma$  a partir de RNA de embriones de 24 hpf. Posteriormente, esta secuencia de *tac1* fue ligada y subclonada en el vector pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Invitrogen). Una vez que conseguimos expresar nuestras secuencias de interés en el vector antes mencionado realizamos digestiones de comprobación del inserto de *tac1* en el vector de expresión pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Fig. 41B), por otro lado se secuenció el DNA de *tac1* con los oligos universales de T7 y SP6. Una vez obtenida la secuencia de la *tac1*, sobre esta diseñamos oligonucleótidos que produjeran un amplicón más pequeño (de 83 pb) y que se empleó posteriormente en los experimentos de qPCR (Tabla 7) (Fig. 41C). Por otro lado, extrajimos RNA de distintos tejidos del pez cebra adulto y encontramos que *tac1* (Fig. 41D y E) está distribuido ampliamente en los diferentes tejidos estudiados: retina, músculo, intestino, agallas, cerebro, estómago, sangre, corazón, piel y aletas. Por lo descrito anteriormente, la longitud completa de cDNA que codifica la proteína Tac1 en el pez cebra ha sido clonada y secuenciada, 345 pb de DNA (Fig. 41A) (peso molecular aproximado de 27.74 kDa) (GenBank ID: JQ766527. Usando el programa BLAST (<http://www.ensembl.org/>), el gen de Tac1 se localizó en el cromosoma 19 (conjunto genómico Zv9 del pez cebra). El gen de *tac1* que fue secuenciado codifica 114 aminoácidos que contiene la SP, NKA y NP $\gamma$  (Fig. (Fig. 42A, B y C) con alta homología a otros vertebrados (Tabla 9A y B). Este gen precursor de taquicininas clonado en el pez cebra fue designado como *ytac1*, ya que mostró una alta homología con el  $\gamma$ TAC1 de humano (Fig. 42B). Este gen, *ytac1* tiene un péptido señal típico que también es encontrado en otros polipéptidos

secretores. El sitio potencial de escisión del péptido señal se encuentra en el amino ácido 19 (Gly) (Fig. 42B y C).

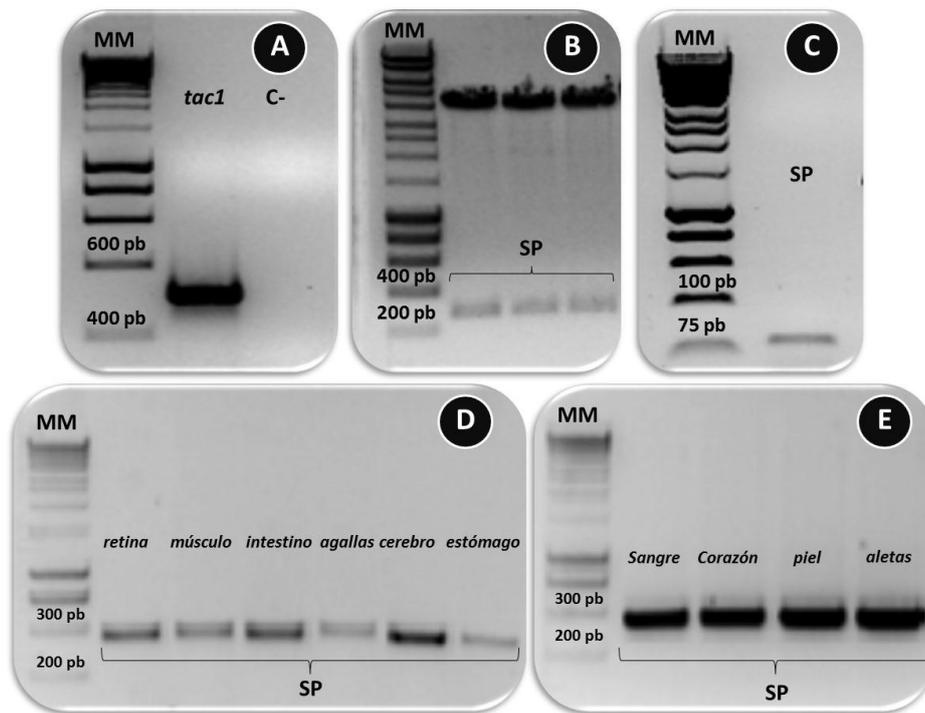


Fig. 41. Electroforesis, de los productos de PCR, en gel de agarosa al 1.5 %, correspondiente a la expresión de *tac1* (amplicón de 564 pb) (A). La digestión enzimática con BamHI muestra el inserto de la SP (amplicón de 299 pb) en la parte inferior y en la parte superior el plásmido pCR®II-TOPO, gel de garosa al 1% (B). En C se muestra la amplificación de la SP para realizar los experimentos de qPCR (amplicón 83 pb), gel de agarosa al 2%. En la figuras D y E se aprecia la expresión de la SP (299 pb) en diferentes tejidos del pez cebra adulto, gel de agarosa al 2%. Marcador de peso molecular (MM) medido en pares de bases (pb). C-: control negativo.

La característica del sitio proteolítico para el procesamiento de la SP, NKA y NPγ Gly-Lys-Arg (GKR) (Fig. 42B y C), en el extremo C-terminal indica una amidación del C-terminal. Otros sitios de escisión enzimáticas del procesamiento de las taquicinas fueron encontrados, tales como Arg-Lys-Arg (RKR) y Arg-Lys (RK) en el extremo N-terminal de NKA y SP, respectivamente, y el residuo amino ácido Lys (K) estaba incluido dentro en la secuencia de la SP (Fig. 42 C). El codón de terminación del gen *γtac1* también mostró otros sitios de escisión enzimática en los nucleótidos 343-345 que codifica tres residuos de aminoácidos básicos: Lys-Arg-Arg (KRR) (Fig. 42C).



La secuencia de amino ácidos de  $\gamma$ Tac1 de humano mostró un 46% de identidad con las secuencias de amino ácidos el pez cebra y el carpín, mientras que el Tac1y del pez cebra y el carpín, comparados entre ellos, comparte un alta homología de un 91% (Tabla 9A). La homología de  $\gamma$ Tac1 del pez cebra con las otras especies (rata, ratón, cobaya, vaca, conejo, pollo, pinzón cebra, la rana y el pez globo) fue del 46%, 45%, 45%, 43%, 43%, 41%, 47% y 66%, respectivamente (Tabla 9A). La homología de la SP del pez cebra con los otros mamíferos (humano, rata, ratón y conejo, con excepción de la cobaya), aves (pollo y pinzón cebra), anfibios (rana) y peces (pez globo y carpín) fueron del 63%, 72%, 81% y el 100%, respectivamente (Tabla 9B).

**A Homología de amino ácidos de TAC1**

Humano	Rata	Ratón	Cobaya	Vaca	Conejo	Pollo	Pinzón cebra	Rana	Pez globo	Carpín	
46	46	45	45	43	43	41	47	48	66	91	Pez cebra
	96	95	93	90	95	70	73	60	40	46	Humano
		99	94	92	93	69	73	60	40	46	Rata
			93	91	93	69	73	59	41	45	Ratón
				88	90	68	72	59	40	45	Cobaya
					89	66	70	56	39	42	Vaca
						68	89	59	37	43	Conejo
							89	51	43	41	Pollo
								55	45	46	Pinzón cebra
									41	48	Rana
										66	Pez globo

**B Homología de amino ácidos de SP**

Humano	Rata	Ratón	Cobaya	Conejo	Pollo	Pinzón cebra	Rana	Pez globo	Carpín	
63	63	63	54	63	72	72	81	100	100	Pez cebra
	100	100	90	100	90	90	63	63	63	Humano
		100	90	100	90	90	63	63	63	Rata
			90	100	90	90	63	63	63	Ratón
				90	81	81	54	54	54	Cobaya
					90	90	63	63	63	Conejo
						100	72	72	72	Pollo
							72	72	72	Pinzón cebra
								81	81	Rana
									100	Pez globo

Tabla 9. Valores de homología de amino ácidos de la Tac1 (A) y de la SP (B) del pez cebra comparado con otras especies de mamíferos, aves, anfibios y peces. Los números denotan el porcentaje (%) de homología obtenido según el ClustalW.



#### 4.2.2 Análisis filogenético de Tac1 y SP en el pez cebra

Una vez que clonamos y caracterizamos el gene de *tac1*, a fin de examinar la relación evolutiva entre los genes de las taquicininas del pez cebra y los diferentes mamíferos realizamos los análisis filogenéticos para Tac1 y SP utilizando los métodos del vecino más cercano (del inglés *Neighbour Joining*) (NJ) (Saito y Nei, 1987) y el método de Máxima Verosimilitud (del inglés *Maximum Likelihood*) (ML) método basado en la matriz de JTT (Jones-Taylor-Thornton) (Jones et al., 1992). El árbol de consenso fue inferido para representar la historia evolutiva de los taxones analizados por NJ y ML. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de  $p$ -distancia en NJ. Las secuencias de Tac2 y Tac3 del pez cebra fueron empleados para enraizar el árbol de Tac1. Los análisis filogenéticos se realizaron con las alineaciones de las secuencias clonadas de Tac1 o con las secuencias predichas. Así de esta manera, dos árboles filogenéticos de las secuencias de aminoácidos de TAC1 de las diferentes especies de vertebrados se muestran en la Figura. 38A y B. Ambos métodos, NJ y ML, mostraron un árbol filogenético similar. Encontramos una clara demarcación de la secuencia de amino ácidos de Tac1 del pez cebra y sus ortólogos (mamíferos, aves y anfibios), donde la secuencia del pez cebra se alinea en el grupo de los peces, tales como el carpín, medaka y el pez globo (Fig. 38A y B). El clado de los teleósteos se subdividió en subclados: el de los euteleosteos y teleósteos Otocephala. El primero es el grupo más ancestral y comprende el pez globo, medaka y el pez espinoso. El otro subclado de los teleósteos estuvo formado por el carpín y el pez cebra. Los otros subtipos generados por el árbol filogenético corresponden a los anfibios y las aves, junto con los mamíferos. En suma, los dos árboles filogenéticos revelaron cuatro grupos principales: teleósteos (euteleosteos y otocephala), anfibios (rana), aves (pollo y los pinzón cebra) y mamíferos (gorila, humano, perro, chimpancé, conejo, cobayas,

rata y ratone), formando grupos que están soportados por los valores de potencia de las ramas de acuerdo al método de NJ de 98%, 99%, 100% y 100% (Fig. 43A)., mientras que por valores de potencia de las ramas de 67%, 88%, 97% y 96% según el método de MP (Fig. 43B).

El análisis filogenético de la SP con los métodos de NJ y ML demostró que este neuropéptido se alinea en el grupo de los teleósteos (carpín, medaka y pez globo), con una clara delimitación de sus ortólogos de las diferentes especies de animales (mamíferos, anfibios y aves) (Fig. 44A y B). Los dos árboles filogenéticos muestran cuatro grupos principales: teleósteos (euteleosteos y Otocephala), anfibios (rana), aves (pollo) y mamíferos (humano, perro, chimpancé, conejo, cobaya y rata) que forman grupos soportados por sus valores de potencia de sus ramas de acuerdo al método de NJ (60%, 52%, 59% y 64%), mientras que de acuerdo al método de MP fue de 59%, 59%, 59% y 47%. El árbol filogenético de la SP se enraizó utilizando amino ácidos de del neuropéptido de NKA, seleccionado de una especie representativa de mamíferos, aves y peces (humano, pollo y carpín, respectivamente) (Fig. 44 A y B).

Los aminos ácidos de TAC1 y SP de los peces, mamíferos, aves y anfibios muestran que estos genes tienen un origen común, es decir tienen un origen monofilético, según el análisis de NJ y ML, respectivamente. Además, las secuencias de Tac1 y SP del pez cebra se alineó en el grupo de los peces como se esperaba, y diferentes de los clados de los otros vertebrados. Todo lo mencionado indica que tanto Tac1 y SP del pez cebra son ortólogos al de TAC1 y SP de las diferentes especies estudiadas.

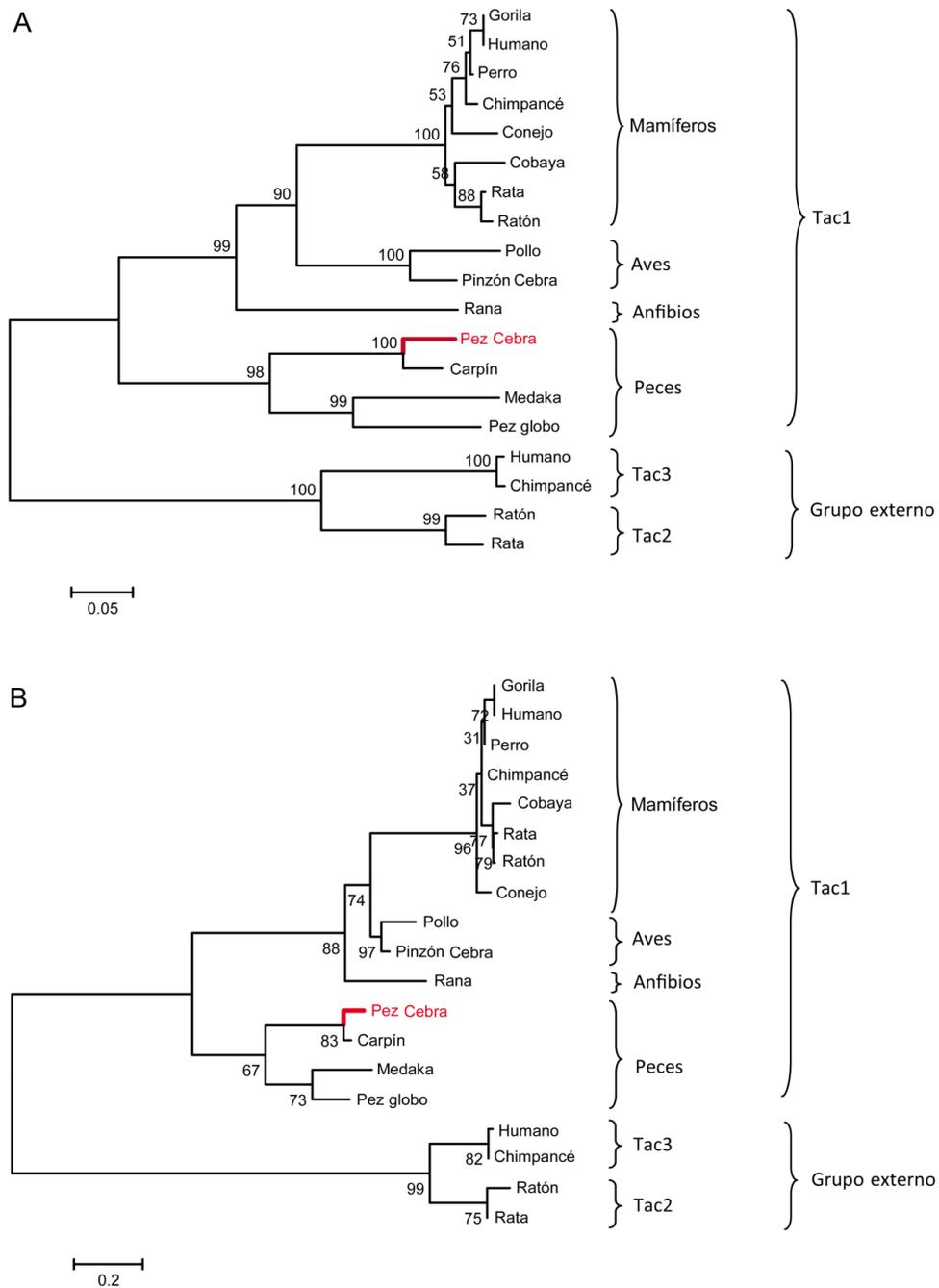


Fig. 43. Análisis filogenético de TAC1 en diferentes especies de vertebrados usando el método de NJ (A) y ML (B). La secuencia de la TAC3 de humano, chimpancé, rata y ratón se emplearon como grupo externo para enraizar el árbol filogenético. La historia evolutiva se dedujo usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). El porcentaje de árboles que se replican a partir de los taxones estudiados se muestran al lado izquierdo de las ramas, inferido a partir de 1000 repeticiones. Estos valores a la izquierda y por encima (NJ) y por debajo (ML) de las ramas) indican la robustez o la potencia de las ramas. El árbol está dibujado a escala (escala mostrada en la parte inferior), con la longitud de las ramas en las mismas unidades al de las distancias evolutivas que se utilizó para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método p-distancia (escala mostrada en la parte inferior) y están en las mismas unidades de las diferencias del número de amino ácidos por sitio (datos no mostrados). Los análisis evolutivos se llevó a cabo empleando el programa MEGA5 (Tamura et al, 2011). Las siguientes especies y sus respectivos números de acceso se emplearon para TAC1: humano (NP\_054703.1), ratón (NP\_033337.1), rana (*Xenopus tropicalis*) (NP\_001165757.1), cobaya (NP\_001166371.1), pollo (XP\_418674. 2), medaka (NP\_001139465.1), conejo (NP\_001095168.1), perro (XP\_532472.1), chimpancé (XP\_001171087.1), pinzón cebra (XP\_002197434.1), pez globo (ENSTRUP00000014475), rata (NP\_001118240.1), carpín (Lin y Peter, 1997), gorila (ENSGGOP00000013749), pez cebra (GenBank ID: JQ766527); TAC3: humano (NP\_037383.1), el chimpancé (XP\_001168338.1); TAC2: ratón (NP\_033338.2), rata (NP\_062035.1).

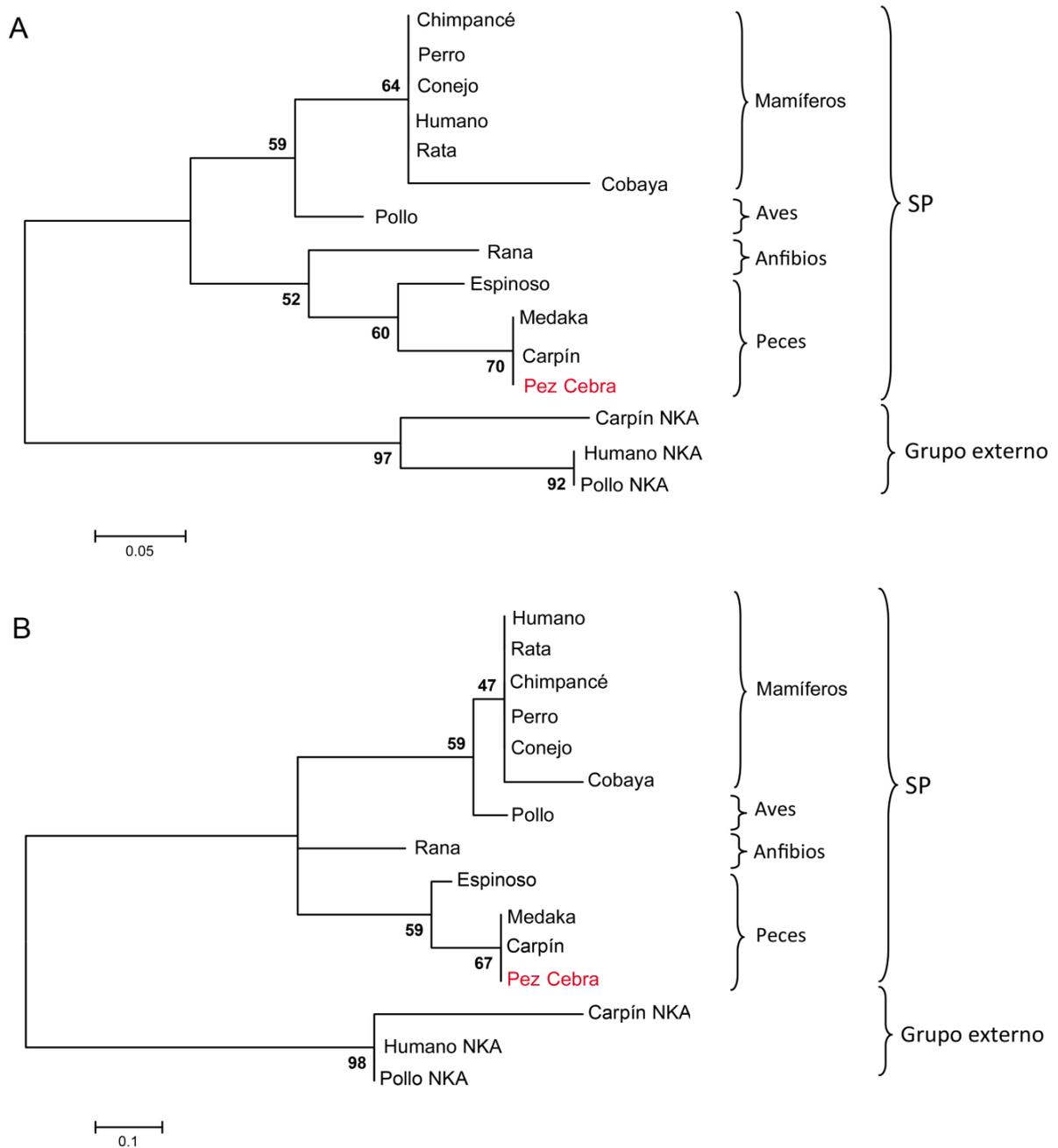


Fig. 44. Análisis filogenético de la SP en diferentes vertebrados. El árbol filogenético fue enraizado con las secuencias NKA de carpín humano y pollo. La historia evolutiva a partir del alineamiento de las secuencias de amino ácidos de la SP se dedujo usando el método de NJ (A) y el método de ML (B). El porcentaje de árboles que se replican a partir de los taxones estudiados se muestran al lado izquierdo de las ramas, inferido a partir de 1000 repeticiones. Los valores mostrados al lado izquierdo por encima y debajo de las ramas indican la robustez o la potencia de las ramas. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que los de las distancias evolutivas utilizados para inferir el árbol filogenético (escala mostrada en la parte inferior). Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método p- y están en las unidades de las diferencias del número de amino ácidos por sitio. El análisis evolutivo se llevó a cabo empleando el software MEGA5 (Tamura et al, 2011). SP: Sustancia P. Las secuencias de los amino ácidos empleados fueron parte de la preprotaquiquinina TAC1, que sólo codifican los 11 amino ácidos de la SP. Las secuencias fueron tomadas de la base de datos de PubMed y de Ensembl y son las mismas que se emplearon en la Figura 38.

### 4.2.3 Expresión de la SP del pez cebra durante la embriogénesis

Con el fin de analizar el perfil de expresión del mRNA de la SP durante el desarrollo (con oligonucleótidos específicos diseñados para la SP, Tabla 7) en el pez cebra, se seleccionaron diferentes estadios de desarrollo, tales como 8, 16, 19, 22, 24, 30, 48 y hpf, para su estudio por qPCR (Fig. 45). El estadio de las 8 hpf fue seleccionado porque en esta etapa la expresión de mRNA es casi completamente producida por el embrión con poca o ninguna contribución materna. Durante los siguientes estadios de desarrollo de 16, 19 y 22 hpf se está produciendo la segmentación y la diferenciación del SNC. Así a las 24 hpf el embrión de pez cebra ya presenta los cinco lóbulos (telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, rombencéfalo y la médula espinal) que conforman el SNC. La maduración de la organogénesis se lleva a cabo entre las 24 y 48 hpf, considerándose a las 48 hpf el final de la organogénesis primaria. Finalmente, a las 72 hpf el embrión llega al final de su desarrollo embrionario, con todos sus órganos y sistemas funcionando. Además, en este estadio de desarrollo el embrión presenta una búsqueda activa de comida y comportamientos de evitamiento a su entorno (Kimmel y cols., 1995). En el presente estudio observamos un aumento progresivo en la expresión de mRNA de la SP desde las 8 hasta las 72 hpf (Fig. 45). El mínimo pico de expresión lo encontramos a las 8 hpf (5301 copias de cDNA) y el máximo a las 72 hpf (193786 copias de cDNA). Este aumento gradual en la expresión de la SP sólo se vio interrumpido a las 24 hpf (48438 copias), cuando se observó una disminución en comparación a las 22 hpf (63226 copias) (Fig. 45). El incremento gradual de la expresión visto en estadios muy tempranos, también se observa desde las 30 hpf (97665 copias), 48 hpf (131048 copias) hasta las 72 hpf (Fig. 45).

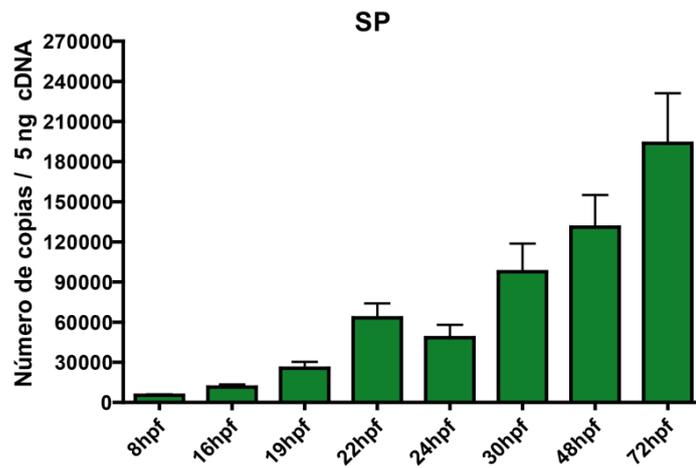


Fig. 45. Representación gráfica de la cuantificación absoluta de la SP en el pez cebra durante los diferentes estadios de desarrollo. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios. Los niveles de expresión génica se midieron como intensidad de fluorescencia utilizando la qPCR y se normalizaron con respecto a la expresión *ef1 $\alpha$* . Cada barra representa el número de copias de cDNA de SP  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos realizándose cada uno por triplicado.

#### 4.2.4 Efectos de la cocaína sobre la expresión de la SP

Los embriones expuestos a 1,5  $\mu$ M de clorhidrato de cocaína mostraron un aumento en la expresión de SP (de 67440 a 113700 copias) ( $P < 0,05$ ) cuando estudiamos por qPCR a las 24 hpf (Fig. 41), mientras que a las 48 hpf la expresión de SP se redujo (de 139500 a 95820 copias) ( $P < 0,05$ ) (Fig. 46).

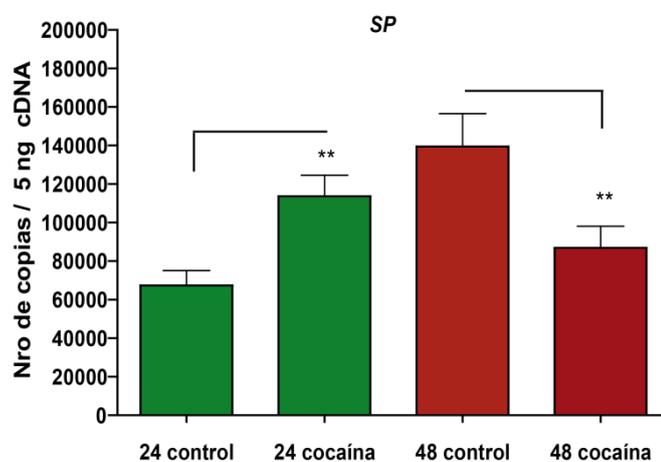


Fig. 46. Efectos de la cocaína sobre la expresión de la SP a las 24 y 48 hpf. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios. Los niveles de expresión génica se midieron como intensidad de fluorescencia utilizando la qPCR y se normalizaron con respecto a la expresión del gen de referencia *ef1 $\alpha$* . Cada barra representa el número de copias de cDNA de SP  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos realizándose cada uno por triplicado. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student, de dos colas, para muestras independientes: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

#### 4.2.5 Distribución espacial de la SP

Para estudiar la distribución espacial de la SP por ISH, primero realizamos las ribosondas. Por este motivo diseñamos oligonucleótidos específicos para amplificar sólo la secuencia de la SP (299 pb) por PCR (basados en la secuencia de *tac1*), luego esta secuencia se ligó y se sub-clonó empleando el vector pCR<sup>®</sup>II (Invitrogen). Prosiguiendo, las células TOP 10<sup>®</sup>F (Invitrogen) se transformaron con la construcción de la SP y mediante una miniprep (Zymo) y Midiprep (Sigma) obtuvimos concentraciones adecuadas de la SP, insertada en el plásmido pCR<sup>®</sup>II (Invitrogen). Además, tras la digestión con BamH comprobamos que la SP estaba insertada en el plásmido antes mencionado (Fig. 47). Posteriormente, la construcción de la SP se digirió con XhoI y HindIII durante 1 hora a 37 ° C y se envió para la secuenciación usando los oligos universales de T7 y SP6.

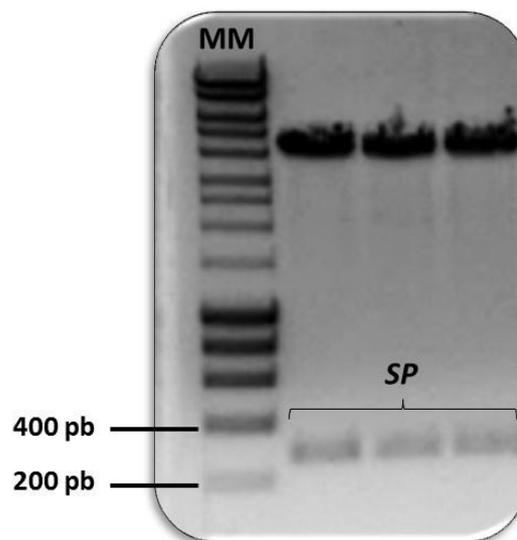


Fig. 47. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión de la SP insertado en el vector plasmídico pCR<sup>®</sup> II- TOPO<sup>®</sup>. LA construcción de la SP fue digerida con BamHI. El amplicón esperado de la SP fue de 299pb. MM: marcador de peso molecular, medido en pares de bases.

Finalmente, para realizar la transcripción de la ribosonda de la SP se digirió con HindIII durante 1 hora a 37 ° C y se transcribió con T7. Luego añadimos a la sonda el marcaje con digoxigenina y después el producto de RNA se trató con

DNasa I (Roche) y finalmente purificado. Para los experimentos ISH, empleamos la concentración de 500ng/ml de la ribosonda que se diluyó en solución de prehibridación. Una vez obtenida la ribosonda estudiamos la expresión de la SP en embriones de pez cebra en los estadios de las 24 y 48 hpf mediante la técnica de la ISH.

#### **4.2.6. Expresión de la SP en embriones de peces cebra**

El mRNA de la SP se detectó a las 24 hpf en diferentes áreas del SNC: telencéfalo, diencéfalo, hipotálamo, epífisis, mesencéfalo, pretectum, rombómeros, vesícula ótica, médula espinal y somitas (Fig. 48A, C y E). A las 48 hpf, la distribución de SP fue similar a la detectada a las 24 hpf, pero además se expresó en el fascículo longitudinal medial (MLF, del inglés *medial longitudinal fascicle*) y notocorda (Fig. 48A, C y E).

#### **4.2.7 Efectos de la cocaína sobre la expresión espacial de la SP**

Estudios realizados mediante ISH en embriones expuestos a la cocaína, mostraron un aumento de su expresión en el SNC (diencéfalo, pretectum y los rombencéfalo y vesícula ótica) a las 24 hpf (Fig. 48B, D y F) con respecto al grupo control (Fig. 48A, C y E). A las 48 hpf, los embriones expuestos a la cocaína, mostraron cambios en la expresión de la SP en la médula espinal (49B vs. A), telencéfalo (49D vs. C) y diencéfalo (49F vs. E) en comparación con el grupo control según las vistas laterales y dorsal. Estos resultados están en la misma tendencia de expresión encontrados mediante la técnica de la qPCR (Fig. 47)

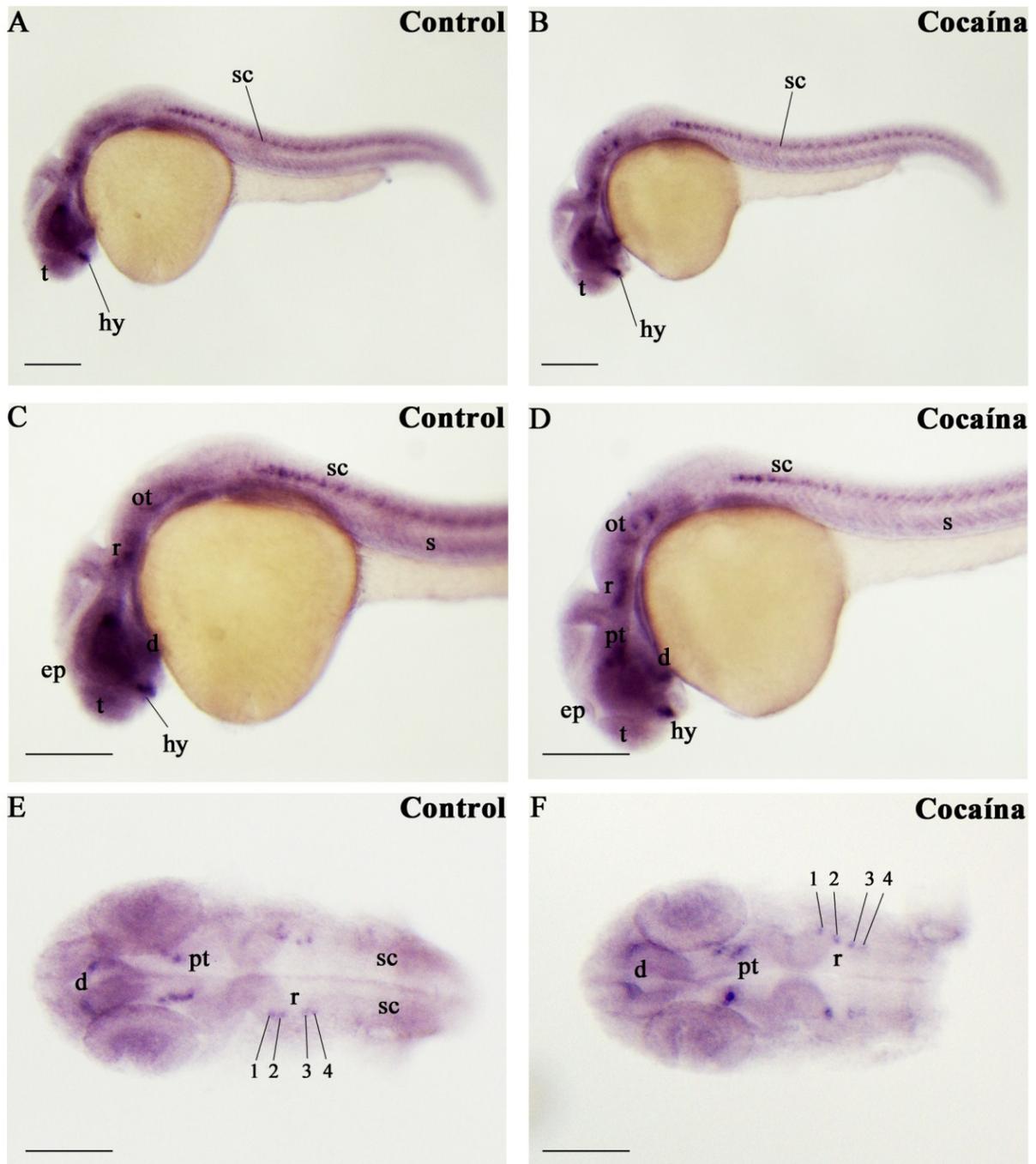


Fig. 48. Vista lateral y dorsal de la distribución de los mRNA de la SP en embriones enteros (*in toto*) de pez cebra mediante la técnica de la hibridación *in situ* a las 24 hpf. La expresión de mRNA de la SP se encontró en diferentes áreas del SNC: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, límite del mesencéfalo y rombencéfalo (MHB), rombencéfalo, médula espinal y los somitas. Los embriones expuestos a la cocaína mostraron un aumento de su expresión en el diencéfalo, preteectum y los rombencéfalo y vesícula ótica (D y F) con respecto al grupo control (C y E). Abreviaturas: t: telencéfalo, d: diencéfalo, hy, hipotálamo, pt: preteectum, r: rombómeros. ov: vesícula ótica; ep: epifisis, sc: médula espinal; s: somitas. Barra de escala: 250  $\mu$ m. Magnificación 6.3x en A, B, E y F; 12X en C y D.

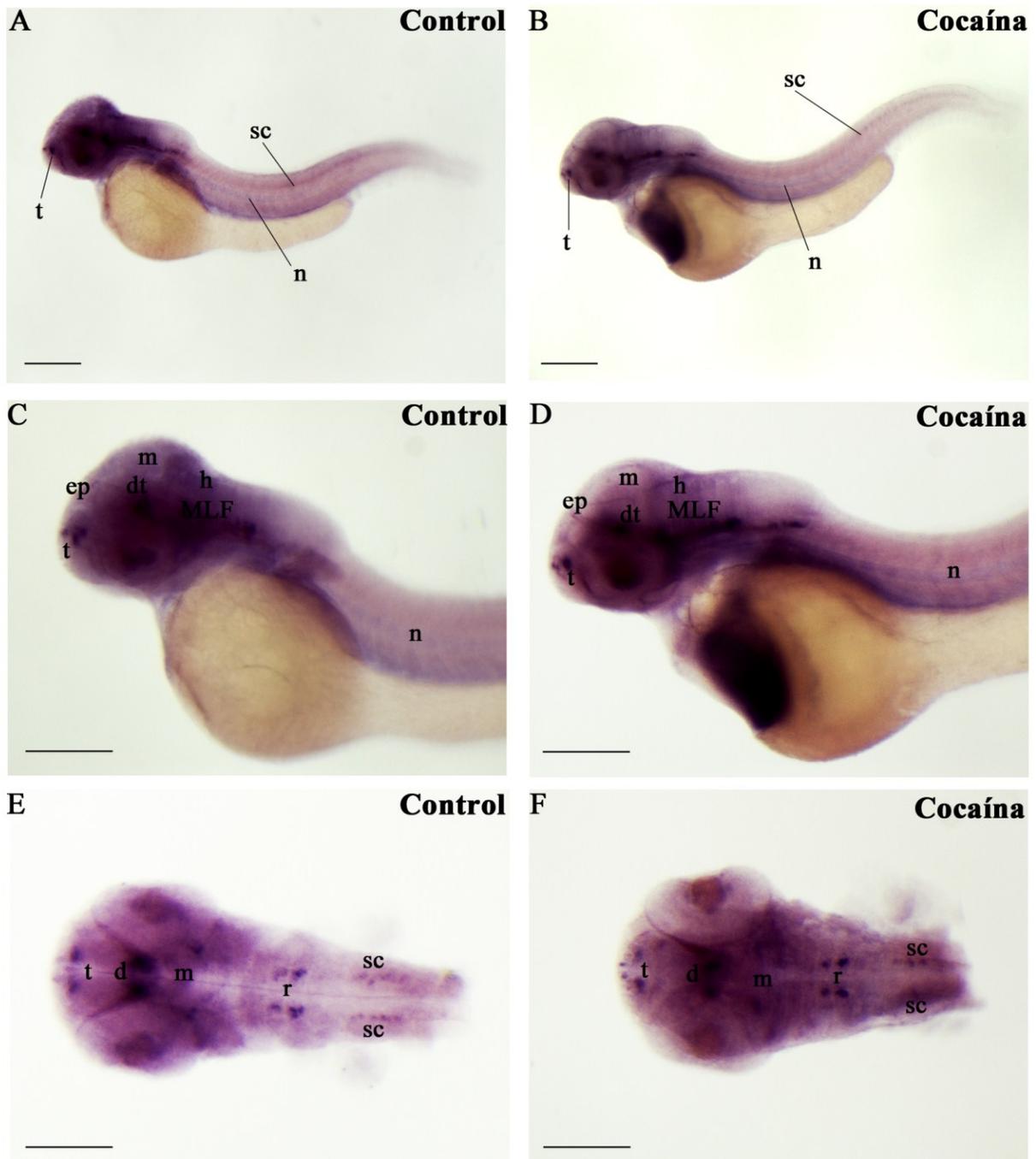


Fig. 49. Vista lateral y dorsal de la distribución espacial del mRNA de la SP en embriones enteros (*in toto*) de pez cebra mediante la técnica de la hibridación *in situ* a las 48 hpf. La expresión de mRNA de la SP se encontró en diferentes áreas del SNC: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, fascículo longitudinal medial (MLF), rombencéfalo, médula espinal y los somitas. Los embriones expuestos a la cocaína mostraron cambios evidentes en el patrón de expresión con respecto a los embriones del grupo control, disminución de expresión en la médula espinal (B vs. A), telencéfalo (D vs. C) y diencéfalo (F vs. E). Abreviaturas: t: telencéfalo, d: diencéfalo, h: hipotálamo, pt: pretectum, m: mesencéfalo, FLM: fascículo longitudinal medial, r: rombómeros. ov: vesícula ótica; ep: epífisis, sc: médula espinal; n: notocorda, s: somitas. Barra de escala: 250  $\mu$ m. Magnificación 6.3x en A, B, E y F; 12X en C y D.

#### 4.2.8 Efectos de la cocaína en la expresión del miR-206 y sus precursores (miR-206-1 y miR-206-2)

El precursor miR-206-1 (número de acceso: MI0002045) incrementó su expresión por acción de la cocaína a las 24 hpf (de 88066 a 229567 copias) ( $P < 0.05$ ), mientras que a las 48 hpf no mostró cambios consistentes (Fig. 50A). La expresión del otro precursor, mir-206-2 (número de acceso: MI0002046), no fue influenciada significativamente por la exposición de la cocaína tanto a las 24 hpf como a las 48 hpf (Fig. 50B). Cuando estudiamos la expresión del miR-206, la forma madura de los precursores mencionados, este miRNA no mostró cambios consistentes a las 24 hpf, sin embargo, a las 48 hpf la cocaína produjo una disminución de la expresión del miR-206 con respecto al grupo control que fue estadísticamente significativo (Fig. 50C). Algo notable, fue que el mir-206-1 mostró un mayor nivel de expresión en comparación con el miR-206-2 y el miR-206 (Fig. 50C).

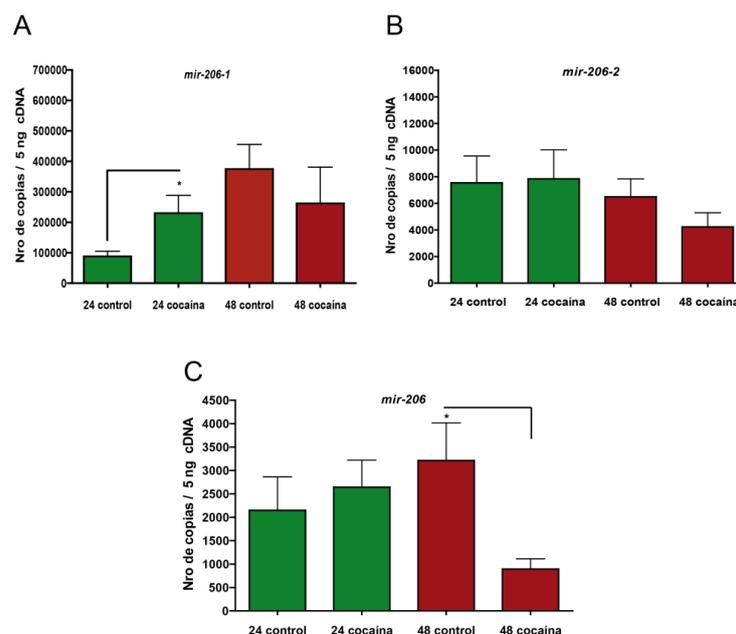


Fig. 50. Efectos de la cocaína sobre la expresión de miR-206-1 (A), miR-206-2 (B) y miR-206 (C) en los estadios de las 24 y 48 hpf. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios. Los niveles de expresión génica se midieron como intensidad de fluorescencia utilizando la qPCR y se normalizaron con respecto a la expresión del gen de referencia *ef1 $\alpha$* . Cada barra representa el número de copias de cDNA  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos realizándose cada uno por triplicado. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student, de dos colas, para muestras independientes: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

#### 4.2.9 Silenciamiento de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2) y su efecto en la expresión de la SP

Basados en la hipótesis de que la actividad de los receptores opioides altera la expresión de la SP y el hecho de que diferentes grupos han demostrado que los receptores de opioides y de las taquicininas están estrechamente relacionados en algunas áreas del cerebro donde incluso co-localizan (Aicher y cols., 2000; Wan y cols., 2006; Yu y cols., 2009) decidimos microinyectar los MOs de los receptores opioides ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfDOR1-ZfDOR2 (ZfDOR1/2) en el vitelo de los embriones en el estadio de uno a cuatro células, cuando los embriones alcanzaron las 48 hpf de desarrollo (cuando la organogénesis primaria de la mayoría de los órganos se han formado) se analizó la expresión de SP por qPCR. Nuestros resultados mostraron que el silenciamiento de ZfMOR indujo un aumento de casi 4 veces la expresión de la SP (de 20920 a 81081 copias) ( $P < 0.05$ ), mientras que el silenciamiento de los receptores delta del pez cebra (ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfDOR1 ZfDOR2) no produjeron cambios consistentes en la expresión de la SP (Fig. 51).

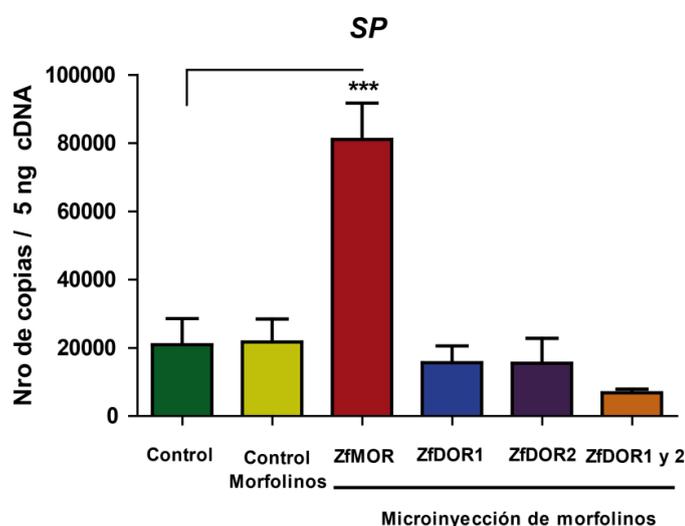


Fig. 51. Efectos de la microinyección de los MOs de los receptores opioides sobre los niveles de expresión de la SP. Dosecientos embriones fueron utilizados para la extracción de RNA. Cada barra representa el número de copias de cDNA  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno fue realizado por triplicado. El análisis estadístico fue realizado empleando el análisis de varianza (ANOVA de una vía) con el *post hoc* de Dunnett: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 4.2.10 Clonación de Nk1a y Nk1b en el pez cebra

Con el objeto de clonar las secuencias de los receptores de neurocininas diseñamos oligonucleótidos que amplificasen toda la región codificante (*ORF*, *Open Reading Frame*, marco abierto de lectura) (Tabla 7). Una vez amplificados los amplicones de *nk1a* y *nk1b* por PCR, de RNA de embriones de 48 hpf, estos fueron visualizados en la campana de luz ultravioleta, después de la electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Fig. 52). Posteriormente, estas secuencias fueron ligadas y subclonadas en el vector pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Invitrogen). Una vez que conseguimos expresar nuestras secuencias de interés en el vector antes mencionado realizamos digestiones de comprobación del inserto de Nk1a y Nk1b en el vector de expresión pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Fig. 52E), por otro lado enviamos a secuenciar las secuencias de DNA de nuestros productos de Nk1a y Nk1b con los oligos universales de T7 y SP6, al servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca. Por otro lado, extrajimos RNA de diferentes tejidos del pez cebra adulto con el objeto de determinar su expresión por PCR y de acuerdo nuestras observaciones tanto Nk1a y Nk1b presentaron expresión en los distintos tejidos. En el caso de Nk1a se expresó en mayor proporción en el SNC (cerebro) que en los tejidos periféricos como músculo, agallas, intestino, estómago y piel (en estos dos últimos tejidos se puede intuir una banda muy tenue) (Fig. 52F). En el caso del receptor duplicado Nk1b es evidente que tiene una expresión diferente a la de Nk1a. El receptor Nk1b se expresa en similar intensidad en el SNC (cerebro) y en la periferia (músculo y agallas), de manera leve en la piel y asimismo, se puede intuir una muy tenue expresión en intestino y estómago (Fig. 52G). Estos resultados muestran que Nk1a y Nk1b presentan patrones diferentes de expresión a lo largo de los diferentes tejidos del pez cebra estudiados.

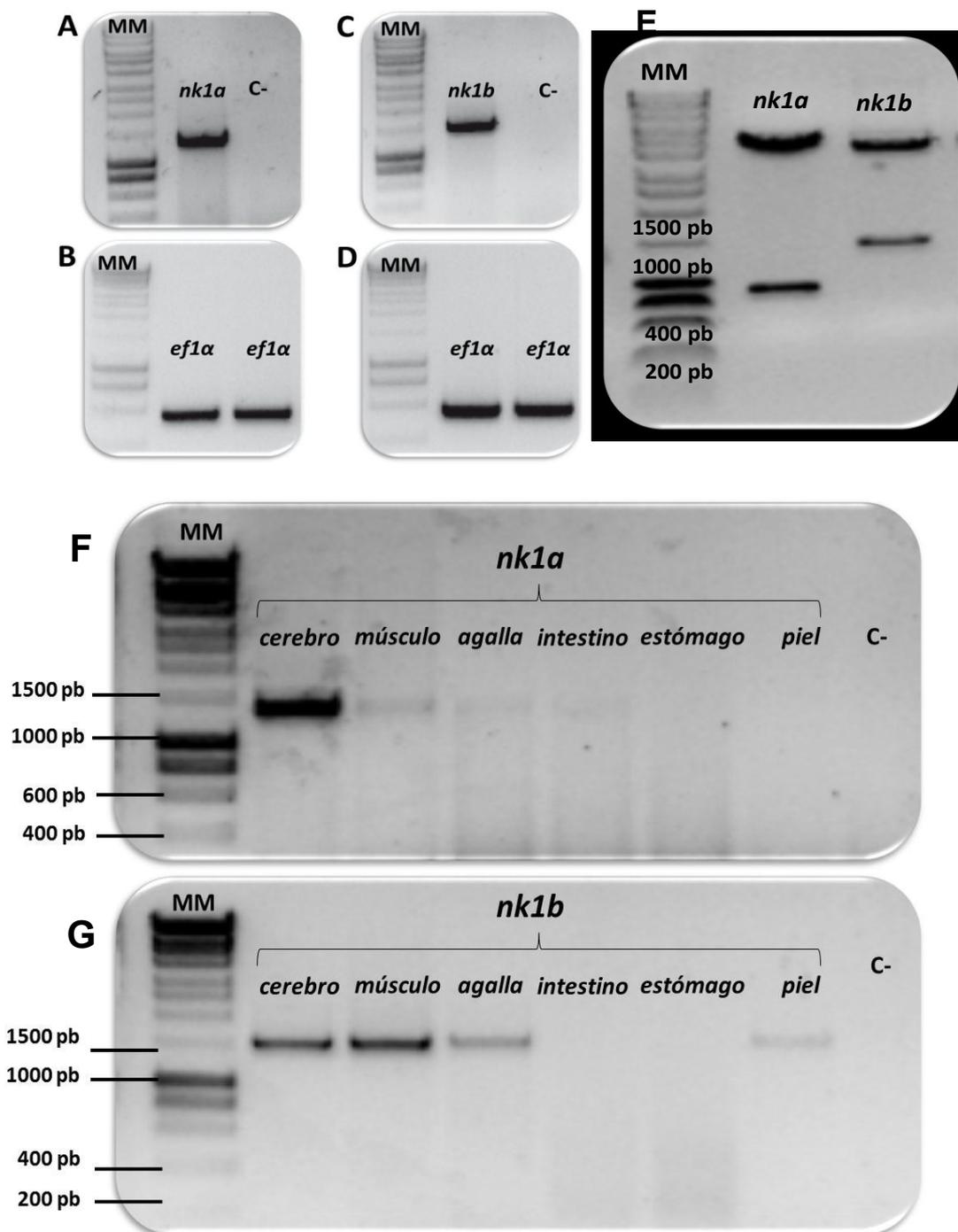


Fig. 52. Electroforesis, de los productos de PCR, en gel de agarosa al 2% (A, C, E, F y G) y 2% (B y D), correspondiente a la expresión de *nk1a* (A), *ef1α* (B), *nk1b* (C) y *ef1α* (D). La expresión de *ef1α* (136 pb) realizó como control positivo a la amplificación de los receptores de *nk1a* y *nk1b*. Los amplicones de las secuencias amplificadas se sitúan a la altura del tamaño esperado para *nk1a* (1364 pb), *nk1b* (1506 pb). (E) Digestión de las construcciones de los receptores *nk1a* y *nk1b* insertados en el vector de expresión pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Invitrogen), el receptor *Nk1a* insertado en el vector pCR<sup>®</sup>II fue digerido con *Xba*I y mientras que el receptor *Nk1b* insertado también en pCR<sup>®</sup>II fue digerido con *Xho*I. F y G muestra la expresión de *Nk1a* (1324 pb) y *Nk1b* (1506 pb), respectivamente, en diferentes tejidos del pez cebra adulto. Marcador de peso molecular (MM) medido en pares de bases (pb). C-: control negativo.

A modo de resumen, después del aislamiento de RNA de embriones de 48 hpf de desarrollo embrionario, la amplificación por PCR, clonación y secuenciamiento obtuvimos las secuencias completas de cDNA de dos genes de los receptores de neurocinina, del pez cebra los cuales designamos como *nk1a* (1281bp) (GenBank ID: 33455) y *nk1b* (1239 bp) (GenBank ID: 345672) (Fig. 52). El *ORF* de los genes de *nk1a* (1281bp) y *nk1b* (1239 bp) (Fig. 53A y B) codificó proteínas de 426 (48.96 kDa) y 412 amino ácidos (40.53 kDa), respectivamente. Los oligonucleótidos de los receptores de neurocinina fueron diseñados en las regiones de 5`UTR y 3`UTR (basados en las bases de datos de PubMed y Ensembl) (Fig. 53A y B). Al igual que en el caso de *Tac1*, usando el programa BLAST encontramos que los receptores de *Nk1a* y *Nk1b* del pez cebra fueron localizados en los cromosomas 5 y 11, respectivamente (conjunto genómico *Zv9* del pez cebra). Además, según la base de datos *Ensembl*, los genes de los receptores de *Nk1a* y *Nk1b* del pez cebra están conformados por cinco exones cada uno.



La comparación de los aminoácidos de los receptores de Nk1a y Nk1b con otras proteínas de receptores de NK1 de diferentes especies reveló que los receptores de neuroquinina de pez cebra comparte características comunes con respecto a otros miembros de la superfamilia de GPCR (Fig. 54), los cuales también pertenecen a la familia de la rodopsina. Los receptores de Nk1a y Nk1b exhibieron los característicos 7 dominios transmembrana (TM), dos sitios de consenso de N-glicosilación para Nk1a (Asn<sup>13</sup> y Asn<sup>17</sup>), y un posible sitio para Nk1b (Asn<sup>14</sup>) en el dominio extracelular N-terminal (N-terminal), junto con dos residuos de Cys conservados para Nk1a (Cys<sup>111</sup> y Cys<sup>186</sup>) y para Nk1b (Cys<sup>112</sup> y Cys<sup>187</sup>), que puede formar un enlace disulfuro entre los lazos extracelulares (ELs) primero y segundo. Los receptores de neuroquinina también mostraron sitios putativos de fosforilación de residuos de serina o treonina, dos sitios para Nk1a (Thr<sup>15</sup> y Thr<sup>19</sup>) y un sitio para Nk1b (Ser<sup>19</sup>) en el extremo N-terminal; dos sitios para Nk1a (Thr<sup>71</sup> y Thr<sup>73</sup>) y Nk1b (Thr<sup>72</sup> y Thr<sup>74</sup>) en el primer lazo intracelular (IL1); tres sitios para Nk1a (Ser<sup>149</sup>, Ser<sup>151</sup> y Thr<sup>153</sup>) y Nk1b (Ser<sup>150</sup> y Ser<sup>154</sup>) en el IL2, cinco sitios para Nk1a (Thr<sup>228</sup>, Ser<sup>232</sup>, Ser<sup>238</sup>, Ser<sup>239</sup> y Thr<sup>247</sup>) y tres para Nk1b (Ser<sup>233</sup>, Ser<sup>239</sup> y Ser<sup>240</sup>) en el IL3, veinte sitios para Nk1a (Ser<sup>343</sup>, Thr<sup>344</sup>, Thr<sup>349</sup>, Ser<sup>252</sup>, Ser<sup>257</sup>, Thr<sup>362</sup>, Ser<sup>363</sup>, Ser<sup>365</sup>, Ser<sup>395</sup>, Thr<sup>399</sup>, Ser<sup>400</sup>, Ser<sup>403</sup>, Ser<sup>404</sup>, Ser<sup>407</sup>, Ser<sup>409</sup>, Thr<sup>411</sup>, Ser<sup>413</sup>, Thr<sup>415</sup>, Ser<sup>417</sup> y Ser<sup>420</sup>) y para Nk1b (Ser<sup>344</sup>, Thr<sup>345</sup>, Thr<sup>350</sup>, Ser<sup>353</sup>, Ser<sup>358</sup>, Thr<sup>363</sup>, Thr<sup>364</sup>, Ser<sup>366</sup>, Thr<sup>367</sup>, Ser<sup>383</sup>, Thr<sup>387</sup>, Ser<sup>388</sup>, Ser<sup>391</sup>, Ser<sup>392</sup>, Ser<sup>394</sup>, Ser<sup>396</sup>, Thr<sup>398</sup>, Ser<sup>400</sup>, Ser<sup>404</sup> y Ser<sup>407</sup>) en el dominio carboxilo terminal (C-terminal), y un sitio potencial de palmitoilación sobre los residuos de Cys en Nk1a (Cys<sup>329</sup>) y Nk1b (Cys<sup>330</sup>) en el dominio C-terminal. Por otro lado, los receptores de Nk1a y Nk1b presentaron el típico motivo, característico de las GPCRs, DRY en el borde entre el dominio TM3 y el IL2, además presentaron otro resto característico de los GPCRs, conocido como K/RK/RXXK/R en el IL3 (Fig. 54).



La nomenclatura de los genes y proteínas se basan a lo establecido en la base de datos de ZFIN para el pez cebra, RGD y MGI para la rata y ratón, respectivamente, y al comité de nomenclatura de genes HUGO para humano (<http://www.genenames.org/>) (Tabla 11).

Especies	Gen	Proteína	Base de datos
Humano	<i>NK1</i>	NK1	HGNC <sup>1</sup>
Rata	<i>Nk1</i>	NK1	RGD <sup>2</sup>
Ratón	<i>Nk1</i>	NK1	MGI <sup>3</sup>
Pez cebra	<i>nk1a/1b</i>	Nk1a/1b	ZFIN <sup>4</sup>

1. <http://www.genenames.org/guidelines.html>  
2. <http://rgd.mcw.edu/nomen/nomen.shtml>  
3. <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/>  
4. <https://wiki.zfin.org/display/general/ZFIN+Zebrafish+Nomenclature+Guidelines>

Tabla 11. Los genes del ser humano se denotan en mayúscula y cursiva, mientras que la proteína se denota en mayúscula y en redonda. En el caso de Rata-Ratón, los genes se denotan en cursiva y con la primera letra en mayúscula y el resto en minúscula, mientras la proteína se denota en mayúscula y en redonda. Finalmente en el caso de los genes del pez cebra se expresan en minúscula y cursiva, mientras que la proteína se denota la primera letra en mayúscula seguido de minúsculas y en redonda

La homología de los receptores Nk1a Nk1b del pez cebra con respecto a otros mamíferos como el humano, rata y ratón fue del 66% y cuando se comparó entre ellos (Nk1a vs. Nk1b) fue del 75% (Tabla 12A). El dominio N-terminal de los receptores Nk1a y Nk1b del pez cebra mostró una menor homología al ser comparada, con su homólogo, en el humano (38 y 25%, respectivamente), mientras que se observó una alta homología en las regiones TM (entre 66 a 90%, para Nk1a y Nk1b, respectivamente) llegando a ser incluso del 100% al ser cotejado con el IL1 (tanto para Nk1a y Nk1b) (Tabla 12B).

A

## Porcentaje de homología del receptor NK1 en diferentes especies

Rata	Ratón	Cobaya	Perro	Pollo	Rana	Pez globo	Nk1a	Nk1b	
94	94	96	97	78	70	61	66	66	Humano
	99	94	94	77	70	61	66	66	Rata
		94	94	77	70	61	66	66	Ratón
			96	78	70	61	67	66	Cobaya
				79	71	62	67	67	Perro
					71	60	66	66	Pollo
						55	63	65	Rana
							65	70	Pez globo
								75	Nk1a

B

## Porcentaje de identidad aminoacídica de NK1 (de las distintas regiones que lo forman) en diferentes especies

	h/r	h/m	h/NK1a	h/NK1b	r/m	r/NK1a	r/NK1b	m/NK1a	m/NK1b	NK1a/1b
<b>Regiones extracelulares</b>										
N-terminal	87	87	38	25	93	38	25	38	25	43
Primer lazo	94	94	70	76	100	64	70	64	70	62
Segundo lazo	88	88	38	42	100	38	42	38	42	65
Tercer lazo	100	100	50	44	100	50	44	50	44	77
<b>Regiones transmembrana</b>										
TM 1	95	95	70	66	100	75	70	75	70	87
TM 2	95	95	90	90	100	85	85	85	85	100
TM 3	95	95	90	90	100	86	86	86	86	100
TM 4	95	95	85	71	100	85	66	85	66	71
TM 5	100	100	72	72	100	72	72	72	72	90
TM 6	95	100	76	71	95	80	76	76	71	85
TM 7	95	95	95	90	100	90	85	90	85	90
<b>Regiones intracelulares</b>										
Primer lazo	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Segundo Lazo	100	100	85	80	100	85	80	85	80	80
Tercer lazo	100	100	87	84	100	87	84	87	84	87
C-terminal	91	90	51	57	98	53	60	54	60	62

h: humano

r: rata

m:ratón

Nk1a: receptor de Nk1a del pez cebra

Nk1b: receptor de Nk1b del pez cebra

Tabla 12. Valores de homología del receptor de NK1 de diferentes especies (A). Homología de las diferentes regiones que forman el receptor NK1: extremo amino y carboxilo terminal (N-terminal y C-terminal, respectivamente), lazos intra y extracelulares (IL y EL, respectivamente) y dominios transmembrana (TM). La comparación se ha llevado a cabo mediante la comparación de tipo ClustalW.

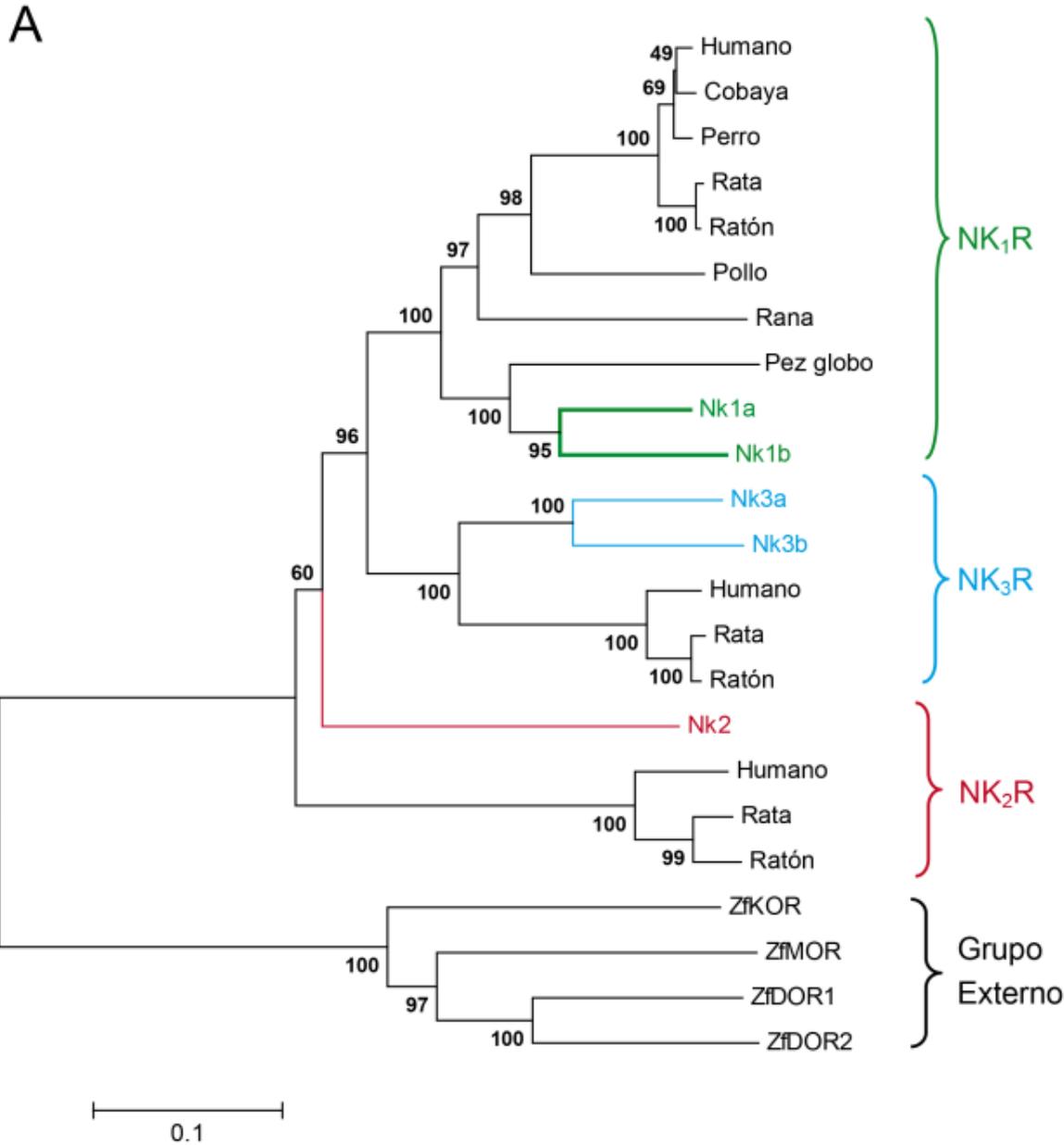
#### 4.2.11 Análisis filogenético de los receptores Nk1a Nk1b del pez cebra

Para examinar las relaciones evolutivas de los receptores de neurocinina de los mamíferos y del pez cebra realizamos dos análisis filogenéticos, empleando los métodos de NJ (Saito y Nei, 1987) y ML (Jones y cols., 1992). Los receptores opioides del pez cebra (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfKOR) fueron utilizados para enraizar los árboles filogenéticos, ya que tanto los receptores opioides y de neurocinina pertenecen a la superfamilia de GPCR (Herrero-Turrión y Rodríguez, 2008) (Fig. 55A y B). Además, los receptores de neurocininas y los opioides están implicados en el dolor y los procesos de analgesia, respectivamente.

De acuerdo al análisis filogenético se observó una clara demarcación entre los receptores de neurocinina Nk2R, Nk3R, Nk1a y Nk1b del pez cebra y sus ortólogos, esto esta basado en los valores de potencia de las ramas de 60, 100 y 100% según el método de NJ (Fig.55A) y de 75, 96 y 60% según el método de ML (Fig. 55B). Las secuencias predichas de los aminos ácidos que componen los receptores Nk2R y Nk3R del pez cebra se utilizó para comprobar si los receptores Nk1a o Nk1b podrían estar alineados en el grupo de los receptores de Nk2R o Nk3R y por lo tanto no serían genes duplicados. Los análisis filogenéticos, llevados acabo, demostraron que los receptores Nk1a y Nk1b estaban alineados en el mismo grupo de los receptores de NK1, lo que indica que los receptores de Nk1a y Nk1b son los genes duplicados y parálogos de los receptores NK2 y NK3 del pez cebra y a la vez ortólogos de los receptores de taquicininas NK1, NK2 y NK3 de las diferentes especies estudiadas.

Los árboles filogenéticos generados por NJ y ML (Fig. 55A y B, respectivamente), revelaron que los receptores de neurocininas tuvieron un origen monofilético, ya que los tres receptores de NK habrían derivado de un gen común. Además, de acuerdo al análisis filogenético por NJ y ML los receptores de

neurocinina se originaron evolutivamente antes del desarrollo de los receptores opioides en los vertebrados.



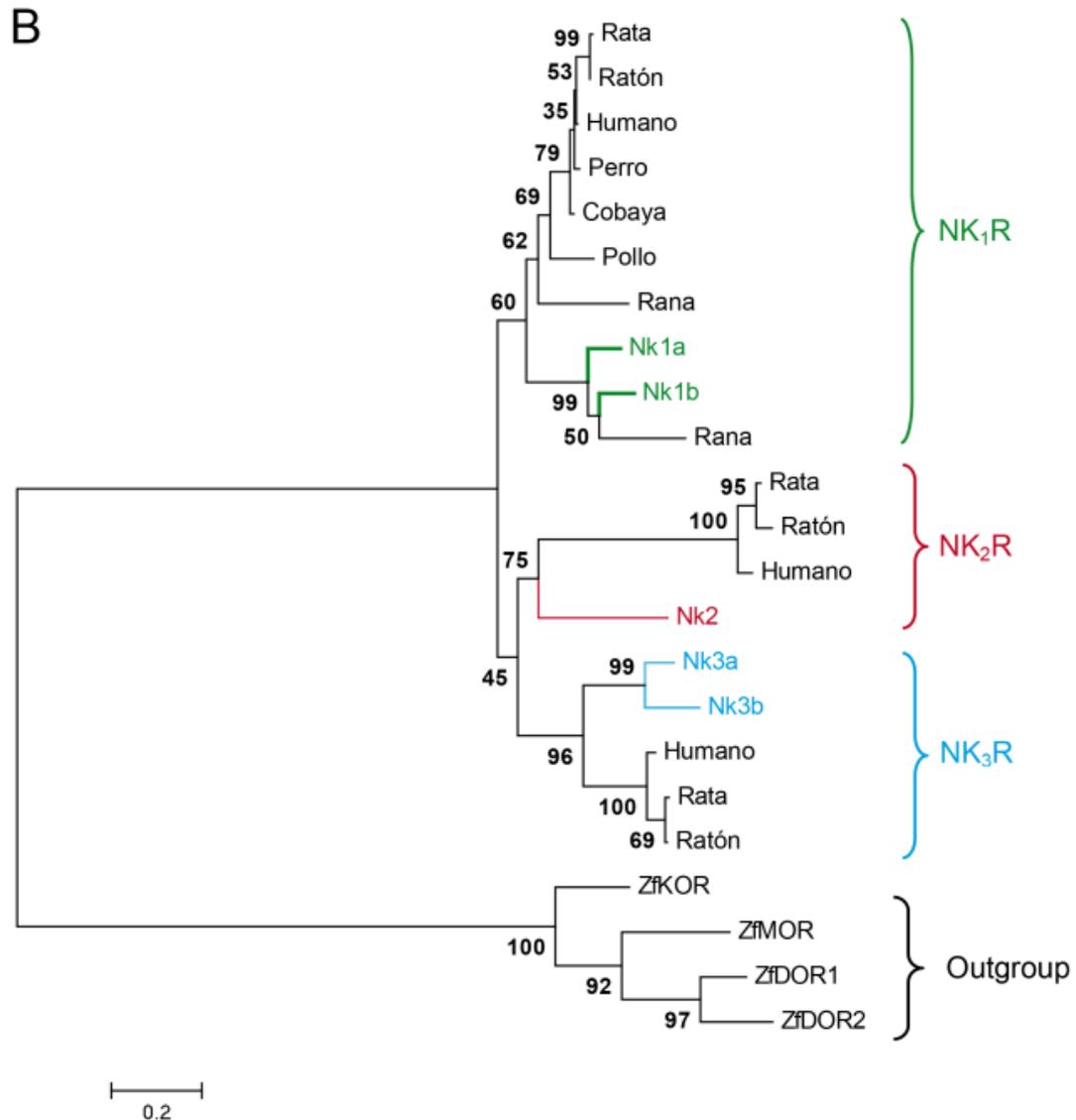


Fig. 55. Análisis filogenético de los receptores de neuroquinina vertebrados usando el método de NJ (A) y ML (B). Los receptores opioides del pez cebra ZfMOR (NP\_571782.1), ZfDOR1 (NP\_571333.1), ZfDOR2 (NP\_997920.1) y ZfKOR (NP\_878306.1) se emplearon como grupo externo para enraizar los árboles filogenéticos. La historia evolutiva se dedujo usando el método de Neighbor-Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987). El porcentaje de árboles que se replican a partir de los taxones estudiados se muestran al lado izquierdo de las ramas, inferido a partir de 1000 repeticiones. Estos valores a la izquierda y por encima (NJ) y por debajo (ML) de las ramas indican la robustez o la potencia de las ramas. El árbol está dibujado a escala (escala mostrada en la parte inferior), con la longitud de las ramas en las mismas unidades al de las distancias evolutivas que se utilizó para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método p-distancia (escala mostrada en la parte inferior) y están en las mismas unidades de las diferencias del número de amino ácidos por sitio (datos no mostrados). Los análisis evolutivos se llevó a cabo empleando el programa MEGA5 (Tamura et al, 2011). Las siguientes especies y sus respectivos números de acceso se emplearon para el receptor NK1: humano (NP\_001049.1), perro (NP\_001012637.1), cobaya (NP\_001166332.1), rata (NP\_036799.1), ratón (NP\_033339.2), pollo (NP\_990199.1), rana (NP\_001106489.1) (*Xenopus tropicalis*), pez globo (AAQ02694), Nk1a del pez cebra (Gen Bank ID: 33455) y Nk1b del pez cebra (Gen Bank ID: 345672). Para el receptor NK2: humano (NP\_001048.2), rata (NP\_542946.1), ratón (NP\_033340.2) receptor Nk2 del pez cebra (XP\_001341981.1) (secuencia predicha). En el caso del receptor NK3: humano (NP\_001050.1), rata (NP\_058749.1), ratón (NP\_067357.1), Nk3a del pez cebra (XP\_687610.1) (secuencia predicha) y Nk3b del pez cebra (XP\_683098) (secuencia predicha)

#### 4.2.12 Expresión temporal y espacial de *nk1a* y *nk1b* durante la embriogénesis

La expresión de mRNA de *Nk1a* se incrementó gradualmente desde las 8 hpf (79 copias de cDNA) hasta las 72 hpf (2841 copias de cDNA) (Fig. 56A), excepto a las 48 hpf (1174 copias), cuando el mRNA del receptor *Nk1a* disminuyó con respecto a 30 hpf (1621 copias). El aumento gradual de *nk1a* muestra que este gen juega un papel importante durante los procesos de desarrollo del pez cebra. La expresión del receptor *Nk1a* durante la embriogénesis recuerda la tendencia gradual de la expresión de la SP entre las 8-72 hpf. En contraste, el mRNA de *Nk1b* muestra un patrón de expresión diferente con respecto a *nk1a* (fig. 56B). En los estadios tempranos de desarrollo, 8 hpf (331 copias) a 22 hpf (297 copias), no se observaron cambios notorios en la expresión de *nk1b*, a excepción de las 16 y 19 hpf donde se encontró una menor expresión (196 y 203 copias, respectivamente) con respecto a las 8 y 22 hpf (Fig. 56B). Cuando el SNC se ha completado de formar a las 24 hpf, el receptor *nk1b* mostró una mayor expresión de (cerca de tres veces mayor, 674 copias) con respecto a las 22 hpf. La expresión de *nk1b* disminuyó su expresión mostrada a las 24 hpf en los posteriores estadios de desarrollo de las 30 y 48 hpf. Finalmente a las 72 hpf se observó que *nk1b* alcanzó su pico máximo de expresión (1091 copias) con respecto a todas las etapas de desarrollo estudiados (Fig. 56B). Un punto a resaltar de ambos receptores de neurocinina, *nk1a* y *nk1b*, del pez cebra estudiados durante la embriogénesis es que ambos receptores mostraron su mayor nivel de expresión en el estadio cuando el embrión termina su desarrollo embrionario. Este mismo patrón se observó para la expresión de la SP (Fig. 45).

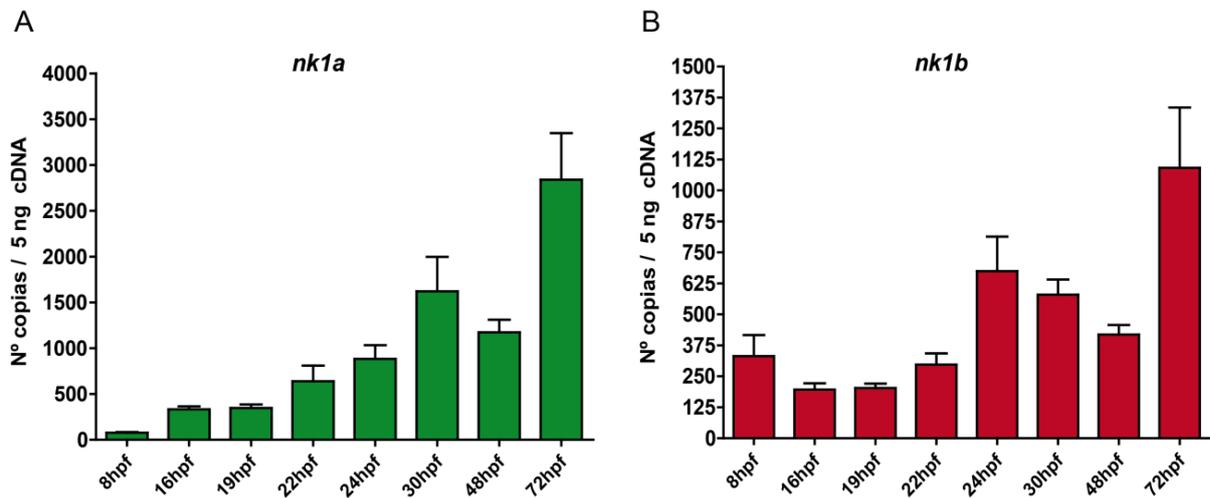


Fig. 56. Representación gráfica de la expresión de los receptores *nk1a* y *nk1b* del pez cebra en los diferentes estadios de desarrollo embrionario: 8, 16, 19, 22, 24, 30, 48 y 72 hpf. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios. Los niveles de expresión génica se midieron como intensidad de fluorescencia utilizando la qPCR y se normalizaron con respecto a la expresión *ef1a*. Cada barra representa el número de copias de cDNA de SP  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos realizándose cada uno por triplicado.

#### 4.2.13 Distribución espacial de *nk1a* y *nk1b* en embriones de pez cebra

Con el objetivo de determinar la distribución de *nk1a* y *nk1b* en embriones de pez cebra por ISH, elaboramos primeramente sus ribosondas respectivas. Con este fin diseñamos oligonucleótidos de toda la secuencia de DNA de *nk1a* y *nk1b* (Tabla 7). Una vez amplificados los amplicones de *nk1a* y *nk1b* por PCR, de RNA de embriones de 48 hpf, estos fueron visualizados en la campana de luz ultravioleta, después de la electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Fig. 57). Posteriormente, estas secuencias fueron ligados y subclonados en el vector pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Invitrogen). Una vez que conseguimos expresar nuestras secuencias de interés en el vector antes mencionado realizamos digestiones de comprobación del inserto de *Nk1a* y *Nk1b* en el vector de expresión pCR<sup>®</sup>II-TOPO (Fig. 57), por otro lado enviamos a secuenciar las secuencias de DNA de nuestros productos de *Nk1a* y *Nk1b* con los oligos universales de T7 y SP6.

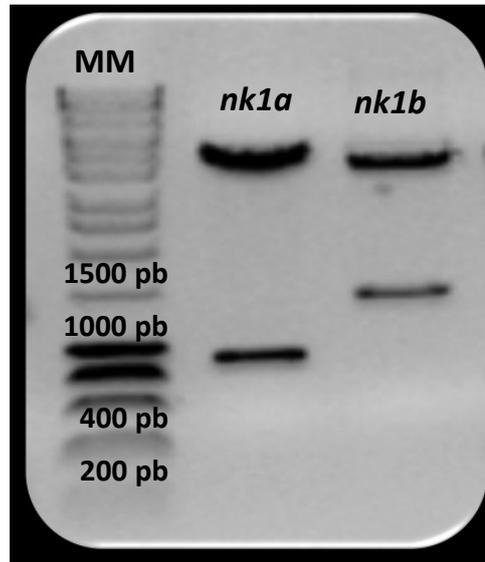


Fig. 57. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, correspondiente a la digestión de las construcciones de los receptores *nk1a* y *nk1b* insertados en el vector de expresión pCR<sup>®</sup>II (Invitrogen). Las bandas observadas corresponden al amplicón esperado para *nk1a* (960 pb) y *nk1b* (1510 pb). El receptor Nk1a insertado en el vector pCR<sup>®</sup>II fue digerido con XbaI y mientras que el receptor Nk1b insertado también en pCR<sup>®</sup>II fue digerido con XhoI. Marcador de peso molecular (MM) medido en pares de bases (pb).

Posteriormente, una vez que comprobamos que teníamos insertado las secuencias de nuestro interés realizamos otras digestiones con EcoRV en el caso de Nk1a y HindIII para Nk1b durante 1 hora a 37 ° C y empleamos los oligos de SP6 y T7 para realizar la transcripción de RNA de Nk1a y Nk1b, respectivamente. Empleamos los oligos que anillasen en la secuencia del promotor T7 para Nk1a y SP6 para Nk1b, y luego añadimos a la sonda el marcaje con digoxigenina. Luego el producto de RNA se trató con DNasa I (Roche) su posterior purificación. De esta manera, para los experimentos ISH, empleamos la concentración de 500ng/ml de la ribosonda de *nk1a* y *nk1b*, que se diluyó en la solución de prehibridación.

Empleado las ribosondas elaboradas en nuestro laboratorio, examinamos la distribución de Nk1a Nk1b a las 24 y 48 hpf en embriones de pez cebra. La transcripción Nk1a se detectó a las 24 hpf en diferentes regiones del SNC (telencéfalo, hipotálamo, diencéfalo, mesencéfalo, MHB, rombencéfalo, mesencéfalo, cerebelo) y también periféricamente en los somitas (Fig. 58A, C y E).

La expresión de *nk1b* a las 24 hpf, fue encontrado en el SNC (Fig. 59A, C y E) (telencéfalo, hipotálamo, diencéfalo, MHB, mesencéfalo, rombencéfalo y la médula espinal) y en la periferia (somitas). A las 48 hpf *nk1a* mostró una mayor expresión en el SNC que a las 24 hpf. En la periferia, la expresión de *nk1a* fue inferior a lo observado a las 24 hpf. Por otro lado, la expresión de *nk1a* a las 48 hpf además de expresarse en la mismas áreas que a las 24 hpf se expresó también en la notocorda y somitas (Fig. 60A, C y E). Los transcritos de *Nk1b* en el estadio de las 48 hpf (Fig. 61A, C y E) se observaron en el SNC, de manera similar que a las 24 hpf, aunque con una mayor expresión y sin la expresión en la médula espinal. En este estadio *nk1b* también se expresó en los somitas (Fig. 61C), pero con menos intensidad con respecto a las 24 hpf.

#### **4.2.14 Efectos de la cocaína sobre la expresión temporal y espacial de *nk1a* y *nk1b***

Los embriones expuestos a la cocaína (desde las 5 hpf) analizados a las 24 hpf mostraron un aumento de casi dos veces la expresión de *nk1a* con respecto al grupo control (de 475 a 913 copias,  $P < 0,0001$ ) (Fig. 62A). Asimismo, la expresión de *nk1b* se incrementó por efecto de la cocaína: más de tres veces la expresión con relación al grupo control (de 290 a 1012 copias,  $P = 0,0194$ ) (Fig. 62B). A las 48 hpf, la cocaína disminuyó la expresión de *nk1a* (de 2486 a 1757 copias,  $P = 0,0006$ ) (Fig. 62A). De manera contraria, la cocaína indujo un aumento (de casi el doble en los niveles de expresión) de *nk1b* (de 281 a 698 copias,  $P < 0,0359$ ) (Fig. 60B), en ambos casos la comparación fue con respecto al grupo control. Los resultados de las qPCR de los grupos de embriones control y expuestos a cocaína se normalizaron con el nivel de expresión del gen de referencia *ef1 $\alpha$*  (Fig. 62C).

Los experimentos realizados por ISH revelaron que la cocaína no produjo cambios

significativos en el patrón de expresión de *nk1a* (Fig. 58B, D y F) y *nk1b* (Fig. 59B, D y F) a las 24hpf ni tampoco a las 48 hpf de *nk1a* (Fig. 60B, D y F) y *nk1b* (Fig. 61B, D y F) en el SNC y en la periferia. Debemos resaltar que la ISH es una técnica más cualitativa que cuantitativa, que nos permite localizar la expresión de los genes. Según nuestros resultados de qPCR si encontramos cambios de expresión los cuales fueron significativos y al ser esta última técnica por excelencia más cuantitativa que la ISH, en la sección de discusión los cambios de expresión de *nk1a* y *nk1b* estarán basados en los resultados de la qPCR.

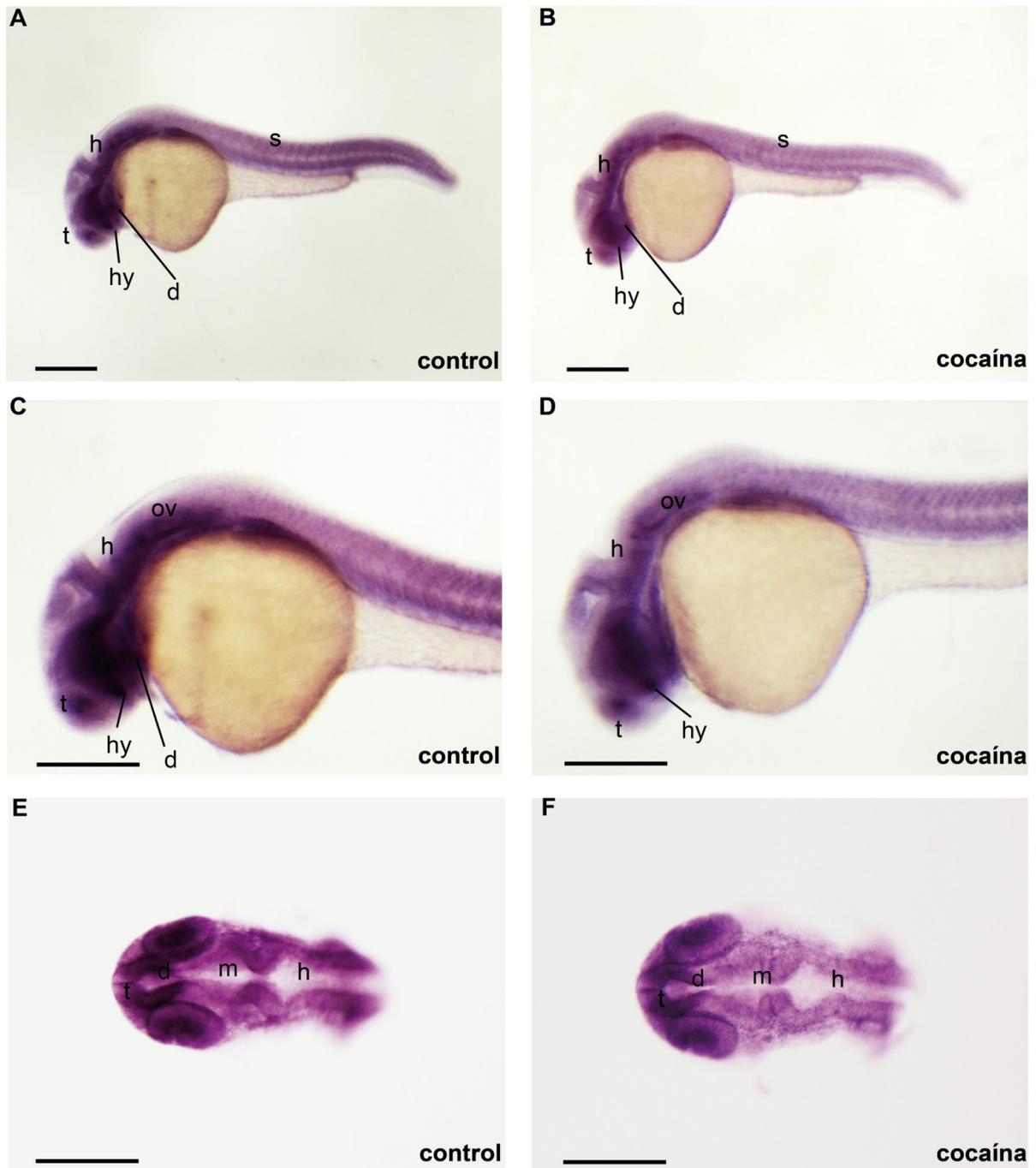


Fig. 58. Distribución espacial de *nk1a* en embriones enteros a las 24 hpf. Las vistas laterales (A y C) y dorsales (E y F) muestran que *nk1a* está presente en el telencéfalo, diencefalo, MHB, rombencéfalo y somitas. La cocaína no cambió significativamente el patrón de distribución de *nk1a* (B, D y F). Barra de escala de 250  $\mu$  m. t: telencéfalo, d: diencefalo, Hy, hipotálamo, m: mesencéfalo; h: rombencéfalo; ov: vesícula ótica; s: somitas. Magnificación 6.3x en A, B, E y F; 12X en C y D.

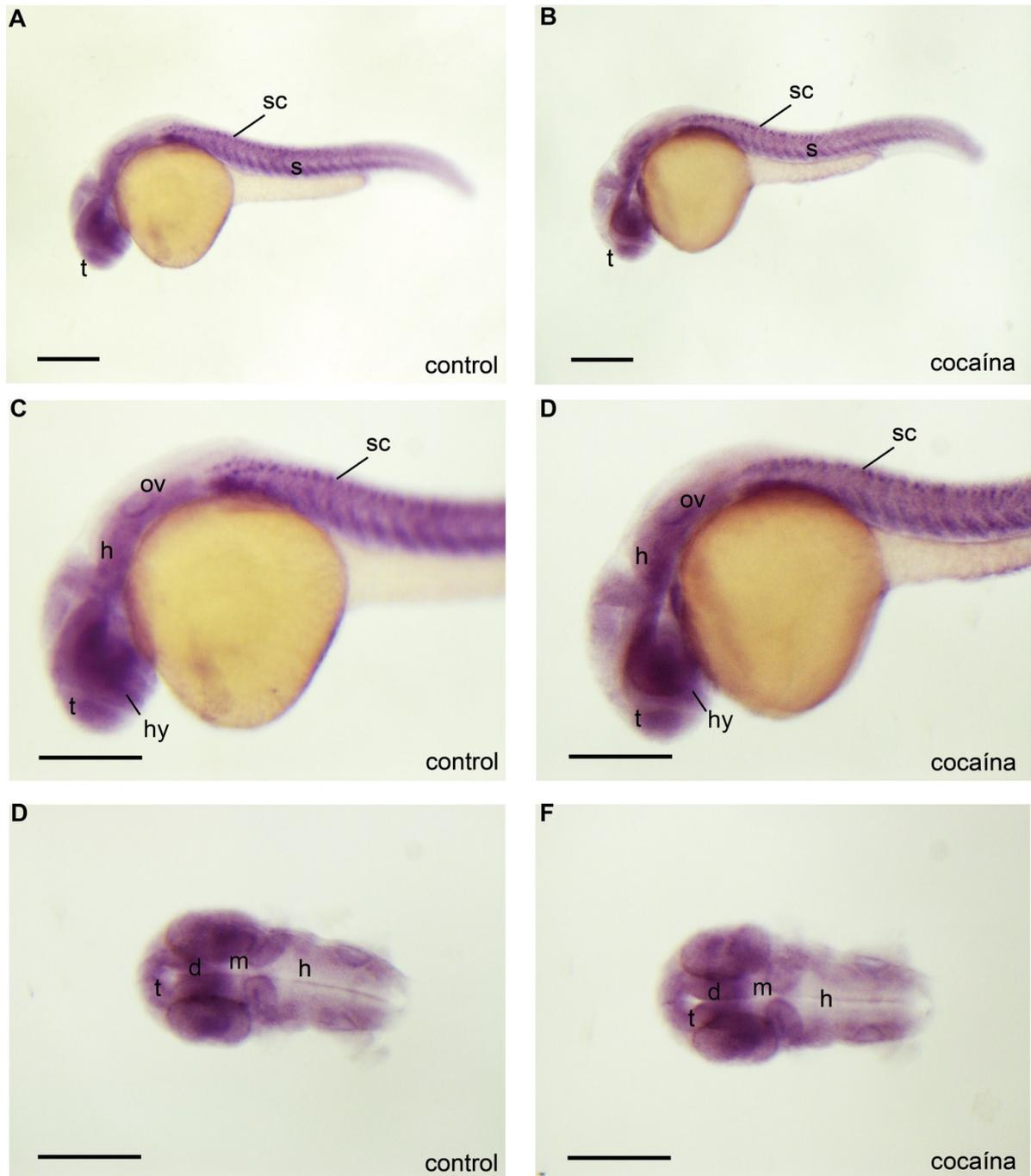


Fig. 59. Vista laterales y dorsales de la distribución espacial del mRNA de *nk1b* en embriones enteros (*in toto*) de pez cebra mediante ISH a las 24 hpf. La expresión de mRNA de *nk1b* se encontró en diferentes áreas del SNC: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, fascículo longitudinal medial (MLF), rombencéfalo, médula espinal y los somitas. Los embriones expuestos a la cocaína (B, D y F) no mostraron cambios evidentes en el patrón de expresión con respecto a los embriones del grupo control. Abreviaturas: t: telencéfalo, d: diencéfalo, hy, hipotálamo, m: mesencéfalo, h: rombencéfalo. ov: vesícula ótica; sc: médula espinal; n: notocorda, s: somitas. Barra de escala: 250  $\mu$ m. Magnificación 6.3x en A, B, E y F; 12X en C y D.

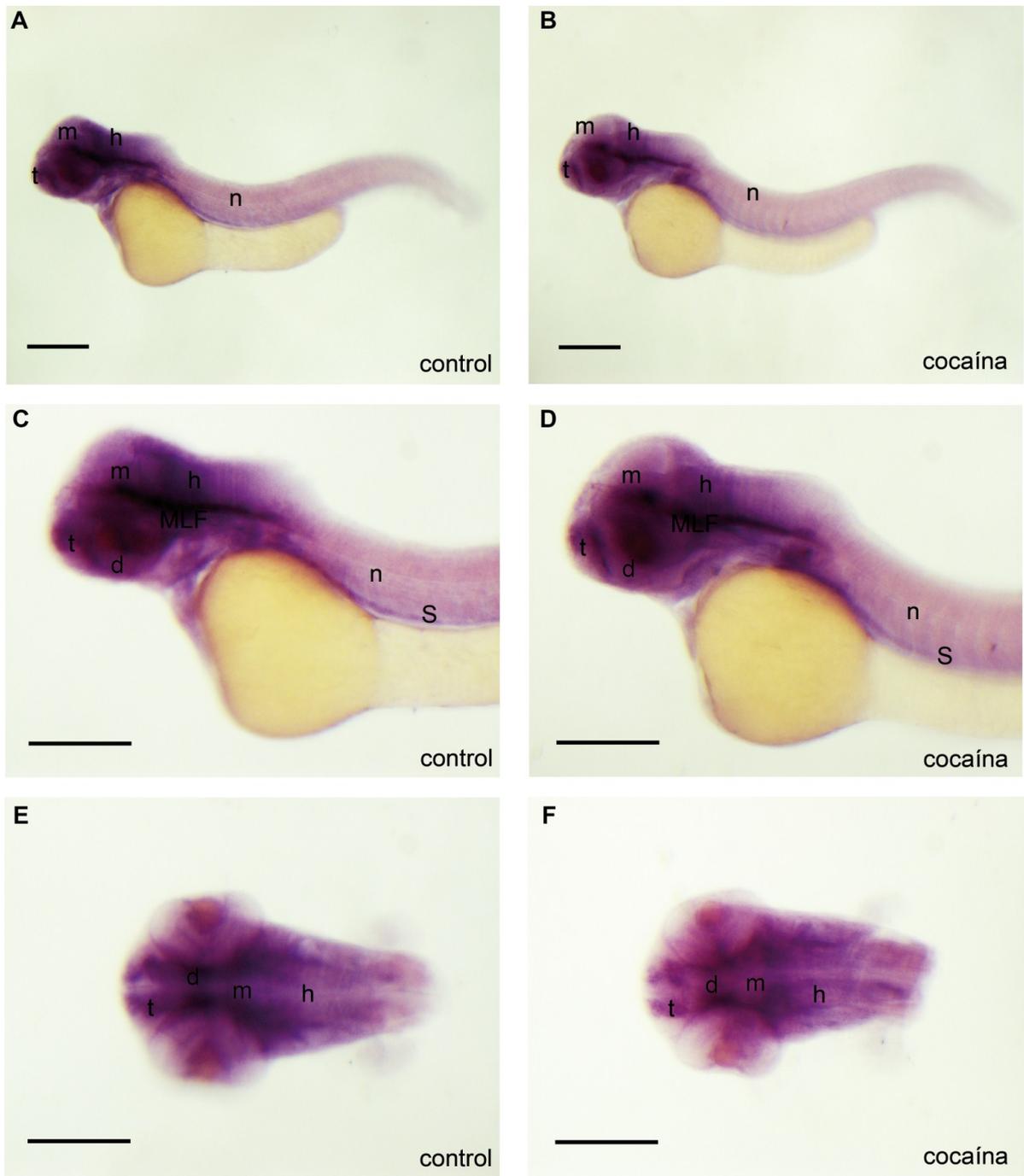


Fig. 60. Vista laterales y dorsales de la distribución espacial de *nk1a* en embriones de pez cebra mediante la técnica de la ISH a las 24 hpf. La expresión de mRNA de *nk1a* se observó en diferentes regiones del SNC: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, fascículo longitudinal medial (MLF), rombencéfalo, notocorda y los somitas. Los embriones expuestos a la cocaína (B, D y F) no mostraron cambios consistentes en el patrón de expresión con respecto a los embriones del grupo control. Abreviaturas: t: telencéfalo, d: diencéfalo, m: mesencéfalo, FLM: fascículo longitudinal medial, h: rombencéfalo. n: notocorda, s: somitas. Barra de escala: 250  $\mu$ m. Magnificación 6.3x en A, B, E y F; 12X en C y D.

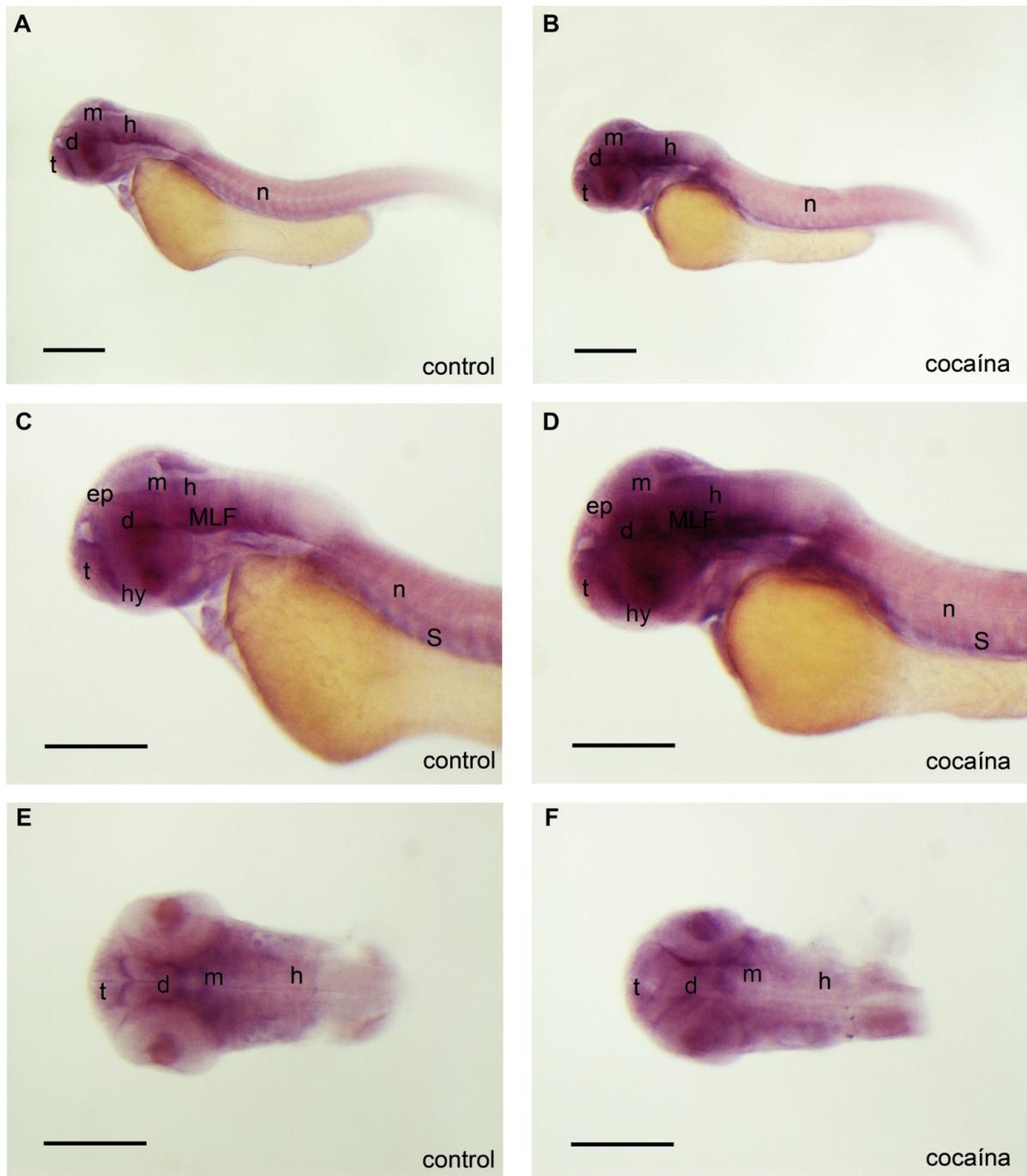


Fig. 61. Distribución espacial del mRNA de *nk1b* en embriones de peces cebra mediante ISH a las 48 hpf. La expresión de mRNA de *nk1b* se encontró en diferentes áreas del SNC: telencéfalo, diencefalo, epísis, hipotálamo, mesencéfalo, fascículo longitudinal medial (MLF), rombencéfalo, médula espinal y los somitas. Los embriones expuestos a la cocaína (B, D y F) no mostraron cambios evidentes en el patrón de expresión con respecto a los embriones del grupo control. Abreviaturas: t: telencéfalo, d: diencefalo, hy, hipotálamo, m: mesencéfalo, r: rombencéfalo, ep: epísis, n: notocorda, s: somitas. Barra de escala: 250  $\mu$ m. Magnificación 6.3x en A, B, E y F; 12X en C y D.

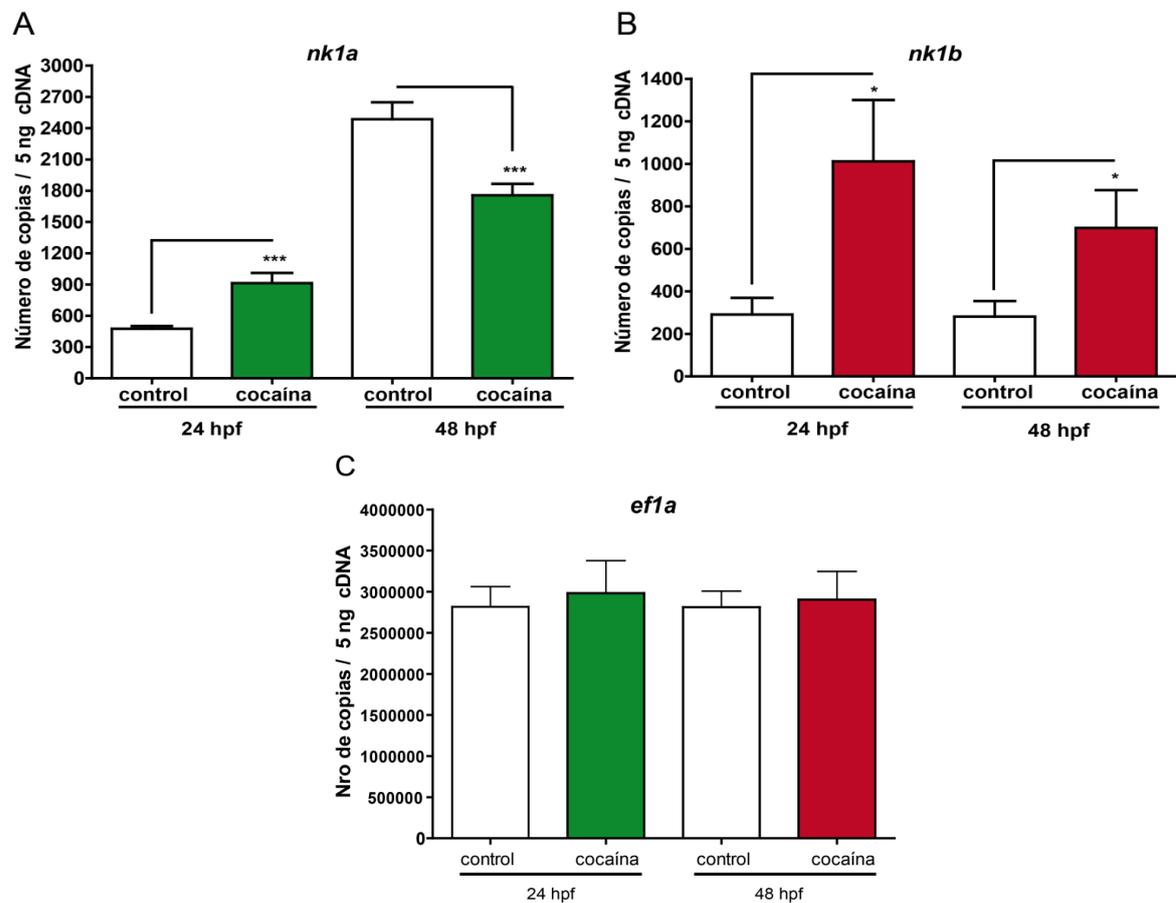


Fig. 62. Efectos de la cocaína sobre la expresión de *nk1a* (A), *nk1b* (B) y *ef1a* (C) a las 24 y 48 hpf. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios. Los niveles de expresión génica se midieron como intensidad de fluorescencia utilizando la qPCR y se normalizaron con respecto a la expresión del gen de referencia *ef1a* (C). Cada barra representa el número de copias de cDNA de SP  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos realizándose cada uno por triplicado. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student, de dos colas, para muestras independientes: \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

#### 4.2.15 Expresión de *nk1a* y *nk1b* tras el silenciamiento de los receptores opioides

Los morfolinós de los receptores opioides, siguiendo la metodología descrita en material y métodos y en la sección de resultados de los receptores opioides, microinyectamos los MO de los receptores opioides en el vitelo, en el estadio de desarrollo de 1 a 4 células. Cuando el MO de ZfDOR2 se microinyectó en los embriones de 1 a 4 células, y estos alcanzaron las 48 hpf de desarrollo embrionario encontramos una disminución de la expresión de *nk1a* en relación a sus niveles basales (de casi ocho veces menos de expresión) (de 390 a 50 copias,  $P=0.0010$ ) (Fig. 63A) y tras la microinyección del morfolino estándar (o también llamado MO

control) (400 copias). Por el contrario, la microinyección del MO de ZfMOR indujo un incremento de casi cuatro veces la expresión de *nk1b* (de 352 a 1273 copias,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 63B) en los niveles de expresión de *nk1b* en comparación con el grupo control y el grupo MO control (334 copias de cDNA). Por otro lado, las microinyecciones de los otros morfornos de ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR1 y 2 (en el caso de *nk1a*) y ZfDOR1, ZfDOR1 y ZfDOR1 y 2 (en el caso de *nk1b*) no produjeron cambios en la expresión de los receptores de neurocinina *nk1a* y *nk1b* en el pez cebra.

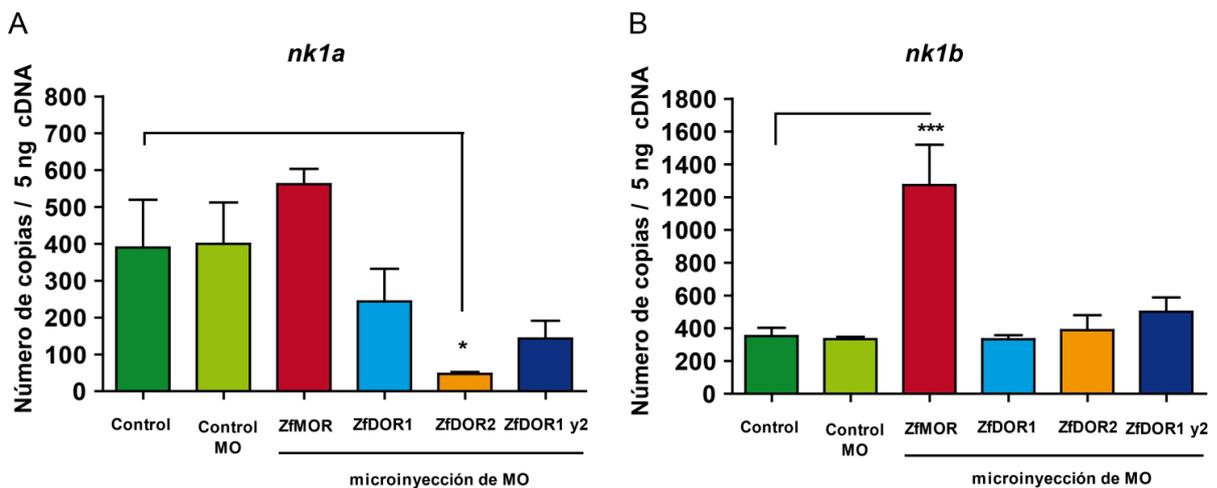


Fig. 63. Efectos de la microinyección de los MOs de los receptores opioides sobre los niveles de expresión de *nk1a* (A) y *nk1b* (B). Doscientos embriones fueron utilizados para la extracción de RNA. Los niveles de expresión génica se midieron como intensidad de fluorescencia utilizando la qPCR y se normalizaron con respecto a la expresión del gen de referencia *ef1α*. Cada barra representa el número de copias de cDNA  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno fue realizado por triplicado. El análisis estadístico fue realizado empleando el análisis de varianza (ANOVA de una vía) con el *post hoc* de Dunnett: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$ .

#### 4.2.16 Efectos de la cocaína en la expresión de Nk1a y Nk1b transfectadas en células HEK-293

Las células HEK-293 no expresan los receptores Nk1a y Nk1b, por lo que al transfectarse NK1a y NK1b (acoplados a proteínas fluorescentes, verde y rojo respectivamente) podemos estudiar las acciones específicas de estos receptores. Una vez transfectadas las células HEK-293, expresando la NK1a-pEGF-C3 (verde fluorescente) y NK1b-pDsRed-N-1 (rojo fluorescente), habiendo seleccionado y

obtenido clones estables, y comprobado que estaban nuestros genes de interés por observación microscópica y por PCR, expusimos 1.5  $\mu\text{M}$  de cocaína (la misma concentración empleada en los embriones) a tres grupos de células HEK-293, cada grupo con su respectivo grupo control (sin exposición de cocaína) (Fig.64). El tiempo de exposición fue de 24 horas a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Previo a la exposición de cocaína durante 24h, observamos el efecto de la cocaína en intervalos de cada 2 h, buscando signos de toxicidad. Tras las 24 h de la exposición de 1.5  $\mu\text{M}$  cocaína no encontramos signos de toxicidad (Fig. 64). Al emplear las células humanas HEK-293 empleamos el GADPH como gen de referencia para los experimentos de qPCR (expresión constante y menor variación tras la exposición de sustancias exógenas en el caso de las células humanas).

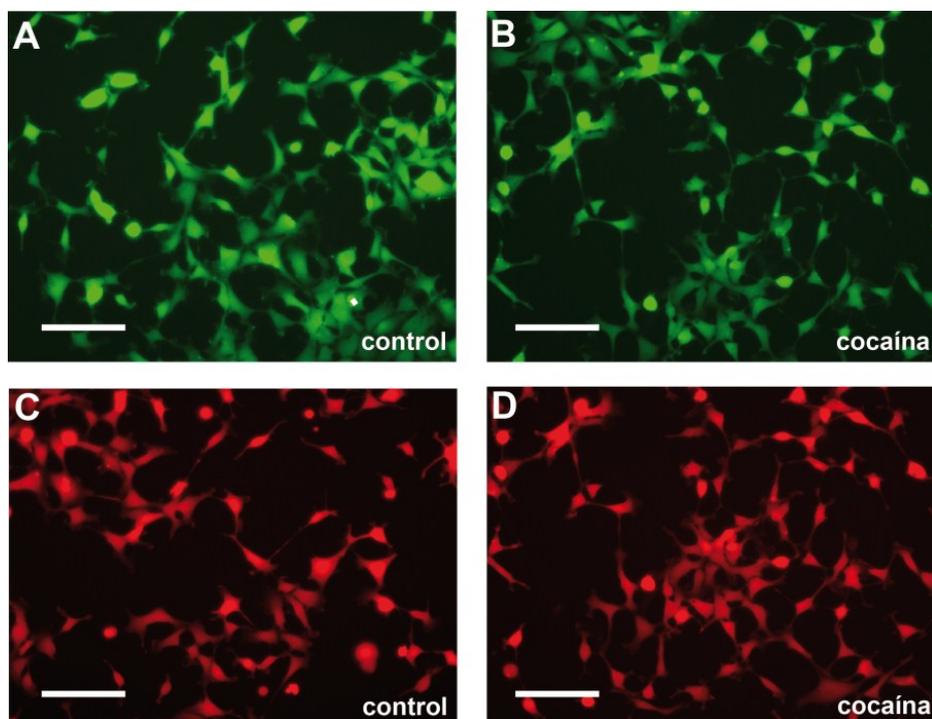


Fig. 64. Células HEK-293 expresando los receptores Nk1a (A y B) y Nk1b (C y D) del pez cebra. Las células HEK-293 fueron transfectadas con Nk1a-pEGFP-C3 y Nk1b - pDsRed-N-1. Todas las imágenes de la izquierda corresponden a células HEK-293 del grupo control (A y C) y las de la derecha a células expuestas a clorhidrato de cocaína (B y D). Las fotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia invertido. El tratamiento fue realizado con clorhidrato de cocaína 1,5  $\mu\text{M}$  durante 24 h a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Barra de escala 100  $\mu\text{M}$ .

En los experimentos de PCR observamos que la cocaína indujo una disminución marcada de la expresión de *Nk1a*-pEGFP-C3 (Fig. 65A) con respecto al grupo control. La disminución de expresión de *Nk1b*-pDsRed1-N1 (Fig. 65B) no es tan evidente por PCR estándar y no nos permite asegurar si la cocaína induce una franca disminución de su expresión con respecto al grupo control. La expresión de *GADPH* en las células HEK-293 transfectadas con *Nk1a*-pEGFP-C3 (Fig. 65C) y *Nk1b*-pDsRed1-N1 (Fig. 65 D) (expuestas y no expuestas a cocaína) se mantiene constante en los grupos control y expuestos a cocaína.

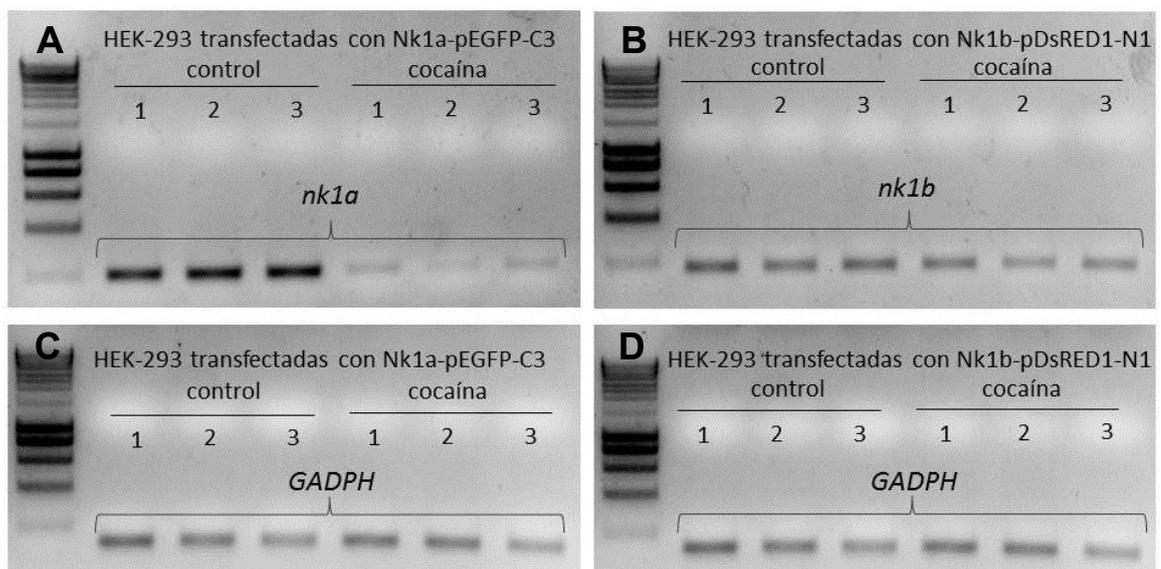


Fig. 65. Electroforesis de gel de agarosa de *nk1a* (194 pb), *nk1b* (173 pb) y *GADPH* (138 pb). Los receptores *Nk1a* y *Nk1b* (acoplados a las proteínas pEGFP-C3 y pDsRED1-N1, respectivamente) fueron transfectados en las células HEK-293. A) Expresión de *nk1a* en células Hek-293 transfectadas con el receptor *Nk1a*, grupo control y expuestos a cocaína. B) Expresión de *nk1b* en células HEK-293 (transfectadas con el receptor *Nk1b*), grupo control y expuestos a cocaína. C) Expresión de *GADPH*, en células HEK-293 transfectadas con el receptor de *NK1a*. D) Expresión de *GADPH*, en células HEK-293 transfectadas con el receptor *NK1b*.

Asimismo, analizamos la expresión de *Nk1a*-pEGFP-C3 y *Nk1b*-pDsRed1-N1 por qPCR. De acuerdo a nuestras observaciones, podemos apreciar que los niveles de cDNA de *Nk1a*-pEGFP-C3 muestran una disminución en su expresión en los embriones tratados con cocaína con respecto al grupo control (de 16355 a 1424 copias) (Fig. 61A) ( $P < 0.0001$ ). Estos resultados son similares a los observados por

PCR convencional (Fig. 60A). Cuando analizamos la expresión de Nk1b-pDsRed1-N1 pudimos apreciar una disminución de su expresión (de 5904 a 758 copias (Fig. 66B) ( $P < 0.001$ ), resolviendo nuestra duda generada por los resultados de PCR (Fig. 65B) esto demuestra que las qPCR tiene una mayor sensibilidad, precisión y son de gran utilidad en los casos cuando la expresión por PCR estándar no puede discriminar con precisión el aumento o disminución de mRNA (Fig. 65B). Debemos mencionar, que como en todos los experimentos de qPCR, nuestros resultados de la expresión de Nk1a-pEGFP-C3 y de Nk1b-pDsRed1-N1 fueron normalizados con la expresión de *GADPH* (Fig. 66B)

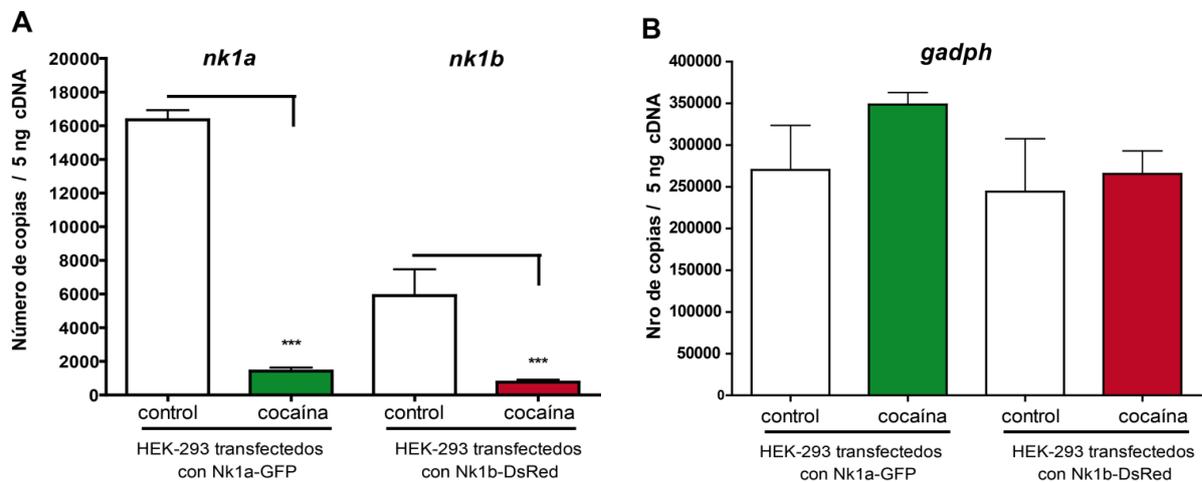


Fig. 66. Efectos de la cocaína sobre la expresión de *nk1a*, *nk1b* (A) y *GADPH* (B) en células HEK-293 transfectadas con Nk1a-pEGFP-C3 y de Nk1b-pDsRed1-N1. Aproximadamente  $2 \times 10^6$  células (por cada grupo) han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA. Los niveles de expresión génica se midieron como intensidad de fluorescencia utilizando la qPCR y se normalizaron con respecto a la expresión del gen de referencia *GADPH* (C). Cada barra representa el número de copias de cDNA de SP  $\pm$  EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos realizándose cada uno por triplicado. Los valores de P se calcularon mediante la prueba t de Student, de dos colas, para muestras independientes\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .



## **Discusión**



Los fármacos opioides, tipo morfina, de los que se conocen actualmente, producen una mayor analgesia (Matthes y cols., 1996; Sora y cols., 1997; Bie and Pan, 2007) en el tratamiento del dolor agudo y crónico, e incluso de algunos dolores asociados a patologías como el cáncer. Para producir este efecto analgésico, la morfina debe unirse a los receptores opioides, principalmente al receptor opioide mu (Matthes y cols., 1996; Sora y cols., 1997). Sin embargo, los receptores opioides también se han relacionado con la tolerancia y adicción tras su uso prolongado (Matthes y cols., 1996; Sora y cols., 1997; Ballantyne y LaForge, 2007; Ueda y cols., 2003). Conocer cómo se produce y qué procesos están involucrados en la adicción, sin duda, nos permitirá eliminar el componente adictivo de los nuevos analgésicos opioides que se diseñen en un futuro. Por tal motivo, escogimos, para este proyecto, una de las drogas que más adicción produce, la cocaína, ya que si se llega a esclarecer el complejo mecanismo de adicción que produce (el cual comparte varios mecanismos con los opioides) estaríamos en la capacidad de evitar el efecto adictivo de los fármacos opioides (Corrigall and Coen, 1991; Nestler, 1992; Matthes y cols., 1996; Sora y cols., 1997; Becker et al., 2002, , Olive et al., 2001) que hoy día presentan tras su uso prolongado para el tratamiento del dolor (Ballantyne y LaForge, 2007; Ueda y cols., 2003). Por otro lado, la cocaína además de producir adicción, puede inducir una alteración en la expresión de muchos genes como el de los receptores relacionados con el dolor y la analgesia: receptores de la SP (Noailles and Angulo, 2002; Commons, 2010) y receptores opioides (Azaryan y cols., 1998; Yuferov y cols., 1999; Schroeder y cols., 2003). Esta alteración de los receptores puede inducir un aumento o disminución de la percepción de la sensación dolorosa. Un cambio de expresión de estos receptores opioides, de la SP y de los receptores de neurocinina puede

producir una alteración en la sensibilidad de la percepción del dolor y del umbral del dolor. A su vez, estos receptores opioides y de la SP pueden ser regulados, positiva o negativamente por ciertos microRNAs (miRNAs): miRNA let-7d (Chandrasekar and Dreyer, 2009; He y cols., 2010) y mir-206 (Greco and Rameshwar, 2007), respectivamente. Si la expresión de los miRNAs son afectados por la exposición de cocaína, estos miRNAs a su vez pueden producir cambios en la expresión y función de sus genes diana: receptores opioides y de la SP. Por lo tanto, la acción de la cocaína en los procesos de adicción, dolor y analgesia puede deberse a los cambios que pueda producir directamente sobre los receptores opioides, neuroquininas o indirectamente al alterar la expresión de los miRNAs, sin olvidar que existen más sustancias implicadas en todo este entramado, de las cuales algunas han sido estudiadas y otras son poco o nada conocidas. Dada la importancia y la adicción que produce el consumo de cocaína en nuestra sociedad actual, nos propusimos realizar un estudio más amplio sobre la alteración en los niveles de transcripción de los receptores opioides y de las taquiquininas por acción de la cocaína, con el objeto de mejorar la comprensión del complejo mecanismo que despliega la cocaína en la adicción y el dolor.

### **5.1 Efectos de la cocaína sobre la expresión de los receptores opioides**

Aprovechando la clonación y la caracterización farmacológica de los receptores opioides en el pez cebra: ZfMOR (Barrallo y cols., 2000), ZfDOR1 (Barrallo y cols., 1998), ZfDOR2 (Pinal-Seoane y cols., 2006) y ZfKOR (Alvarez y cols., 2006), nos planteamos estudiar el efecto de la cocaína sobre la expresión de estos receptores, al estar estos relacionados a los procesos de adicción y analgesia (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2). El receptor ZfKOR también está relacionado con los procesos de dolor y adicción, pero no se tomó en cuenta en el presente

estudio por su baja expresión génica durante el desarrollo embrionario (Sánchez-Simón y Rodríguez, 2008).

En el presente trabajo, el receptor opioide mu del pez cebra, *zfmor*, (Fig. 24) mostró alteraciones en su expresión durante los diferentes estadios de desarrollo embrionario tras la exposición de cocaína. Estos cambios están de acuerdo con las observaciones de Azaryan y cols. (1998) y Yuferov y cols. (1999), quienes encontraron cambios del receptor opioide mu (MOR) después de la administración de cocaína en ratas. MOR está acoplado a la proteína G para ejercer su acción y los cambios inducidos por la cocaína en la expresión de MOR, también puede afectar la función de este receptor (Izenwasser y cols., 1996; Schroeder y cols., 2003). De este modo, los cambios inducidos por la cocaína en la expresión del MOR pueden inducir indirectamente alteraciones en la percepción del dolor y su modulación, ya que la analgesia producida por la morfina es debido a su interacción principalmente con el MOR (Matthes y cols., 1996). En lo que respecta a los receptores opioide delta (DORs), *zfdor1* (Fig. 25) mostró mayores cambios en relación *zfdor2* (Fig. 26) tras la exposición de la cocaína, lo que sugiere que cada receptor presenta diferente sensibilidad al efecto de la cocaína y por lo tanto también desempeñan funciones diferentes durante el desarrollo embrionario. Estos resultados podrían deberse al hecho de que *zfdor1* y *zfdor2* tienen diferentes perfiles de expresión espacial y temporal durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Sánchez-Simón y Rodríguez, 2008) y también a sus distintas propiedades farmacológicas (Pinal-Seoane y cols., 2006), a pesar de que *zfdor1* y *zfdor2* presentan una alta homología molecular (71%) (Barrallo y cols., 1998; Pinal-Seoane y cols., 2006). El hecho de que *zfdor2* mostró cambios menos marcados en su expresión, inducidos por la cocaína, podría ser debido a su posible papel durante la embriogénesis, ya que los receptores opioides delta se han relacionado

con la neurogénesis y neuroprotección (Narita y cols., 2006; Gallego y cols., 2009). Por otro lado, el cambio de expresión de *zfmor* y *zfdor1* principalmente podría deberse a que la cocaína induzca la liberación de péptidos opioides endógenos tipo  $\beta$ -endorfina y Leu y Met encefalinas (Liu y cols., 2000; Roth-Deri y cols., 2008; Nguyen y cols., 2012) y éstas a su vez tras su activación sobre los receptores opioides mu y delta, respectivamente induzcan cambios en la expresión de los receptores opioides.

Algo que nos llamó la atención al estudiar la expresión de los receptores opioides es que estos receptores mostraron una alta expresión (medida por qPCR) a las 10 hpf, lo cual nos planteó la necesidad de determinar su expresión espacial. De acuerdo a lo mencionado, mostramos por primera vez la expresión de *zfmor*, *zfdor1* y *zfdor2* (Fig. 27A, G y M, respectivamente) por ISH al final del período de la gastrulación en embriones de pez cebra (10 hpf). Nuestros resultados corroboran la presencia y la importancia de los receptores opioides delta en la embriogénesis (Gallego y cols., 2009). La novedad de este estudio se basa en que de todos los receptores de opioides estudiados se presentan en el estadio de gástrula tardía del desarrollo embrionario y están distribuidos en las futuras estructuras cefálicas, del eje embrionario, del tronco posterior y la región de la cola, lo que indica que cada receptor o su interrelación puede mediar acciones diferentes y cruciales durante el desarrollo embrionario temprano de los vertebrados. Nuestras observaciones mediante ISH y qPCR mostraron que la cocaína induce un incremento en la expresión de todos los receptores de opioides a las 10 hpf, lo que sugiere un rol de la cocaína en las alteraciones de la embriogénesis actuando a través de los receptores opioides. Estudios anteriores, de nuestro grupo de investigación, utilizando oligosondas revelaron la presencia de los receptores de opioides durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Sánchez-Simón y Rodríguez, 2008), pero

las oligosondas son mucho menos sensibles que las ribosondas. En consecuencia, clonamos los receptores opioides para preparar sus respectivas ribosondas. De esta manera determinamos los transcritos de *zfmor*, *zfdor1* y *zfdor2*, los cuales se distribuyeron de forma similar a las 24 hpf (en el telencéfalo, diencéfalo, techo óptico, mesencéfalo, MHB, rombencéfalo, la médula espinal y los ojos). El patrón de expresión a las 48 hpf se mantuvo similar a la observada a las 24 hpf, pero con la adición de su expresión en el fascículo longitudinal medial (MLF), somitas, notocorda y aletas pectorales). La expresión de los receptores opioides en el SNC y a nivel periférico fueron similares a los encontrados en otros mamíferos (humano, rata y ratón) (Hauser y cols., 1989) y también a la distribución espacial de los receptores opioides en el pez cebra (Porteros y cols., 1999; Pinal-Seoane y cols., 2006; Sánchez-Simón y Rodríguez, 2008) mediante el empleo de oligosondas. Por otra parte, la expresión de *zfmor*, *zfdor1* y *zfdor2* en regiones similares, que se detallan en este estudio, podría explicar la posibilidad de que estos receptores puedan formar complejo de receptores opioides de homodímeros y/o heterodímeros (Gomes y cols., 2000; Gomes y cols., 2004; Jordan y Devi, 1999; George y cols., 2000). Por lo tanto, estos receptores pueden alterar sus propiedades farmacológicas y la unión de agonistas/antagonistas opioides endógenos y exógenos y por lo tanto cambiar las funciones de los receptores opioides (Gomes y cols., 2004). En consecuencia, teniendo en cuenta la expresión espacial y temporal, junto con los cambios producidos por la exposición de la cocaína sobre los receptores opioides durante el desarrollo embrionario, proporcionamos evidencias relevantes sobre el papel del sistema opioide durante el desarrollo embrionario, mostrando que una alteración de los receptores opioides en etapas muy tempranas del desarrollo embrionario puede tener repercusiones en los distintos procesos en los que los receptores opioides están implicados: el desarrollo

del SNC (Kent y cols., 1981; Geladopoulos y cols., 1987; Barg y Simantov, 1989; Zagon y McLaughlin, 1991; Kim et al, 2006), neurogénesis, neuroprotección y su modulación (Narita y cols., 2006; Winzer-Serhan y cols., 2003; Sargeant y cols., 2007), modulación de la supervivencia neuronal (Meriney y cols., 1991), desarrollo vascular (Yamamizu y cols., 2011), modulación de las células del sistema inmune (McCarthy y cols., 2001; McCarthy y cols., 2004; Ninković y Roy, 2011), desarrollo del corazón (McLaughlin y Allar, 1998; McLaughlin y Wu, 1998), y posible papel en el desarrollo del sistema neuromuscular y su función (Evans y Smith, 1996; Sánchez-Simón y Rodríguez, 2008, Peng y cols., 2012).

Actualmente no poseemos anticuerpos contra ninguno de los receptores opioides para el pez cebra (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfKOR), los presentes en el mercado actualmente, de humano, rata y ratón muestran un marcaje inespecífico, Por lo tanto, poder determinar si el aumento o disminución de los niveles de expresión de mRNA indefectiblemente aumenta o disminuye la síntesis de las proteínas de los receptores opioides por efecto de la cocaína sería muy interesante, pero por las razones explicadas no podemos en el momento actual aclarar este postulado.

## **5.2 Efecto de la cocaína en la expresión de dre-let7d y sus precursores.**

Es importante, tener en cuenta que durante los últimos años, el estudio de los miRNAs muestran que éstos regulan la expresión de determinados mRNA, generalmente induciendo una inhibición de la traducción o degradación de los mRNA (Wienholds y Plasterk, 2005; Felekis et al., 2010). Lo que muestra que mayor expresión de mRNA y a la vez mayor actividad de un miRNA sobre este último inducirá una menor síntesis de proteínas. Por lo tanto, el paradigma de que una mayor expresión de mRNA produzca una mayor síntesis de proteína, se pone

en debate con la función de los miRNAs. Esto incluso es mucho más complejo, pues estos miRNAs pueden regular cientos de mRNA a la vez y cada mRNA posee en su secuencia varios sitios de unión para diferentes miRNAs (Brennecke y cols., 2005).

Diferentes miRNAs han sido relacionados con la actividad de los receptores opioides, como el miR-190 (Zheng y cols., 2009; Zheng y cols., 2010), miR-133b (Sánchez-Simón y cols., 2010), miR-23b (Wu y cols., 2008; Wu y cols., 2009) y más específicamente se ha planteado que el receptor opioide mu sería un diana de la familia de los miRNA Let-7 (Chandrasekar y Dreyer, 2009; He y cols., 2010). El pez cebra presenta el miRNA *dre-let-7d* que viene a ser el ortólogo de *let-7d* de mamíferos, estos muestran una alta homología, de un 72% (Fig. 31D). La mayoría de las actividades de los miRNAs se encuentran conservados en los vertebrados (Wienholds y Plasterk, 2005; He y cols., 2010). La forma madura del miRNA depende de la expresión de sus precursores, por lo cual también evaluamos el efecto de la cocaína en la expresión de los precursores *dre-let-7d-1* y *dre-let-7d-2* y el miRNA maduro *dre-let-7d*, este último es el que presenta la actividad funcional, aunque un cambio en el patrón de expresión de sus precursores podría tener repercusiones sobre la forma madura.

Nuestras observaciones revelaron que *dre-let-7d* se expresó en el SNC, lo cual está de acuerdo con las observaciones obtenidas mediante qPCR e ISH en otros animales como los mamíferos que muestran que *let-7d* y su precursor se expresan en el SNC (VTA, región del caudado putamen, núcleo *accumbens*, la corteza prefrontal y el hipocampo) (Chandrasekar y Dreyer, 2009). Del mismo modo, los miembros de la familia *let-7d* se han encontrado en los tejidos embrionarios, como los precursores neuronales y también en el sistema nervioso en desarrollo del pez cebra (Lagos-Quintana y cols., 2002; Lee y cols.,

2005; Wienholds y cols., 2005; Wulczyn y cols., 2007). En el presente estudio, la cocaína induce cambios en la expresión de *dre-let-7d* (Fig. 31A) y sus precursores (Fig. 31B y C). El aumento de expresión de *dre-let-7d-2* (Fig. 31C) se correlacionó con el aumento de la expresión de su forma madura, el *dre-let-7d*, lo que sugiere que la cocaína, afectando la expresión de los precursores del miRNA podría inducir cambios en la expresión de miRNA maduro (Coolen y Bally Cuif, 2009; Davis-Dusenbery y Hata, 2010; Gurtan y cols., 2012). En este sentido, nuestras observaciones confirman que la cocaína aumenta la expresión de las proteínas implicadas en la biogénesis de los miRNA, Drosha, Dicer y Ago2 (Fig. 38A, B y C, respectivamente). Sugiriendo que la alteración de la expresión de *drosha*, *dicer* y *ago2* tendrían consecuencias en la expresión y la actividad de los miRNAs maduros.

Por otro lado, nuestras observaciones de la distribución de *dre-let-7d* en el SNC confieren a este miRNA un papel importante durante la formación del SNC (24 hpf) y la organogénesis primaria (48 hpf) en embriones de pez cebra. Creemos que esto podría extrapolarse a los vertebrados superiores. Por lo tanto, a la luz de lo anterior, los cambios observados en la expresión de *dre-let-7d* y sus precursores podría afectar importantes procesos llevados a cabo durante la embriogénesis y el desarrollo del SNC (Lagos-Quintana y cols., 2002; Lee y cols., 2005; Wienholds y cols., 2005; Wulczyn y cols., 2007).

### **5.2.1 El silenciamiento y la sobreexpresión de los receptores opioides altera la expresión de *dre-let-7d* y sus precursores**

Se ha predicho que el miRNA let-7d tiene unión en la secuencia codificante del mRNA (Chandrasekar y Dreyer 2009) y su existencia ha sido demostrada dentro de las regiones 3'UTR del mRNA (He et al, 2010), lo cual puede afectar la expresión de los receptores opioides. A la luz de estos resultados, hipotetizamos

que si los receptores opioides son dianas del miRNA *dre-let-7d*, el silenciamiento de los receptores opioides afecta el perfil de expresión del gen del miRNA maduro y sus precursores. En consecuencia, para corroborar que *zfmor*, *zfdor1* y *zfdor2* eran dianas de *dre-let-7d* a las 48 hpf, silenciamos los receptores opioides de pez cebra (*ZfMOR*, *ZfDOR1*, *ZfDOR2* y *ZfDOR1 y 2*). Nuestro estudio demostró que el silenciamiento de los receptores opioides regula a la baja la expresión de *dre-let-7d* (Fig. 39A) y sus precursores, *dre-let-7d-1* (Fig. Fig. 39B) y *dre-let-7d-2* (Fig. 39C). Este hallazgo indica que los receptores opioides son dianas potenciales de *dre-let-7d* en el pez cebra al igual que en los mamíferos (Chandrasekar y Dreyer, 2009; He y cols., 2010). Debemos de precisar que los receptores opioides no serían las únicos dianas de *let-7d*, pues se han sugerido otras dianas potenciales del miRNA *let-7d* como las semaforinas (6A y 4C), la neurofilina 2 y el receptor dopaminérgico (*DRD3*) por predicción bioinformática y que se deben corroborar en futuras investigaciones (Chandrasekar y Dreyer, 2009).

Por otra parte, la sobre-expresión de *zfmor* y *zfdor1* indujo cambios en la expresión de *dre-let-7d* (Fig. 36J) y su precursor *dre-let-7d-2* (Fig. 36C y G). No está claro cómo la microinyección de *zfdor1*, que incrementa la expresión de *dre-let-7d-2* (Fig. 36G), por el contrario disminuyó la expresión de *dre-let-7d* (Fig. 36J). Una posibilidad podría ser que los precursores de los miRNAs y los miRNAs maduros tienen diferentes sensibilidades a la cocaína o la cocaína afecta *Drosha*, *Dicer* y *Ago2* (proteínas implicadas en la biogénesis de miRNA) de diferentes maneras, que aún desconocemos. Esto está de acuerdo con el hallazgo de que *Ago2* modula la adicción a la cocaína y es importante para la expresión de diferentes miRNAs (Schaefer et al., 2010).

El silenciamiento de los receptores opioides afecta la expresión de *dre-let-7d* y sus precursores (Fig. 38A, B C), y la similar expresión de los de receptores de

opioides (Fig. Fig. 28A, Fig. 29A y Fig. 30A) y el miRNA let-7d en el SNC y en la periferia (Fig. 33A) indica que tanto los receptores opioides y el miRNA dre-let-7d presentan una estrecha relación. Por lo que una consecuencia de esta interrelación es que el incremento de dre-let-7d (Fig. 31A) posiblemente disminuye la expresión de los receptores mu y delta 1 (Fig. 24 y Fig. 25) (a las 48 hpf) que están involucrados en el proceso del dolor (Matthes y cols., 1996; Loh y cols., 1998; Schuller y cols., 1999; Zhang y Pan, 2010), lo que sugiere un posible rol del miRNA let-7d en el proceso del dolor.

Tomando estos datos en conjunto, evidenciamos que silenciando y sobreexpresando los receptores opioides se afecta la expresión de los precursores y la forma madura del miRNA dre-let-7d y que la cocaína puede afectar esta expresión (de los precursores y la forma madura de dre-let-7d) por algún mecanismo que involucre el sistema opioide (Ver esquema en la figura 67). Esta regulación de miRNAs en sus dianas proporciona nuevas estrategias para el diseño de nuevos fármacos analgésicos, ya que si hay una baja expresión de receptores de opioides y una alta expresión de let-7d, una posible terapia, podría ser la administración de un antagonista o inhibidor de let-7d para inducir un incremento de los receptores opioides. Aunque, debemos recordar lo mencionado en párrafos anteriores y primero dilucidar si los receptores opioides son los únicos dianas del miRNA let-7d, ya que se ha sugerido otros dianas de éste miRNA que signifique que la modulación no sólo mejoraría la terapia analgésica, sino puede alterar otras funciones biológicas.

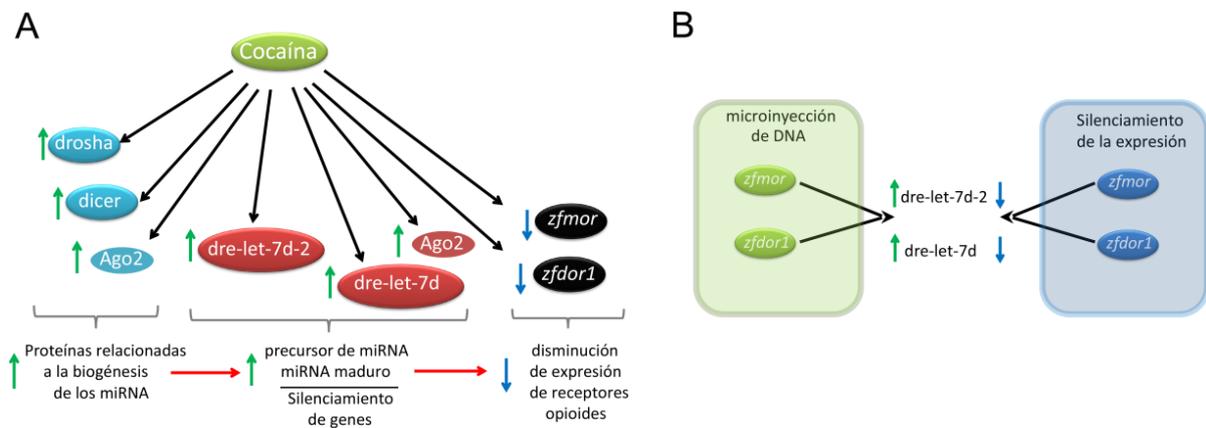


Fig. 67. A) Esquema que muestra el proceso de las acciones de la cocaína en la expresión del mRNA de las proteínas implicadas de la biogénesis de los miRNAs (*drosha*, *dicer* y *ago2*), *dre-let-7d-2* y *dre-7d* y los receptores de opioides (*zfmor* y *zfdor1*) a las 48 hpf. En la parte inferior de la imagen en A, se explica que la cocaína alterando la expresión de *drosha*, *dicer* y *ago2* afecta la expresión de *dre-let-7d* y su precursor *dre-let-7d-2*, y de *ago2* (mediador del silenciamiento de los miRNAs). Por lo tanto, como consecuencia se produciría una disminución de la expresión del mRNA de los receptores opioides *zfmor* y *zfdor1*. Proponemos que la cocaína regula la expresión de *zfmor* y *zfdor1* a través del miRNA *dre-let-7d*. B) La sobreexpresión (microinyección de DNA) y el silenciamiento (microinyección de morfolinós) de los receptores opioides (*ZfMOR* y *ZfDOR1*), supuestos objetivos del miRNA *dre-let-7d*, altera la expresión de *dre-let-7d* y su precursor (*dre-let-7d-2*), lo que confirma que los receptores opioides mu y delta son regulados por *dre-let-7d*.

### 5.3 Efectos de la cocaína en los procesos de proliferación y apoptosis

De acuerdo con nuestros resultados, en los embriones expuestos a la cocaína la expresión de los receptores opioides se incrementó durante las primeras etapas de desarrollo (8-24 hpf) y disminuyó en los estadios tardíos (48 a 72hpf). Dado que la cocaína induce alteraciones en la apoptosis (Imam et al, 2005; Cunha-Oliveira et al, 2006; Dey et al, 2007; Lepshc et al, 2009) y los procesos de proliferación (Hu et al, 2006; Lee et al., 2008), nuestros resultados muestran que la cocaína al afectar los procesos de apoptosis y proliferación podría alterar la expresión de los receptores opioides y la expresión *dre-let-7d*. Para descartar que los cambios observados en la expresión de los receptores de opioides y *dre-let-7d* pudieran ser debido al efecto de la cocaína en los procesos de proliferación y apoptosis, estudiamos la proliferación (H3P) y la apoptosis (p53 y TUNEL). Según nuestras observaciones la cocaína induce un aumento en la proliferación y la apoptosis a las 24 hpf y a las 48 hpf en el SNC, lo cual indica que los cambios

sobre nuestros genes de interés *dre-let-7d* y sus precursores, así como con la disminución de ZfMOR y ZfDOR1 es independiente de los procesos de proliferación y apoptosis.

En conclusión, tomando en consideración todo lo mencionado anteriormente los receptores opioides y el miRNA *dre-let-7d* presentan patrones similares de expresión en el SNC y en la periferia. El silenciamiento y la sobreexpresión de los receptores opioides (por separado) afecta a la expresión de *dre-let-7d*, lo que indica una estrecha relación entre los receptores de opioides y el miRNA *dre-let-7d*. En este sentido, los efectos de la cocaína durante la embriogénesis temprana pueden tener repercusiones en los diferentes procesos en los que los receptores de opioides y *dre-let-7d* están involucrados (por ejemplo, el desarrollo del SNC). Dado que los cambios en la expresión de los receptores opioides inducida por la cocaína durante el desarrollo puede ser permanente a lo largo de la vida del organismo, esto podría tener repercusiones en los procesos de dolor y la adicción. Por lo tanto, nuestro estudio ofrece una nueva visión en la comprensión de los procesos de dolor y la adicción, lo cual contribuirá a la búsqueda de nuevas soluciones para estas situaciones.

## 5.4 Clonación de Tac1 en el pez cebra

### 5.4.1 Precursor de Tac1 y la SP en el pez cebra

En mamíferos el gen TAC1 presenta cuatro isoformas, conocidas como  $\alpha$ TAC1,  $\beta$ TAC1,  $\gamma$ TAC1 y  $\delta$ TAC1, y todos ellos contienen la región que codifica la secuencia de SP, la NKA está codificada por las isoforma  $\beta$ TAC y  $\gamma$ TAC1, mientras que el NPK y NP $\gamma$  son codificadas por la isoformas  $\beta$ TAC (Regoli y cols., 1987, Harrison y Geppetti, 2001, Kang y cols., 2004). En el caso del pez cebra el gen de la *tac1* muestra una mayor homología por la isoforma  $\gamma$ TAC1 de humano y contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la SP, NKA y NP  $\gamma$  (Fig. 42 B y C). En el pez cebra no hemos encontramos la presencia de diferentes isoformas de *tac1*, a pesar de que este organismo se caracteriza por presentar duplicados de varios genes (Barrallo y cols., 1998; Pinal-Seoane y cols., 2006; Rodríguez-Martin y cols., 2007; Fällmar y cols., 2011). Este gen contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la SP, NKA y NP  $\gamma$  (Fig. 42 B y C).

De la secuencia de aminoácidos de la SP algo sumamente importante que debemos resaltar es que el residuo Pro<sup>4</sup> se ha conservado a lo largo de la evolución en todas las especies estudiadas (mamíferos, aves, anfibios y peces) (Conlon, 1999). Según nuestras observaciones, la Pro<sup>4</sup> también está presente en el pez cebra (Fig. 42C y Tabla 10A) y desde que se ha determinado que éste residuo de amino ácido es importante en la determinación de la unión de alta afinidad hacia los receptores NK1 de mamíferos (Cascieri y cols., 1992), indica que en el pez cebra es un buen modelo para estudiar el sistema de taquicininas y así obtener una mejor comprensión de los procesos fisiológicos y patológicos en los que participa la SP y sus receptores.

#### **5.4.2 La filogenia de Tac1 y de la SP muestra que el pez cebra es un buen modelo par el estudio de las taquicininas**

El análisis filogenético del precursor Tac1 utilizando los métodos de NJ (Saito y Nei, 1987) y ML (Jones y cols., 1992) ha demostrado que la Tac1 del pez cebra se alinea dentro de la familia de los teleósteos (carpín, pez globo y medaka), lo que indica que hay una definición clara entre los grupos de peces, anfibios, aves y mamíferos (Fig. 43A y B). Asimismo, el análisis filogenético de la SP utilizando los métodos de NJ (Saito y Nei, 1987) y ML (Jones y cols., 1992) mostró que la SP del pez cebra también se alinea en el grupo de los teleósteos (carpín y medaka) (semejante a la de Tac1), con una clara delimitación de los grupos de anfibios, aves y mamíferos (Fig. 44A y B), lo que sugiere que este neuropéptido tienen un origen común y que su evolución es coherente con la descrita para las diferentes especies estudiadas, que mantienen la típica secuencia -FXGLM-NH<sub>2</sub> en el C-terminal (Van Loy y cols. 2010). Realizamos un doble análisis filogenético empleando diferentes métodos (NJ y ML) con el fin de corroborar que el replicación de la alineación de las ramas en efecto era debido a la divergencia de las secuencias de aminoácidos, más que a los algoritmos que emplean los análisis filogenéticos.

#### **5.4.3 Desarrollo de la SP durante el desarrollo embrionario del pez cebra**

La SP del pez cebra mostró un progresivo incremento de su expresión durante el desarrollo embrionario del pez cebra (Fig. 45), esto podría deberse a que la SP y las taquicininas en general estarían jugando un rol importante durante el desarrollo embrionario, pues se conoce que las taquicininas son necesarias para el desarrollo de la hematopoyesis y la formación del sistema inmune (Kang et al., 2004) que son críticos en el desarrollo embrionario. Además, este incremento gradual tiempo-dependiente del mRNA de la SP se relaciona con el desarrollo de la

función sensitiva y motora durante la embriogénesis, como son: el inicio de los primeros movimientos de contracción no coordinados o espontáneos (19 hpf), formación funcional del circuito motor sensorial a las 24 hpf, una respuesta coherente a los estímulos táctiles (27 hpf), una disminución en la frecuencia de los movimientos espontáneos (30 hpf), respuestas de mayor duración al tocarse los embriones (36 hpf); respuestas rápidas y vigorosas provocadas por un simple toque (42 hpf) y respuestas de escape consistentes y muy rápidas a los estímulos táctiles con respecto a los estadios previos de desarrollo (48-72 hpf) (Kimmel et al., 1995). Desde que a las 19 hpf el SNC no está completamente formado, es poco probable que los embriones puedan sentir dolor, aunque en la etapa de las 24 hpf el SNC ya casi está completamente formado y conformado por los 5 lóbulos característicos (telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal) (Kimmel et al., 1995). En este sentido, podemos plantear la hipótesis de que los embriones en este estadio de desarrollo ya puedan sentir o experimentar dolor, pues reaccionan con movimiento frente a los estímulos inducidos (por ejemplo táctiles). Hasta la fecha de hoy, no existe un modelo específico para estudiar el dolor en los peces, y por lo tanto, nuestra hipótesis aún no puede ser confirmada. La mayor expresión de mRNA de SP que se encuentra en las etapas más tardías del desarrollo embrionario del pez cebra sugiere que este neuropéptido podría actuar como un modulador o NT de la señalización nociceptiva (Zimmer y cols., 1998), y que también podría regular el estrés en los embriones, ya que la SP se ha relacionado con la modulación de hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Frisch y cols., 2010), que es secretada bajo estrés. Asimismo, en sujetos sanos, con estrés crónico, se han encontrado niveles elevados de SP (Schedlowski y cols., 1995). Por otra parte, la SP puede inducir la expresión de receptores funcionales de la hormona liberadora de corticotropina

(CRHR-1) (Asadi y cols., 2010). Todos estos hallazgos sugieren que el aumento progresivo en los niveles de la SP es necesario para permitir un adecuado desarrollo del pez cebra y que este pueda responder adecuadamente al estrés, a los estímulos nocivos y que por lo tanto la SP esté modulando la señalización nociceptiva.

Nuestras observaciones por ISH, revelan que la SP se distribuye en el SNC, telencéfalo, diencéfalo, el hipotálamo, pretectum, mesencéfalo, MHB, rombencéfalo, vesícula ótica, la médula espinal y los somitas a las 24 hpf (Fig. 48A, C y E), mientras que a las 48 hpf la expresión de la SP se distribuye en la mismas áreas que a las 24 hpf y además está presente en la notocorda (Fig. 49A, C y E). La expresión de mRNA de la SP en la notocorda sólo se encontró a las 48 hpf (a diferencia de las 24 hpf). La expresión de mRNA de la SP en el pez cebra en la médula espinal y las centros superiores del SNC es similar a la distribución de la SP y su gen precursor TAC1 con la de los mamíferos (Myohanen y cols., 2008) y otros peces como el bacalao (*Gadus calarias* y *G. morrhua*) y el carpín (*Carassius auratus auratus*) (Ostlund y cols., 1956; Lin and peter, 1997). La expresión de mRNA de la SP en la notocorda confiere a este neuropéptido y su gen precursor, *tac1*, un rol crítico en la formación y desarrollo de los tejidos del ectodermo y mesodermo, ya que la notocorda induce la formación de placa basal del tubo neural (Cleaver and krieg, 2001) y la formación de los somitas, tejidos del mesodermo y endodermo. Además, varios estudios han demostrado que la notocorda expresa señales importantes, tales como sonic hedgehog (SHH) (van Straaten y cols., 1985; Placzek y cols., 1993), la proteína morfogenética ósea 7 (del inglés *Bone Morphogenetic Proteins*, BMP) (BMP7), BMP2, BMP3, folistatina, BMP1/tolloid, factor de crecimiento transformante b3 (TGF-b3), TGFb5, factor embrionario de crecimiento de fibroblastos (eFGF), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4),

activina (Xatv), relacionada con el Nodal 2 (ndr2), Xnr4, nogina, cordina y (factor inducible por hipoxia) Hip (Cleaver and krieg, 2001). Los mecanismos de acción de las señales de la notocorda son importantes durante el desarrollo embrionario, lo que sugiere que la SP, junto con otras señales de la notocorda previamente mencionadas, sería crítico durante la embriogénesis. Por otro lado, la presencia de la SP en la notocorda conduce a muchas más preguntas, tales como si la SP es otra señal que se produce en la notocorda, si tiene una función determinada, y si es así, que función tendría. Estas son preguntas a ser respondidas en futuros trabajos de investigación.

#### **5.4.4 Efectos de la cocaína en la expresión de la SP**

Cuando la formación del SNC se ha completado en el pez cebra (24 hpf), la cocaína indujo un aumento en la expresión de la SP en el SNC medido por qPCR (Fig. 46) y ISH (diencéfalo, pretectum y los rombencéfalo y vesícula ótica) a las 24 hpf (Fig. 48B, D y F) con respecto al grupo control (Fig. 48A, C y E) , mientras que a las 48 hpf (el final de la organogénesis primaria) la expresión de la SP disminuyó (Fig. 46, por qPCR) en el diencéfalo, pretectum y los rombencéfalo y vesícula ótica a las 24 hpf (Fig. 48B, D y F) con respecto al grupo control (Fig. 48A, C y E) (mediante la ISH). Esto indica que la cocaína afecta a la expresión de la SP en función de la etapa de desarrollo embrionario del pez cebra. Creemos que el aumento observado en el mRNA de la SP a las 24 hpf podría estar relacionado con la inducción de la proliferación celular por la cocaína (Llooyd y col., 2010; Hong y cols., 2011; Opolka y cols., 2011) y por consiguiente un aumento de la SP puede provocar un aumento de proliferación celular durante la embriogénesis pez cebra. El efecto de la cocaína sobre la expresión de la SP a las 48 hpf, disminución de la expresión de SP, se podría deber, a través de la inhibición de la proliferación celular, a la inducción de la toxicidad celular y apoptosis que produce la cocaína

(Hong y cols., 2011; Snider y Choi, 1996; Liu y cols., 1999). Nuestras suposiciones están basadas en que el antagonista del receptor de NK1 (receptor de la SP preferencialmente) ejerce una función protectora contra muerte la celular en el cuerpo estriado de mamíferos (Loonam y cols., 2003), lo que sugiere que la cocaína afectando la expresión de mRNA de la SP y este activando su receptor (NK1) puede inducir la muerte celular. Nuestras observaciones muestran que la cocaína afectando la expresión temporal y espacial de la SP puede podría tener consecuencias en el normal desarrollo embrionario, en las etapas más posteriores después de la embriogénesis o incluso en la vida adulta de los organismos.

#### **5.4.5 La cocaína induce cambios en la expresión del miR-206 y sus precursores**

Generalmente, la secuencia y función de los miRNAs están conservados a lo largo de la evolución en los vertebrados (Wienholds y Plasterk, 2005; Ha y cols., 2008 y Yang y cols., 2011, He y cols., 2010). Según Greco y Rameshwar. (2007) el miR-206 a través de su acción sobre *TAC1* está regulando negativamente la expresión de la SP y desde que el miR-206 del pez cebra mostró una homología similar (100%) con la secuencia humana, sugirió que el pez cebra podría aportarnos valiosa información sobre la expresión de la SP y el efecto de la cocaína obre este neuropéptido y el miRNA-206. Nuestras observaciones mediante qPCR mostraron que la cocaína produce efectos diferentes en la expresión de los precursores del miR-206 y de su forma madura, ya que la forma madura es la que presenta una función en la expresión de los mRNAs, nos centramos sobre los resultados del miR-206 maduro por acción de la cocaína. Según Greco y Rameshwar. (2007) una inhibición o una disminución del miR-206 (Fig. 50C) debería inducir un aumento en la expresión de la SP, ya que el miR-206 está regulando negativamente la expresión del precursor de la SP y de éste último. Sin

embargo, una disminución de la expresión del miR-206 (a las 48 hpf) por efecto de la cocaína (Fig. 50C) no se correlacionó con un incremento de la SP, sino todo lo contrario, una disminución de la SP. Esto podría deberse a que en el pez cebra, es probable que el miR-206 no sea el modulador principal de la expresión de la SP, y quizá otros miRNAs estén modulando de manera más relevante la expresión de la SP, tales como el miR-130b, miR-302a (Greco y Rameshwar, 2007). Además, es posible también que el miR-206 en el pez cebra esté más involucrado en otros procesos, como la formación del músculo esquelético y cardíaco (Koutsoulidou y cols., 2011; Townley-Tilson y cols., 2010), y del ritmo circadiano (Zhou y cols., 2011) que en la regulación de la SP.

#### **5.4.6 El silenciamiento de los receptores opioides afecta la expresión de la SP**

Varias investigaciones han demostrado que los receptores opioides y de neurocininas (NK1Rs) están co-expresados en algunas áreas del cerebro relacionadas con el proceso del dolor y la adicción (Gadd y cols., 2003; Poulin y cols., 2006; Aicher y cols., 2000; Wan y cols., 2006; Yu y cols., 2009), donde la morfina puede incrementar la expresión de los mRNA y de la síntesis del receptor NK1 (Wan y cols., 2006), mientras que la activación de DOR y MOR disminuye la liberación de la SP de fibras aferentes primarias (Beaudry y cols., 2011). Por otra parte, se ha descrito que la SP modula la expresión de MOR y viceversa (Yu y cols., 2009; Eckersell y cols., 1997; Yoo y cols., 2005). Por lo tanto, debido a que el sistema opioide y de las taquicininas están estrechamente relacionados, estudiamos la expresión del mRNA de la SP tras el silenciamiento de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR1/ZfDOR2). El silenciamiento o *knockdown* de ZfMOR aumentó la expresión de la SP (Fig. 51), mostrando que MOR regula positivamente la expresión del mRNA de la SP. Nuestros resultados

son diferentes al hallazgo encontrado en el ratón knock-out del receptor opioide mu (Yoo y cols., 2005), donde la ausencia del receptor opioide mu mostró niveles bajos de mRNA en el núcleo ventromedial del hipotálamo (que controla la alimentación y el comportamiento nociceptivo) (Yoo y cols., 2005). Estos resultados discordantes pueden ser debido a que en nuestro caso hemos estudiado el silenciamiento de MOR durante la embriogénesis y empleando para el estudio mediante la qPCR los embriones integros (*in toto*) y no en núcleos concretos, mientras que Yoo y cols. (2005) llevaron a cabo su estudio en un núcleo específico del SNC (núcleo ventromedial del hipotálamo). Todos los estudios de qPCR, actualmente, en el pez cebra se basan en la expresión de los genes en embriones íntegros, pues al tener el pez cebra adulto y más los embriones, un tamaño muy pequeño es muy complicado trabajar o aislar núcleos concretos, aunque debemos de buscar la forma y los métodos para estudiar ciertos núcleos específicos en nuestras próximas investigaciones.

Desde que el receptor opioide mu media principalmente el efecto analgésico producido por la morfina (Matthes y cols., 1996; Majumdar y cols., 2011; Lamberts y cols, 2011) y la SP se considera un NT de las neuronas sensoriales primarias que intervienen en la transmisión sináptica del dolor (Millan y cols., 1983; Krumins y cols, 1989; Otsuka y Yoshioka, 1993; Snijdelaar y cols., 2000; Seybold, 2009;), y que además la SP está relacionada con la adicción (Gadd y cols., 2003; Commons, 2010) significa que los cambios en la expresión de la expresión del mRNA de la SP pueden afectar a la adicción y los procesos del dolor. Por otro lado, según nuestras observaciones los receptores opioides delta (ZfDOR1 y ZfDOR2) del pez cebra no afectan la expresión del mRNA de la SP, lo que demuestra que no hay una interacción entre ellos. A pesar de que nuestros resultados no revelan una relación entre DORs y la SP, en este tema hay ciertas controversias debido a que

en ratones *knockout* del gen precursor de la SP se ha determinado que disminuye el efecto analgésico mediado por el receptor opioide delta (Guan y cols., 2005).

En conclusión, en esta investigación sobre clonación de *tac1* y la expresión de la SP del pez cebra en SNC y las zonas periféricas, y sus niveles de aumento progresivo durante la embriogénesis sugieren un papel importante para este neuropéptido en el desarrollo del SNC y del embrión en general así como en los procesos del desarrollo del sistema sensorial y motor. Los cambios producidos por efecto de la cocaína, estudiados en dos etapas importantes del desarrollo del pez cebra (24 hpf-formación del SNC y a las 48 hpf-final de la organogénesis), sugiere que la cocaína podría alterar el desarrollo embrionario adecuado. Además, la regulación de a SP por MOR sugiere una amplia gama de acciones del MOR después de su unión con los fármacos agonistas y antagonistas. Por último, nuestros resultados abren nuevas puertas hacia una mejor comprensión del dolor, el abuso de drogas y los procesos de desarrollo temprano de la embriogénesis.

## **5.5 Identificación de receptores de neurocininas en el pez cebra**

### **5.5.1 Clonación de los receptores Nk1a y Nk1b en el pez cebra.**

En el presente trabajo hemos identificado los genes de los receptores de neurocinina *nk1a* y *nk1b* en el pez cebra, los cuales son genes duplicados. Todos los mamíferos presentan un solo gene para el receptor *NK1*. Las proteínas que codifican los genes de *nk1a* y *nk1b* fueron de 426 y 412 aminoácidos, respectivamente (Fig. 53 y 54). SP puede unirse indistintamente a los receptores de neuroquinina NK1, NK2 y NK3, pero tiene una mayor afinidad por el receptor NK1R (Regoli y cols., 1987; Regoli y cols., 1994; Harrison y Gepetti, 2001). Por lo tanto, sería muy interesante determinar si la SP del pez cebra o de mamíferos tiene la misma afinidad por los receptores de Nk1a y Nk1b o si muestran una mayor afinidad por algún receptor duplicado en particular. La duplicación del receptor

NK1R indica que el pez cebra ofrece ciertas ventajas para el estudio de los receptores de las taquicininas, ya que la duplicación de genes podría generar una subfunción de ambos receptores u originar una nueva función en uno de ellos (Postlethwait, 2007). Las secuencias de amino ácidos de las proteínas de los receptores Nk1a y Nk1b del pez cebra comparten características comunes con respecto a otros miembros de la superfamilia de GPCR: sitios consenso de N-glicosilación, múltiples sitios de fosforilación de residuos aminoacídicos de serina y treonina, un sitio potencial de palmitoilación, y los  $\text{DRY}$  y los dominios típicos de las GPCR: es decir, las regiones del  $\text{DRY}$  y el  $\text{K/RK/RXXK/R}$  (Fig. 54) (Yokota y cols., 1989; Takeda y cols., 1991; Hopkins y cols., 1991; Sundelin y cols., 1992; Gerard y cols., 1993). Los dos sitios consenso para los sitios de N-glicosilación en el humano, receptor NK1 de humano ( $\text{Asn}^{14}$  y  $\text{Asn}^{18}$ ) (Takeda y cols., 1991) están conservados en el receptor Nk1a del pez ( $\text{Asn}^{13}$  y  $\text{Asn}^{17}$ ) (Fig. 54), pero no en el receptor Nk1b, donde los residuos de asparragina (de humano) están sustituidos por  $\text{Asp}^{14}$  y  $\text{Ala}^{18}$  (Fig. 54). Esta diferencia en el patrón de N-glicosilación entre los receptores Nk1a y Nk1b podría implicar cambios en la bioactividad del receptor Nk1b y afectar así su estabilidad física, porque la glicosilación del receptor NK1 se cree que estabiliza el receptor en la membrana plasmática (Tansky y cols., 2007). Por otro lado, la cinética de la internalización del receptor NK1 después de la doble mutación de  $\text{Asn}^{14}$  y  $\text{Asn}^{18}$  es más rápida en comparación con el tipo salvaje del receptor NK1 (Tansky y cols., 2007). Varios residuos de aminoácidos de las secuencias N-terminales del receptor NK1 ( $\text{Asn}^{23}$ ,  $\text{Gln}^{24}$  y  $\text{Phe}^{25}$ ) (Fig. 54) de diferentes mamíferos (humano, rata y ratón) se conservan en los receptores Nk1a (posición 29, 30 y 31) y Nk1b (posición 30, 31 y 32) del pez cebra. Estos residuos de amino ácidos son para la alta afinidad de los agonistas de NK1. Se ha visto que cuando estos aminoácidos se mutan no se altera el orden ni la potencia de las

taquicininas. (Fong y cols., 1992a), lo que sugiere que los receptores de Nk1 del pez cebra pueden ofrecer una importante herramienta para la investigación de la estructura y la actividad del receptor NK1 y por lo tanto proporcionar valiosa información sobre el sistema de las taquicininas.

Otros aminoácidos que se han estudiado y están involucrados en la alta afinidad de la SP sobre el receptor NK1 de humano son Asn<sup>85</sup>, Asn<sup>89</sup>, Tyr<sup>92</sup> y Asn<sup>96</sup> (en el dominio TM2) y Tyr<sup>287</sup> (en TM7) (Huang y cols., 1994), que están conservados en el receptor Nk1a (Asn<sup>91</sup>, Asn<sup>95</sup>, Tyr<sup>98</sup>, Asn<sup>102</sup> y Tyr<sup>293</sup>) (Fig. 2) y Nk1b (Asn<sup>92</sup>, Asn<sup>96</sup>, Tyr<sup>99</sup>, Asn<sup>103</sup> y Tyr<sup>294</sup>) (Fig. 54) del pez cebra. Dos de los residuos de amino ácidos Val<sup>116</sup> e Ile<sup>290</sup> del receptor NK1 en humano (Fong y cols., 1992a) se conservan también en el pez cebra, Nk1a (Val<sup>122</sup> y Ile<sup>296</sup>) y Nk1b (Val<sup>123</sup> y Ile<sup>297</sup>) y sorprendentemente no están presentes en la rata y el ratón, donde dichos amino ácidos están sustituidos por la Leu<sup>116</sup> y Ser<sup>290</sup>. Estos residuos (Val<sup>116</sup> e Ile<sup>290</sup>) del receptor NK1 de humano parecen ser determinantes para la unión selectiva del antagonista no-peptídico CP 96.345 sobre el receptor NK1 y además son también importantes en la diferencia entre las diferentes especies (Fong y cols., 1992b). La sustitución de Val<sup>116</sup> e Ile<sup>290</sup> del receptor NK1 de humano por los de Leu<sup>116</sup> y Ser<sup>290</sup> en la rata le confiere a este último una sensibilidad al antagonista de NK1 conocido como RP 67.580 (Fong y cols., 1992b). Asimismo, otro antagonista no peptídico del receptor NK1, WIN 51.708, se une al receptor NK1 de la rata pero no a la del humano. Esta unión está mediada por el residuo Ser<sup>290</sup> en la rata, mientras que el receptor NK1 de humano tiene el residuo amino ácido Ile<sup>290</sup> (Venepalli y cols., 1992). De acuerdo con estos hallazgos, también es poco probable que los antagonistas WIN 51.708 y RP 67.580 se unan a los receptores de Nk1a y Nk1b del pez cebra, ya que estos receptores tienen residuos de isoleucina (Ile<sup>296</sup> y Ile<sup>297</sup>) en Nk1a y Nk1b, respectivamente) (Fig. 54). Por otro lado, los residuos de serina y

treonina se han relacionado en la sensibilización y desensibilización del receptor NK1 y al presentar los receptores Nk1a y Nk1b del pez cebra potenciales sitios de fosforilación en residuos de serina o treonina demuestran que el pez cebra, en especial sus receptores de Nk1 pueden ser capaces de arrojar nueva información sobre la desensibilización e internalización del receptor NK1 (Garland y cols., 1996). La homología de los receptores Nk1a y Nk1b en relación al receptor NK1 de rata, humano y ratón es del 66% (Tabla 12A) (Takeda y cols., 1991; Hopkins y cols., 1991; Gerard y cols., 1991) y cuando se compara entre los receptores Nk1a/Nk1b la homología es del 75% (Tabla 12A). Los dominios transmembrana (TM) y las regiones del lazo extracelular (EL) muestran una alta homología entre el pez cebra y el ser humano (Takeda y cols., 1991; Hopkins y cols., 1991) (Tabla 12B), mientras que las regiones de los lazos intracelulares (ILs) y la región N-terminal muestran una menor homología.

### **5.5.2 La filogenia de Nk1a y N1b muestra que el pez cebra se alinea al igual que sus ortólogos**

Los árboles filogenéticos (de las secuencias de aminoácidos) de los receptores NK utilizando el método NJ y ML mostró una clara alineación entre los receptores NK1, NK2 y NK3 con respecto a sus ortólogos de diferentes especies (Fig. 55A y B). Los receptores Nk1a y Nk1b estaban alineados en el mismo grupo del receptor NK1 de otras especies, lo que sugiere que estos receptores son genes duplicados de un gen común ancestral. Además, no hemos encontrado diferencias significativas cuando los árboles filogenéticos se realizaron usando los nucleótidos en lugar de secuencias de amino ácidos (datos no mostrados). De acuerdo con el método NJ (Fig. 55A), los receptores NK1 y NK3 se agruparon juntos (se originaron de una misma rama común) y los receptores NK2 se separaron de los receptores NK1/NK3 durante un período evolutivo temprano, mientras que en el caso del

método ML (Fig. 55B) los receptores NK2 y NK3 fueron agrupados y el receptor NK1 se separó de los receptores NK2/NK3. Esta discordancia sería en cierta manera normal, desde que cada método de filogenia emplea algoritmos diferentes para generar los árboles filogenéticos. Por ello incluso se sugieren emplear dos o más análisis filogenético de los genes. Sin embargo, a pesar de la discordancia mencionada, una característica común es el hecho de que los árboles filogenéticos generados con los métodos NJ y ML (Fig. 3A y B) muestran que estos receptores tuvieron un origen monofilético, ya que los tres receptores de NK derivan de un gen común (Pennefather, 1998a). En los vertebrados hay tres receptores de neuroquinina (NK1, NK2 y NK3) que se originaron a lo largo de la evolución por la duplicación de un único receptor ancestral (Pennefather, 1998a). Además, los árboles filogenéticos generados por NJ sugieren que los receptor NK (relacionado con el proceso del dolor) de los mamíferos y los peces cebrá se originaron antes del desarrollo de los receptores opioides (receptores relacionados con la analgesia) a lo largo de la evolución. Los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1, ZfDOR2 y ZfKOR) del pez cebrá fueron utilizados como un grupo externo, ya que también pertenecen a la superfamilia de GPCR al igual que los receptores de neurocinina (Barrallo y cols., 1998a, Barrallo y cols., 1998b; Alvarez y cols., 2006; Pinal-Seoane y cols., 2006; Herrero-Turrión y Rodríguez, 2008) y están involucrados en los procesos de analgesia (Thota y cols., 2011; Sarzi-Puttini y cols., 2012).

### **5.5.3 Expresión temporal y espacial de los receptores *nk1a* y *nk1b* durante la embriogénesis**

El estudio a lo largo de las varias etapas de desarrollo del pez cebrá nos ha permitido observar por qPCR que la expresión de *nk1a* (Fig. 56A) y *nk1b* (Fig. 56B) se incrementó de 19 a 72 hpf, de acuerdo con la aparición de las primeras contracciones no coordinadas (19 hpf), la puesta en marcha funcional del circuito

motor sensorial (24 hpf), una respuesta coherente a los estímulos táctiles (27 hpf), frecuencia más corta de duración de los movimientos espontáneos (30 hpf), persistencia de las respuestas al estímulo (36 hpf), respuestas rápidas y vigorosas al tacto (42 hpf), y respuestas de escape más rápidas a los estímulos táctiles que en los observados en los estadios más tempranos (48-72 hpf) (Kimmel y cols., 1995). Estas observaciones son similares a las encontradas en la expresión de la SP (Fig. 45). Por otra parte, de acuerdo con nuestros experimentos tanto *nk1a* (Fig. 58A y 60A) y *nk1b* (Fig. 59A y 61A) se expresan en los somitas. La distribución de los receptores NK1 del pez cebra en somitas y su aumento progresivo en su expresión de mRNA sugiere que el receptor NK1 puede tener un papel en la regulación final de los procesos de miogénesis en las diferentes etapas de la embriogénesis y por lo tanto podría ser utilizado como un marcador precoz de la miogénesis (Vannucchi y cols., 1997). Además, el receptor NK1 podría ser importante en el desarrollo neural de la médula espinal, ya que se observó que *Nk1b* (Fig. 59A y C) expresión en la médula espinal. Este hallazgo está de acuerdo con los estudios en los que el receptor NK1 fue encontrado en la placa del suelo (Heath y cols., 1995), lo que sugiere que el receptor NK1 es fundamental para el destino de las células neurales en la médula espinal embrionaria. Aunque, la homología que *Nk1a* y *Nk1b* comparten (75%) a lo largo de su secuencia de amino ácidos (Tabla 12A), la expresión de mRNA de *Nk1a* y *Nk1b* por qPCR durante las diferentes estadios de desarrollo (8-72 hpf) (Fig. 56A y B) fueron diferentes. Así, mientras *nk1a* (Fig. 56A) exhibió un progresivo aumento de su expresión desde los estadios más tempranos hasta los estadios más tardíos de desarrollo embrionario del pez cebra, la expresión de su duplicado, *nk1b* (fig. 56B), no siguió una tendencia de expresión específica. De esta manera, la expresión de *nk1a* sigue un patrón de expresión similar al de la SP, que es su ligando endógeno (en otros

mamíferos) sugiriendo que la SP del pez cebra podría tener una mayor afinidad por el receptor *nk1a* a diferencia del *nk1b* (ya que presenta un patrón de expresión distinto al de la SP). Esta expresión diferente de los receptores duplicados *nk1a* y *nk1b* del pez cebra en cierta medida es similar a la observada en la expresión de los receptores opioide delta del pez cebra que también presentan un duplicado, denominados ZfDOR1 ZfDOR2, donde estos receptores muestran un perfil de expresión diferente durante varias etapas de la embriogénesis (Sánchez-Simón y Rodríguez, 2008), a pesar de que estos receptores opioides delta también presentan una alta homología entre ellos (71%) (Barrallo y cols., 1998b; Pinal-Seoane y cols., 2006). El hecho de que los genes de los receptores *nk1a* y *nk1b* muestran un patrón diferente de expresión sugiere que cada receptor ha seguido un curso diferente a lo largo de la evolución (Pennefather., 2004) que se puede apreciar en el análisis filogenético (Fig. 55A y B). Además, se puede apreciar también en nuestros experimentos mediante qPCR y de ISH, donde *nk1a* y *nk1b* presentan una diferente distribución temporal (Fig. 56A vs B) y espacial (Fig. 58A y C vs. 59A y C). Estos hallazgos sugieren que estos receptores duplicados *Nk1a* y *Nk1b* tienen diferentes funciones durante el desarrollo embrionario.

Una característica compartida entre *nk1a* y *nk1b* es que ambos se expresan en niveles altos a las 72 hpf, la expresión de *nk1a* es de casi tres veces mayor con respecto a la de *nk1b* (Fig. 56A y B). Esto indica que a las 72 hpf *nk1a* podría tener un rol importante con respecto a *nk1b* y/o que este último receptor tendría acciones complementarias a las que presenta *nk1a*, desde que una sub-functionalización se produce después de un evento de duplicación de genes (Postlethwait, 2007).

En los estudios de hibridación in situ se demuestra que *nk1a* (Fig. 58A, C y E) y *nk1b* (Fig. 59A, C y E) se expresan principalmente a las 24 hpf en el SNC (telencéfalo, mesencéfalo, diencéfalo, el hipotálamo y el cerebelo) y a nivel

periférico (somitas), con la diferencia que *nk1b* también se expresa en la médula espinal (Fig. 59 A y C). La expresión de *nk1b* en la médula espinal es consistente con los hallazgos de la expresión del receptor NK1 (mRNA) en la médula espinal de ratas (Gamboa-Esteves y cols., 2004; Mccarson y Krause, 1994; Mccarson y Krause, 1994; Mccarson, 1999; Todd y cols., 2002), lo que sugiere que Nk1b en la médula espinal podría desempeñar un papel importante durante el desarrollo en comparación con el receptor Nk1a. A las 48 hpf, la expresión de mRNA de Nk1a (Fig. 60A, C y E) y Nk1b (Fig. 61A, C y E) se observó en casi las mismas regiones que a las 24 hpf y adicionalmente, tanto *nk1a* (Fig. 60A, y C) y *nk1b* (Fig. 61A y C) se expresaron en el corazón y la notocorda (expresión tenue). Este hallazgo implica una función relevante del sistema de las taquicininas en el desarrollo del tubo neural (van Straaten y cols., 1985; Placzek y cols., 1993; Le Dourian y cols., 1998; Teillet y cols., 1998; Cleaver y Krieg, 2001). Así, los cambios en los niveles de expresión de *nk1a* y *nk1b* podría afectar al patrón de desarrollo de los tejidos del ectodermo, mesodermo y endodermo (por ejemplo, el tubo neural y sus derivados somáticos y el sistema digestivo). De acuerdo a la hibridación in situ (ISH) (empleando las ribosondas de los receptores opioides) la exposición de los embriones a la cocaína no indujo cambios consistentes en la expresión de *nk1a* (Fig. 58B, D y F vs. 58A, C y E) y *nk1b* (Fig. 59B, D y F vs. 59A, C y E) en el SNC ni en la periferia a las 24 hpf. Asimismo, a las 48 hpf la exposición a cocaína no indujo ningún cambio en la distribución espacial de *nk1a* (Fig. 60B, D y F vs. la Fig. 60A, C y E) ni de *nk1b* (Fig. 61B, D y F vs la Fig. 60A, C y E) mediante la ISH. Estas observaciones no están de acuerdo con los resultados observados por qPCR, donde encontramos un incremento y disminución de *nk1a* y *nk1b*, respectivamente (Fig. 62A y B). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la ISH es una técnica cualitativa mientras que la qPCR es cuantitativo (también

mencionado en la sección de discusión de la SP).

La expresión de *nk1a* y *nk1b* en el SNC y la periferia demuestra que estos genes juegan un papel crucial durante el desarrollo del pez cebra y por lo tanto una alteración de estos genes producidos por la cocaína puede tener consecuencias durante el desarrollo embrionario o durante los procesos biológicos de la vida adulta de los organismos, así como, los procesos fisiológicos y patológicos en el que está implicado el sistema de las taquicininas como: contracción del músculo liso (Meini y cols., 1994), la transmisión sináptica (Jessell e Iversen, 1977; Bie y Zhao, 2011), inflamación neurogénica (Patacchini y Maggi, 1995; Boot y cols., 2007; Li y cols., 2011; Cipriani y cols., 2011), adicción (Tamiya y cols., 1990; Placenza y cols., 2005) y el dolor (Aicher y cols., 2000a; Jessell e Iversen, 1977; Geppetti y cols., 1995; Ang y cols., 2011). De esta manera, los cambios en la expresión de *nk1a* y *nk1b* producidos por la cocaína durante el desarrollo embrionario podrían aumentar la sensibilidad a eventos nocivos o hacer que aumente la sensibilidad a drogas o sustancias adictivas a lo largo de la vida del organismo. La SP es uno de los agonistas preferenciales del receptor NK1, y se ha encontrado que actúan sobre los receptores NK1 en las regiones relacionadas con la recompensa, como en el área tegmental ventral (VTA) (Tamiya y cols., 1990; West y Michael., 1991; Deschamps y Couture, 2005; Lessard y cols., 2009) y en el núcleo *accumbens* NAc (Kalivas y miller, 1984; Elliot y cols., 1986; Mantyh y cols., 1989; Altier y Stewart, 1998). Además, se ha observado que la acción de la SP es similar al que produce la cocaína, ambas sustancias aumentan los niveles del NT dopamina en la hendidura sináptica (Kombian y cols., 2009; Elliot y cols., 1986; Boix y cols., 1992b; Boix y cols., 1992b). Esto muestra que el sistema de las taquicininas juega un papel clave en el proceso de la adicción a la cocaína (Commons, 2010).

#### **5.5.4 El silenciamiento de los receptores opioides (ZfMOR, ZfDOR1 y ZfDOR2) afecta la expresión de los receptores nk1a y nk1b del pez cebra**

Diversos estudios han descrito que el receptor NK1 (NK1R) y MOR pueden formar heterodímeros en diferentes áreas nociceptivas del cerebro (Aicher y cols., 2000ab) y en células HEK-293 (Pfeiffer y cols., 2003) donde ellos NK1R/MOR interactúan funcionalmente y median la regulación del tráfico de MOR-NK1R (Pfeiffer y cols., 2003; Yu y cols., 2009). La falta o ausencia de MOR o su inhibición por un antagonista de MOR se ha descrito que modula negativamente la expresión del precursor de la SP (preprotaquicinina o Tac1) (Eckersell y Micevych, 1997) y SP (Yoo y cols., 2005). Además, se ha encontrado que la morfina aumenta la expresión de mRNA y la síntesis de proteína de NK1R (Li y cols., 2000; Wan y cols., 2006), y por lo tanto los cambios en el receptor opioide mu se espera que cambie la expresión del receptor NK1. Del mismo modo, los ratones knock-out de la preprotaquicinina (precursor de la SP) puede modular el efecto analgésico de DOR (Guan y cols., 2005). Por otro lado, en los ganglios de la raíz dorsal mRNA de TAC1-MOR y TAC1-DOR mRNA están co-expresados (Minami y cols., 1995). Además, DOR MOR y TAC1 (DOR-MOR-TAC1) coexisten juntos en las neuronas, del ganglio de la raíz dorsal, peptidérgicas pequeñas (Wang y cols., 2010). Además, DOR y NK1R están estrechamente relacionados y recientemente se ha publicado que informado de que los receptores tanto MOR y DOR se expresan en las mismas neuronas peptidérgicas (Beaudry y cols., 2011). En el presente estudio, el silenciamiento de ZfDOR2 y ZfMOR regula la expresión de *nk1a* y *nk1b*, respectivamente (Fig. 63A y B), lo que indica que el sistema de las taquicininas y el sistema opioide están estrechamente interrelacionados en el pez cebra, tal como se encuentra y detallado en los mamíferos (Eckersell y Micevych, 1997; Yoo y cols., 2005; Guan y cols., 2005; Minami y cols., 1995; Wang y cols., 2010). El

silenciamiento de ZfDOR2 disminuye la expresión de *nk1a* (Fig. 63A), mientras que la caída de la ZfMOR induce un aumento en los niveles de expresión de mRNA de *nk1b* (Fig.63B). Este diferente perfil de regulación de los receptores opioides sobre los receptores *nk1a* y *nk1b* podría ser debido al hecho de que ZfMOR esté modulando negativamente la expresión de *nk1b* mientras que ZfDOR regule positivamente la expresión de *nk1a*. Por lo tanto, cuando ZfDOR y ZfMOR son silenciados *nk1a* y *nk1b* alteran su expresión. Además, la heterodimerización de los receptores opioides MOR-DOR (Law y cols., 2005; Gupta et al., 2010) que pueda ocurrir en la neuronas del ganglio de la raíz dorsal (Scherrer et al., 2009) afectaría de manera diferente el perfil de expresión de los receptores de NK1. Teniendo en cuenta los estudios antes mencionados y de acuerdo con nuestros hallazgos, la interrelación de la expresión de NK1, MOR y DOR es una base para la interacción entre el MOR, DOR y NK1R en la modulación de la transmisión nociceptiva de la analgesia. Además, dado que los procesos biológicos y bioquímicos están bastante conservados los vertebrados, creemos que los procesos que hemos visto en el pez cebra también se producen en los mamíferos, específicamente en el ser humano.

#### **5.5.5 Efectos de la cocaína sobre las células HEK-293 transfectadas con Nk1a y Nk1b**

Los receptores Nk1a-GFP y Nk1b-DsRed (acoplados a la proteína verde y roja fluorescente) fueron transfectadas en células humanas HEK-293 ya que estas células no expresan el receptor NK1 ni de humano ni del pez cebra (Nk1a y Nk1b). Nuestros experimentos de PCR reveló que la cocaína induce una marcada disminución en la expresión de mRNA de Nk1a-GFP (Fig. 65A), mientras que en el caso de Nk1b-DsRed la disminución no fue muy pronunciada (Fig. 65B). La posterior cuantificación por qPCR absoluta de los mRNA de Nk1a y Nk1b confirmó fehacientemente la disminución de Nk1a-GFP de manera significativa (Fig. 65) y

también puso de manifiesto una disminución del receptor Nk1b-DsRed (Fig. 13), que de acuerdo a nuestras observaciones por la PCR estándar no fue del todo claro la variación en la expresión de Nk1b-DsRed (Fig. 65B). Estos hallazgos corroboran que la técnica de la PCR cuantitativa absoluta es más precisa que la técnica de PCR convencional. Según nuestros resultados, la disminución en la expresión de mRNA de los receptores de neurocinina del pez cebra debido a los efectos de la cocaína, se debe a los efectos de la cocaína en los procesos de transcripción de *nk1a* y *nk1b*. Estos resultados son similares a la expresión de *nk1a* observado a las 48 hpf de desarrollo embrionario del pez cebra (Fig. 62A), pero en contraste con la expresión de *nk1b* (Fig. 62B). Por lo tanto, nuestros resultados muestran que la cocaína ejerce diferentes acciones en las células humanas y en los embriones del pez cebra, una posible explicación podría ser debido al hecho de que en los organismos íntegros la cocaína debe atravesar diferentes barreras biológicas antes de llegar a sus dianas de acción y ejercer su(s) acción(es). Además, en los organismos íntegros la cocaína es metabolizada y de esta manera se reduce así la cantidad de la cocaína que llega a sus sitios diana. Desde que la cocaína presenta una alta solubilidad en lípidos (Schenker y col., 1993) es posible que una mayor cantidad de cocaína pase a través de la membrana celular (por transporte pasivo) en las células HEK-293 (al ser expuestas estas células a la cocaína) con respecto a los embriones. De esta manera, una mayor cantidad de cocaína estaría afectando la expresión de *nk1a* y *nk1b* en las células HEK-293 en relación al embrión íntegro, lo cual puede explicar las diferencias de expresión de *nk1a* y *nk1b* entre los organismos íntegros y las células de cultivo. A pesar de las diferencias encontradas, uno de los objetivos de la investigación *in vitro* y en los animales es que los resultados encontrados en estos permitan extrapolarse en beneficio de los seres humanos, aunque sin olvidar y tener precaución de las

diferencias que existen entre las células aisladas, los animales y los seres humanos.

En conclusión, los receptores Nk1a y Nk1b del pez cebra son el producto de un gen que se duplicó a lo largo de la evolución. Nk1a y Nk1b muestran características prototípicas de los receptores acoplados a la proteína G. La duplicación de genes del receptor Nk1 del pez cebra puede ofrecer una buena herramienta para el estudio de la fisiología y farmacología de estos receptores y puede permitirnos determinar las dianas específicas que desempeñan un rol crucial en la unión de los fármacos agonistas y antagonistas del receptor NK1. Asimismo, nos puede brindar una información valiosa en los estudios de desensibilización e internalización del receptor NK1. La expresión de los receptores *nk1a* y *nk1b* en el SNC y en la periferia durante las etapas embrionarias del desarrollo muestra que estos receptores de taquicininas ejercerían acciones importantes en el proceso del desarrollo embrionario. Por otro lado, la regulación de los receptores de neurocinina, *nk1a* y *nk1b*, y de los receptores opioides (ZfMOR y ZfDOR1) por la cocaína, tendría repercusiones en el proceso del dolor. Un aumento de los receptores neurocinina y una disminución de los opioides podrían exacerbar el dolor o inducir que una persona sea menos tolerante al dolor (Ver esquema en la figura 68). Como ejemplo ilustrativo, el control del dolor en personas adictas a la cocaína es difícil de conseguir (Stanley y Safford, 2004) y considerando nuestros resultados, la cocaína afectaría la expresión de los receptores relacionados al dolor (NK1) y la analgesia ( $\mu$  y  $\delta$ ), produciendo un desbalance en el proceso del dolor y su tratamiento. Esto indica que los adictos a la cocaína deben mostrar una alteración en la expresión de los receptores opioides (desde que en los animales se ha visto que hay una alteración de éstos receptores) (Unterwald y cols., 1992; Unterwald y cols., 1994; Unterwald, 2001) y también de los receptores de

neuroquinina (NK1) (Commons, 2010). Por lo tanto, el tratamiento del dolor en los adictos a la cocaína debería ser modificado con respecto a las personas que no son adictos a la cocaína. Este es un tema que se debe seguir investigando debido a la escasa literatura que existe sobre este tema.

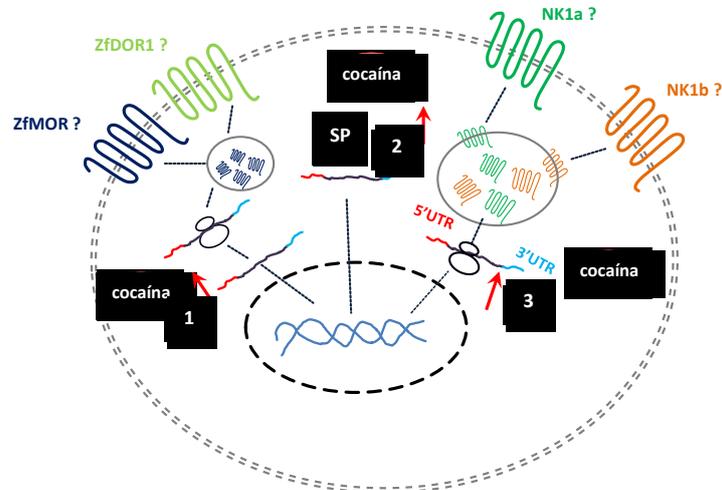


Fig. 68. Esquema que muestra el efecto de la cocaína en la expresión de los receptores opioides, *tac1* y los receptores de neuroquinina. El esquema está basado en los efectos de la cocaína a las 24 hpf de desarrollo embrionario del pez cebra. La cocaína induce un incremento en los niveles de expresión de mRNA de los receptores *zfmor* y *zfdor1* (1), *tac1* (2) y de los receptores de neuroquinina (*nk1a* y *nk1b*) (3). Este incremento de mRNA podría producir una mayor síntesis de proteínas de los receptores opioides y neurocininas, las cuales al insertarse en las membranas celulares ejercerán su acción y dependiendo del grado de expresión y de síntesis de las proteínas sus funciones cambiarán. Si bien es cierto que la cocaína a las 24 hpf induce un incremento de los receptores mencionados en general, esto cobraría más importancia en determinados centros o regiones relacionados al dolor y la adicción. Por ejemplo, si por acción de la cocaína hay una mayor expresión de la SP y su receptor NK1 en el asta dorsal de la médula espinal con respecto a los receptores opioides o viceversa, es de esperar que afecte el proceso de la transmisión del dolor y su tratamiento. Los signos de interrogación indican que hasta la fecha de hoy no poseemos anticuerpos contra estas proteínas y no podemos determinar si un aumento de mRNA se correlaciona con un aumento de síntesis de proteína.

## **Conclusiones**



Los resultados obtenidos durante el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

### **1. Sobre el efecto de la cocaína en la expresión de los receptores opioides durante el desarrollo embrionario**

- ❖ *La expresión de los receptores opioides zfmor, zfdor1 y zfdor2 durante la gastrulación sugiere un rol clave del sistema opioide durante la embriogénesis el cual puede ser alterado por la cocaína*
  
- ❖ *La expresión de los receptores opioides zfmor, zfdor1 y zfdor2 en la notocorda y somitas y sus cambios de expresión por acción de la cocaína afectarán el correcto desarrollo del tubo neural y el músculo.*
  
- ❖ *La diferente variación de los receptores opioides delta (zfdor1 y zfdor2) del pez cebra por acción de la cocaína sugiere un rol neuroprotector de estos receptores durante el desarrollo embrionario.*
  
- ❖ *Los cambios en el perfil de expresión producidos por la cocaína sobre el receptor opioide mu y delta del pez cebra, afectará el proceso del dolor y su tratamiento.*

### **2. Sobre el Efecto de la cocaína en la expresión de dre-let-7d y sus precursores**

- ❖ *La expresión del miRNA dre-let-7d en el SNC y la periferia, similar a los receptores opioides, sugiere una interrelación entre dre-let-7d y los receptores opioides.*

- ❖ *Los receptores opioides *zfmor* y *zfdor1* son dianas del miRNA *dre-let-7d**
- ❖ *El miRNA *dre-let-7d* modula negativamente la expresión de los receptores opioides *zfmor* y *zfdor1*.*
- ❖ *La cocaína afectando la expresión del miRNA *dre-let-7d* y sus precursores, induce cambios en la expresión de los receptores opioides*
- ❖ *Los cambios en la expresión de los receptores opioides y del miRNA *dre-let-7d* y sus precursores son independientes de los efectos de la cocaína sobre la proliferación y apoptosis.*

### **3. Sobre el efecto de la cocaína en la expresión de Tac1, la SP y sus receptores en el pez cebra**

- ❖ *El gen de *Tac1* del pez cebra, clonado por nosotros, presenta un solo gen que lo codifica. Este gen presenta las secuencias de la sustancia P, neuroquinina A y el neuropéptido gamma en su estructura génica, de características similares a otros precursores de TAC1 de otros vertebrados.*
- ❖ *El pez cebra presenta un duplicación del gen NK1 e mamíferos, los cuales los denotados como *Nk1a* y *Nk1b*. Estos receptores duplicados muestran características estructurales semejantes al receptor NK1 de mamíferos.*
- ❖ *La expresión de la sustancia P y sus receptores *nk1a* y *nk1b* a lo largo del desarrollo embrionario, proporciona a este neuropéptido un rol crucial durante la gastrulación, diferenciación del sistema nervioso central y la*

*organogénesis del embrión.*

- ❖ *El similar perfil de expresión de la sustancia P y el receptor nk1a sugiere que este receptor presente mayor afinidad por la sustancia P.*
- ❖ *La regulación del miR-206 sobre la sustancia P en el pez cebra no está conservado al igual que en los mamíferos.*
- ❖ *El efecto de la cocaína sobre la sustancia P y sus receptores nk1a y nk1b puede alterar el normal desarrollo embrionario, incluso en la vida adulta induciendo una mayor sensibilidad a los procesos nocivos o tener una mayor predisposición a la adicción a la cocaína.*
- ❖ *La sustancia P y sus receptores nk1a y nk1b del pez cebra están estrechamente relacionados con los receptores opioides zfmor, zfdor1 y zfdor2. Lo que sugiere una interrelación en el proceso del dolor y su tratamiento.*

Como conclusión general podemos mencionar que la cocaína afecta la expresión de los receptores relacionados con el dolor y la analgesia de una manera dependiente del desarrollo embrionario. Un incremento o disminución de estos receptores puede originar alteración de la sensibilidad a nociceptores, cambios del umbral del dolor, mayor o menor predisposición a los procesos de adicción. Asimismo, determinados miRNAs, como el let-7d y el miR-206 pueden regular la expresión de los receptores opioides y de la sustancia P. Esta regulación endógena también se altera por acción de la cocaína, sugiriendo que la cocaína alterando la expresión de los receptores del dolor y analgesia o induciendo cambios en los miRNAs que regulan estos receptores pueden inducir cambios en los procesos de

---

dolor y analgesia. Estos resultados pueden extrapolarse al tratamiento clínico del dolor en pacientes adictos a la cocaína. La mayoría de pacientes cocainómanos siente más dolor en relación con las personas que no consumen cocaína y su tratamiento es más difícil (Stanley y Safford, 2004). Este cambio de la percepción del dolor puede deberse a los cambios que produce la cocaína en la expresión de los receptores opioides, de la sustancia P y su receptor, y sobre los miRNAs que regulan éstos receptores.

## **Bibliografía**



- Acosta CG, Lopez HS (1999) delta opioid receptor modulation of several voltage-dependent Ca(2+) currents in rat sensory neurons. *J Neurosci* 19:8337-8348.
- Aicher SA, Sharma S, Cheng PY, Liu-Chen LY, Pickel VM (2000a) Dual ultrastructural localization of mu-opiate receptors and substance p in the dorsal horn. *Synapse* 36:12-20.
- Aicher SA, Punnoose A, Goldberg A (2000b) mu-Opioid receptors often colocalize with the substance P receptor (NK1) in the trigeminal dorsal horn. *J Neurosci* 20:4345-4354.
- Akil H, Meng F, Mansour A, Thompson R, Xie GX, Watson S (1996) Cloning and characterization of multiple opioid receptors. *NIDA Res Monogr* 161:127-140.
- Altier N, Stewart J (1998) Dopamine receptor antagonists in the nucleus accumbens attenuate analgesia induced by ventral tegmental area substance P or morphine and by nucleus accumbens amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* 285:208-215.
- Alvarez FA, Rodriguez-Martin I, Gonzalez-Nunez V, de Velasco EM, Gonzalez Sarmiento R, Rodriguez RE (2006) New kappa opioid receptor from zebrafish *Danio rerio*. *Neurosci Lett* 405:94-99.
- Ambrose-Lanci LM, Peiris NB, Unterwald EM, Van Bockstaele EJ (2008) Cocaine withdrawal-induced trafficking of delta-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Brain research* 1210:92-102.
- Ang SF, Mochhala SM, MacAry PA, Bhatia M (2011) Hydrogen sulfide and neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis: involvement of substance P and ERK-NF-kappaB signaling. *PLoS one* 6:e24535.
- Anichtchik OV, Kaslin J, Peitsaro N, Scheinin M, Panula P (2004) Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J Neurochem* 88:443-453.
- Arner S, Meyerson BA (1988) Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain* 33:11-23.
- Asadi S, Alysandratos KD, Angelidou A, Miniati A, Sismanopoulos N, Vasiadi M, Zhang B, Kalogeromitos D, Theoharides TC (2012) Substance P (SP) Induces Expression of Functional Corticotropin-Releasing Hormone Receptor-1 (CRHR-1) in Human Mast Cells. *The Journal of investigative dermatology* 132:324-329.
- Azaryan AV, Clock BJ, Rosenberger JG, Cox BM (1998) Transient upregulation of mu opioid receptor mRNA levels in nucleus accumbens during chronic cocaine administration. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 76:278-283.
- Ballantyne JC, LaForge KS (2007) Opioid dependence and addiction during opioid treatment of chronic pain. *Pain* 129:235-255.
- Ballet S, Feytens D, Buysse K, Chung NN, Lemieux C, Tumati S, Keresztes A, Van Duppen J, Lai J, Varga E, Porreca F, Schiller PW, Vanden Broeck J, Tourwe D (2011) Design of novel neurokinin 1 receptor antagonists based on conformationally constrained aromatic amino acids and discovery of a potent chimeric opioid agonist-neurokinin 1 receptor antagonist. *J Med Chem* 54:2467-2476.
- Bannon MJ, Poosch MS, Haverstick DM, Mandal A, Xue IC, Shibata K, Dragovic LJ (1992) Preprotachykinin gene expression in the human basal ganglia: characterization of mRNAs and pre-mRNAs produced by alternate RNA splicing. *Brain Res Mol Brain Res* 12:225-231.
- Barg J, Simantov R (1989) Developmental profile of kappa, mu and delta opioid receptors in the rat and guinea pig cerebellum. *Dev Neurosci* 11:428-434.

- Barrallo A, Malvar FG, Gonzalez R, Rodriguez RE, Traynor JR (1998a) Cloning and characterization of a delta opioid receptor from zebrafish. *Biochem Soc Trans* 26:S360.
- Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Porteros A, Garcia-Isidoro M, Rodriguez RE (1998b) Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun* 245:544-548.
- Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Alvar F, Rodriguez RE (2000) ZFOR2, a new opioid receptor-like gene from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* 84:1-6.
- Basbaum AI, Fields HL (1984) Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 7:309-338.
- Basbaum AI (1999) Distinct neurochemical features of acute and persistent pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:7739-7743.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139:267-284.
- Beaudry H, Dubois D, Gendron L (2011) Activation of spinal mu- and delta-opioid receptors potently inhibits substance P release induced by peripheral noxious stimuli. *J Neurosci* 31:13068-13077.
- Becker A, Grecksch G, Kraus J, Loh HH, Schroeder H, Holt V (2002) Rewarding effects of ethanol and cocaine in mu opioid receptor-deficient mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365:296-302.
- Beresford IJ, Birch PJ, Hagan RM, Ireland SJ (1991) Investigation into species variants in tachykinin NK1 receptors by use of the non-peptide antagonist, CP-96,345. *Br J Pharmacol* 104:292-293.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.
- Bester H, De Felipe C, Hunt SP (2001) The NK1 receptor is essential for the full expression of noxious inhibitory controls in the mouse. *J Neurosci* 21:1039-1046.
- Bevan S, Yeats J (1991) Protons activate a cation conductance in a sub-population of rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 433:145-161.
- Bie B, Zhao ZQ (2011) Peripheral inflammation alters desensitization of substance P-evoked current in rat dorsal root ganglion neurons. *European journal of pharmacology* 670:495-499.
- Bilkei-Gorzo A, Berner J, Zimmermann J, Wickstrom R, Racz I, Zimmer A (2010) Increased morphine analgesia and reduced side effects in mice lacking the *tac1* gene. *Br J Pharmacol* 160:1443-1452.
- Boghdadi MS, Henning RJ (1997) Cocaine: pathophysiology and clinical toxicology. *Heart Lung* 26:466-483; quiz 484-465.
- Boix F, Huston JP, Schwarting RK (1992) The C-terminal fragment of substance P enhances dopamine release in nucleus accumbens but not in neostriatum in freely moving rats. *Brain research* 592:181-186.
- Boix F, Mattioli R, Adams F, Huston JP, Schwarting RK (1992) Effects of substance P on extracellular dopamine in neostriatum and nucleus accumbens. *European journal of pharmacology* 216:103-107.
- Bolay H, Moskowitz MA (2002) Mechanisms of pain modulation in chronic syndromes. *Neurology* 59:S2-7.

- Boot JD, de Haas S, Tarasevych S, Roy C, Wang L, Amin D, Cohen J, Sterk PJ, Miller B, Paccaly A, Burggraaf J, Cohen AF, Diamant Z (2007) Effect of an NK1/NK2 receptor antagonist on airway responses and inflammation to allergen in asthma. *American journal of respiratory and critical care medicine* 175:450-457.
- Brevig K, Esquela-Kerscher A (2010) The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42:1316-1329.
- Brimijoin S, Lundberg JM, Brodin E, Hokfelt T, Nilsson G (1980) Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. *Brain research* 191:443-457.
- Brown JL, Liu H, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI (1995) Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. *J Comp Neurol* 356:327-344.
- Burcher E (1989) The study of tachykinin receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 16:539-543.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611-622.
- Butour JL, Moisan C, Mazarguil H, Mollereau C, Meunier JC (1997) Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL 1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids. *European journal of pharmacology* 321:97-103.
- Calvino B, Grilo RM (2006) Central pain control. *Joint Bone Spine* 73:10-16.
- Carter MS, Krause JE (1990) Structure, expression, and some regulatory mechanisms of the rat preprotachykinin gene encoding substance P, neurokinin A, neuropeptide K, and neuropeptide gamma. *J Neurosci* 10:2203-2214.
- Cascieri MA, Huang RR, Fong TM, Cheung AH, Sadowski S, Ber E, Strader CD (1992) Determination of the amino acid residues in substance P conferring selectivity and specificity for the rat neurokinin receptors. *Mol Pharmacol* 41:1096-1099.
- Casey G (2011) Pain--the fifth vital sign. *Nurs N Z* 17:24-29.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Chan JS, Lee JW, Ho MK, Wong YH (2000) Preactivation permits subsequent stimulation of phospholipase C by G(i)-coupled receptors. *Mol Pharmacol* 57:700-708.
- Chandrasekar V, Dreyer JL (2009) microRNAs miR-124, let-7d and miR-181a regulate cocaine-induced plasticity. *Mol Cell Neurosci* 42:350-362.
- Chang MM, Leeman SE, Niall HD (1971) Amino-acid sequence of substance P. *Nat New Biol* 232:86-87.
- Chen J (2011) History of pain theories. *Neurosci Bull* 27:343-350.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 44:8-12.
- Chen SR, Sweigart KL, Lakoski JM, Pan HL (2002) Functional mu opioid receptors are reduced in the spinal cord dorsal horn of diabetic rats. *Anesthesiology* 97:1602-1608.
- Cipriani G, Serboiu CS, Gherghiceanu M, Fausone-Pellegrini MS, Vannucchi MG (2011) NK receptors, Substance P, Ano1 expression and ultrastructural features of the muscle coat in Cav-1(-/-) mouse ileum. *Journal of cellular and molecular medicine* 15:2411-2420.

- Cleaver O, Krieg PA (2001) Notochord patterning of the endoderm. *Developmental biology* 234:1-12.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407:1011-1015.
- Commons KG (2010) Neuronal pathways linking substance P to drug addiction and stress. *Brain research* 1314:175-182.
- Conlon JM (1999) Molecular diversity, localization, and biological actions of elasmobranch tachykinins. *The Journal of experimental zoology* 284:535-540.
- Coolen M, Bally-Cuif L (2009) MicroRNAs in brain development and physiology. *Curr Opin Neurobiol* 19:461-470.
- Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA (2004) Cannabinoid/opioid crosstalk in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 16:159-172.
- Corrigall WA, Coen KM (1991) Cocaine self-administration is increased by both D1 and D2 dopamine antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 39:799-802.
- Costigan M, Woolf CJ (2000) Pain: molecular mechanisms. *J Pain* 1:35-44.
- Cui Y, Riedlinger G, Miyoshi K, Tang W, Li C, Deng CX, Robinson GW, Hennighausen L (2004) Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. *Mol Cell Biol* 24:8037-8047.
- Cullen BR (2004) Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 16:861-865.
- Dado RJ, Law PY, Loh HH, Elde R (1993) Immunofluorescent identification of a delta (delta)-opioid receptor on primary afferent nerve terminals. *Neuroreport* 5:341-344.
- Davis-Dusenbery BN, Hata A (2010) Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 148:381-392.
- De Biasi S, Rustioni A (1988) Glutamate and substance P coexist in primary afferent terminals in the superficial laminae of spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7820-7824.
- De Koninck Y, Henry JL (1991) Substance P-mediated slow excitatory postsynaptic potential elicited in dorsal horn neurons in vivo by noxious stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:11344-11348.
- Dempsey D, Jacob P, 3rd, Partridge JC, Jones RT, Panganiban K, Rowbotham MC (1999) Cocaine metabolite kinetics in the newborn. *J Anal Toxicol* 23:24-28.
- Deschamps K, Couture R (2005) The ventral tegmental area as a putative target for tachykinins in cardiovascular regulation. *Br J Pharmacol* 145:712-727.
- Devi BC, Tang TS (2008) Documenting pain as the fifth vital sign: a feasibility study in an oncology ward in Sarawak, Malaysia. *Oncology* 74 Suppl 1:35-39.
- Devillier P, Advenier C, Drapeau G, Marsac J, Regoli D (1988) Comparison of the effects of epithelium removal and of an enkephalinase inhibitor on the neurokinin-induced contractions of guinea-pig isolated trachea. *Br J Pharmacol* 94:675-684.
- Devor M (2008) Nociception in kyoto. *Pain* 140:519-520; author reply 520-511.
- Dey S, Mactutus CF, Booze RM, Snow DM (2007) Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons by altering the Bax/Bcl-2 ratio and through caspase-3

- apoptotic signaling. *Neuroscience* 144:509-521.
- Dhaka A, Uzzell V, Dubin AE, Mathur J, Petrus M, Bandell M, Patapoutian A (2009) TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci* 29:153-158.
- Diana M (2011) The dopamine hypothesis of drug addiction and its potential therapeutic value. *Front Psychiatry* 2:64.
- Diederichs S, Haber DA (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131:1097-1108.
- Dlugos CA, Rabin RA (2003) Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations. *Pharmacol Biochem Behav* 74:471-480.
- D'Mello R, Dickenson AH (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101:8-16.
- Doench JG, Sharp PA (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 18:504-511.
- Dooley K, Zon LI (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 10:252-256.
- Duggan AW, Morton CR (1988) Tonic descending inhibition and spinal nociceptive transmission. *Prog Brain Res* 77:193-211.
- Eckersell CB, Micevych PE (1997) Opiate receptors modulate estrogen-induced cholecystokinin and tachykinin but not enkephalin messenger RNA levels in the limbic system and hypothalamus. *Neuroscience* 80:473-485.
- Ehrensing RH, Michell GF, Kastin AJ (1982) Similar antagonism of morphine analgesia by MIF-1 and naloxone in *Carassius auratus*. *Pharmacol Biochem Behav* 17:757-761.
- Elliott PJ, Nemeroff CB, Kilts CD (1986) Evidence for a tonic facilitatory influence of substance P on dopamine release in the nucleus accumbens. *Brain research* 385:379-382.
- Evans CJ, Keith DE, Jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952-1955.
- Evans AA, Smith ME (1996) Distribution of opioid peptide receptors in muscles of lean and obese-diabetic mice. *Peptides* 17:629-634.
- Fallmar H, Sundstrom G, Lundell I, Mohell N, Larhammar D (2011) Neuropeptide Y/peptide YY receptor Y2 duplicate in zebrafish with unique introns displays distinct peptide binding properties. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 160:166-173.
- Felekkis K, Touvana E, Stefanou C, Deltas C (2010) microRNAs: a newly described class of encoded molecules that play a role in health and disease. *Hippokratia* 14:236-240.
- Fields HL, Levine JD (1984) Pain--mechanics and management. *West J Med* 141:347-357.
- Fishman MC (2001) Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science* 294:1290-1291.
- Fong TM, Yu H, Huang RR, Strader CD (1992a) The extracellular domain of the neurokinin-1 receptor is required for high-affinity binding of peptides. *Biochemistry* 31:11806-11811.
- Fong TM, Yu H, Strader CD (1992b) Molecular basis for the species selectivity of the neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and RP67580. *J Biol Chem* 267:25668-25671.
- Frampton CL, Hughes-Webb P (2011) The measurement of pain. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23:381-386.

- Frisch P, Bilkei-Gorzo A, Racz I, Zimmer A (2010) Modulation of the CRH system by substance P/NKA in an animal model of depression. *Behav Brain Res* 213:103-108.
- Gadd CA, Murtra P, De Felipe C, Hunt SP (2003) Neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the amygdala modulate morphine reward and anxiety behaviors in the mouse. *J Neurosci* 23:8271-8280.
- Gallego MJ, Porayette P, Kaltcheva MM, Meethal SV, Atwood CS (2009) Opioid and progesterone signaling is obligatory for early human embryogenesis. *Stem Cells Dev* 18:737-740.
- Gamboa-Esteves FO, McWilliam PN, Batten TF (2004) Substance P (NK1) and somatostatin (sst2A) receptor immunoreactivity in NTS-projecting rat dorsal horn neurones activated by nociceptive afferent input. *J Chem Neuroanat* 27:251-266.
- Garland AM, Grady EF, Lovett M, Vigna SR, Frucht MM, Krause JE, Bunnett NW (1996) Mechanisms of desensitization and resensitization of G protein-coupled neurokinin1 and neurokinin2 receptors. *Mol Pharmacol* 49:438-446.
- Garret C, Carruette A, Fardin V, Moussaoui S, Peyronel JF, Blanchard JC, Laduron PM (1992) [RP 67580, a potent and selective substance P non-peptide antagonist]. *C R Acad Sci III* 314:199-204.
- Geladopoulos T, Sakellaris N, Vernadakis A (1987) Differential maturation of mu and delta opioid receptors in the chick embryonic brain. *Neurochem Res* 12:279-288.
- George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 275:26128-26135.
- Georgoussi Z, Georganta EM, Milligan G (2012) The other side of opioid receptor signalling: regulation by protein-protein interaction. *Curr Drug Targets* 13:80-102.
- Geppetti P, Bertrand C, Ricciardolo FL, Nadel JA (1995) New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 73:843-847.
- Gerard NP, Bao L, Xiao-Ping H, Gerard C (1993) Molecular aspects of the tachykinin receptors. *Regul Pept* 43:21-35.
- Gerlai R, Lahav M, Guo S, Rosenthal A (2000) Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol Biochem Behav* 67:773-782.
- Gether U, Yokota Y, Emonds-Alt X, Breliere JC, Lowe JA, 3rd, Snider RM, Nakanishi S, Schwartz TW (1993) Two nonpeptide tachykinin antagonists act through epitopes on corresponding segments of the NK1 and NK2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6194-6198.
- Gitter BD, Waters DC, Bruns RF, Mason NR, Nixon JA, Howbert JJ (1991) Species differences in affinities of non-peptide antagonists for substance P receptors. *European journal of pharmacology* 197:237-238.
- Glowinski J (1995) The 'septide-sensitive' tachykinin receptor: still an enigma. *Trends Pharmacol Sci* 16:365-367.
- Goerig M, Bacon D, van Zundert A (2012) Carl Koller, cocaine, and local anesthesia: some less known and forgotten facts. *Reg Anesth Pain Med* 37:318-324.
- Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ, Armstrong AW (2007) *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*: Lippincott Williams & Wilkins
- Goldsmith P (2004) Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* 4:504-512.

- Goldstein RA, DesLauriers C, Burda AM (2009) Cocaine: history, social implications, and toxicity--a review. *Dis Mon* 55:6-38.
- Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci* 20:RC110.
- Gomes I, Gupta A, Filipovska J, Szeto HH, Pintar JE, Devi LA (2004) A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5135-5139.
- Gonzalez Nunez V, Gonzalez Sarmiento R, Rodriguez RE (2003a) Characterization of zebrafish proenkephalin reveals novel opioid sequences. *Brain Res Mol Brain Res* 114:31-39.
- Gonzalez-Nunez V, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE (2003b) Identification of two proopioidmelanocortin genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Res Mol Brain Res* 120:1-8.
- Gonzalez-Nunez V, Toth G, Rodriguez RE (2007) Endogenous heptapeptide Met-enkephalin-Gly-Tyr binds differentially to duplicate delta opioid receptors from zebrafish. *Peptides* 28:2340-2347.
- Gonzalez-Nunez V, Marron Fernandez de Velasco E, Arsequell G, Valencia G, Rodriguez RE (2007) Identification of dynorphin a from zebrafish: a comparative study with mammalian dynorphin A. *Neuroscience* 144:675-684.
- Goodrich PM (1990) Naloxone hydrochloride: a review. *AANA J* 58:14-16.
- Greco SJ, Rameshwar P (2007) MicroRNAs regulate synthesis of the neurotransmitter substance P in human mesenchymal stem cell-derived neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15484-15489.
- Gregori SD, Gregori MD, Ranzani GN, Allegri M, Minella C, Regazzi M (2012) Morphine metabolism, transport and brain disposition. *Metab Brain Dis* 27:1-5.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36:D154-158.
- Grinspoon L, Bakalar JB (1981) Coca and cocaine as medicines: an historical review. *J Ethnopharmacol* 3:149-159.
- Grond S, Meuser T, Pietruck C, Sablotzki A (2002) [Nociceptin and the ORL1 receptor: pharmacology of a new opioid receptor]. *Anaesthesist* 51:996-1005.
- Grzybowski A (2007) [The history of cocaine in medicine and its importance to the discovery of the different forms of anaesthesia]. *Klin Oczna* 109:101-105.
- Guan JS, Xu ZZ, Gao H, He SQ, Ma GQ, Sun T, Wang LH, Zhang ZN, Lena I, Kitchen I, Elde R, Zimmer A, He C, Pei G, Bao L, Zhang X (2005) Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell* 122:619-631.
- Guo S (2004) Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav* 3:63-74.
- Gupta A, Mulder J, Gomes I, Rozenfeld R, Bushlin I, Ong E, Lim M, Maillet E, Junek M, Cahill CM, Harkany T, Devi LA (2010) Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal* 3:ra54.
- Gurtan AM, Lu V, Bhutkar A, Sharp PA (2012) In vivo structure-function analysis of human Dicer reveals directional processing of precursor miRNAs. *RNA* 18:1116-1122.
- Ha M, Pang M, Agarwal V, Chen ZJ (2008) Interspecies regulation of microRNAs and their targets. *Biochim Biophys Acta* 1779:735-742.

- Hall JM, Mitchell D, Morton IK (1994) Typical and atypical NK1 tachykinin receptor characteristics in the rabbit isolated iris sphincter. *Br J Pharmacol* 112:985-991.
- Hamid Q, Belvisi MG, Stretton D, Rohde J, Harmar AJ, Barnes PJ (1991) Localization of beta preprotachykinin mRNA in nodose ganglion. *Neuropeptides* 20:145-150.
- Hammond DL, Wang H, Nakashima N, Basbaum AI (1998) Differential effects of intrathecally administered delta and mu opioid receptor agonists on formalin-evoked nociception and on the expression of Fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 284:378-387.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016-3027.
- Handal KA, Schauben JL, Salamone FR (1983) Naloxone. *Ann Emerg Med* 12:438-445.
- Harmar A, Schofield JG, Keen P (1980) Cycloheximide-sensitive synthesis of substance P by isolated dorsal root ganglia. *Nature* 284:267-269.
- Harrison S, Geppetti P (2001) Substance p. *The international journal of biochemistry & cell biology* 33:555-576.
- Hastrup H, Schwartz TW (1996) Septide and neurokinin A are high-affinity ligands on the NK-1 receptor: evidence from homologous versus heterologous binding analysis. *FEBS Lett* 399:264-266.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y (2003) Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 116:4077-4085.
- Hauser KF, McLaughlin PJ, Zagon IS (1989) Endogenous opioid systems and the regulation of dendritic growth and spine formation. *J Comp Neurol* 281:13-22.
- He Y, Yang C, Kirkmire CM, Wang ZJ (2010) Regulation of opioid tolerance by let-7 family microRNA targeting the mu opioid receptor. *J Neurosci* 30:10251-10258.
- Heath MJ, Lints TJ, Lee CJ, Dodd J (1995) Functional expression of the tachykinin NK1 receptor by floor plate cells in the embryonic rat spinal cord and brainstem. *J Physiol* 486 ( Pt 1):139-148.
- Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahtaroglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B (2008) Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6415-6420.
- Heinrich C (2012) Health literacy: the sixth vital sign. *J Am Acad Nurse Pract* 24:218-223.
- Heinricher MM, Tavares I, Leith JL, Lumb BM (2009) Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev* 60:214-225.
- Herbert MK, Holzer P (2002) [Why are substance P(NK1)-receptor antagonists ineffective in pain treatment?]. *Anaesthesist* 51:308-319.
- Herrero-Turrion MJ, Rodriguez RE (2008) Bioinformatic analysis of the origin, sequence and diversification of mu opioid receptors in vertebrates. *Molecular phylogenetics and evolution* 49:877-892.
- Herz A, Millan MJ (1988) Endogenous opioid peptides in the descending control of nociceptive responses of spinal dorsal horn neurons. *Prog Brain Res* 77:263-273.
- Hill R (2000) NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci* 21:244-246.

- Hokfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B (1975) Substance p: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science* 190:889-890.
- Hokfelt T, Pernow B, Wahren J (2001) Substance P: a pioneer amongst neuropeptides. *J Intern Med* 249:27-40.
- Holden JE, Jeong Y, Forrest JM (2005) The endogenous opioid system and clinical pain management. *AACN Clin Issues* 16:291-301.
- Holst B, Zoffmann S, Elling CE, Hjorth SA, Schwartz TW (1998) Steric hindrance mutagenesis versus alanine scan in mapping of ligand binding sites in the tachykinin NK1 receptor. *Mol Pharmacol* 53:166-175.
- Hong HS, Kim do Y, Yoon KJ, Son Y (2011) A new paradigm for stem cell therapy: Substance-P as a stem cell-stimulating agent. *Archives of pharmacal research* 34:2003-2006.
- Hopkins B, Powell SJ, Danks P, Briggs I, Graham A (1991) Isolation and characterisation of the human lung NK-1 receptor cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 180:1110-1117.
- Hu S, Cheeran MC, Sheng WS, Ni HT, Lokensgard JR, Peterson PK (2006) Cocaine alters proliferation, migration, and differentiation of human fetal brain-derived neural precursor cells. *J Pharmacol Exp Ther* 318:1280-1286.
- Huang SC, Korlipara VL (2010) Neurokinin-1 receptor antagonists: a comprehensive patent survey. *Expert Opin Ther Pat* 20:1019-1045.
- Huang RR, Yu H, Strader CD, Fong TM (1994) Interaction of substance P with the second and seventh transmembrane domains of the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry* 33:3007-3013.
- Hurd YL, Ungerstedt U (1989) Cocaine: an in vivo microdialysis evaluation of its acute action on dopamine transmission in rat striatum. *Synapse* 3:48-54.
- Hussain MU (2012) Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res*.
- Hwang SW, Oh U (2007) Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons. *Curr Opin Anaesthesiol* 20:427-434.
- Hylden JL, Wilcox GL (1981) Intrathecal substance P elicits a caudally-directed biting and scratching behavior in mice. *Brain research* 217:212-215.
- Imam SZ, Duhart HM, Skinner JT, Ali SF (2005) Cocaine induces a differential dose-dependent alteration in the expression profile of immediate early genes, transcription factors, and caspases in PC12 cells: a possible mechanism of neurotoxic damage in cocaine addiction. *Ann N Y Acad Sci* 1053:482-490.
- Izenwasser S, Heller B, Cox BM (1996) Continuous cocaine administration enhances mu- but not delta-opioid receptor-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in nucleus accumbens. *European journal of pharmacology* 297:187-191.
- Jaffe JA, Kimmel PL (2006) Chronic nephropathies of cocaine and heroin abuse: a critical review. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:655-667.
- Jaskiewicz L, Filipowicz W (2008) Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr Top Microbiol Immunol* 320:77-97.
- Jensen TS, Gebhart GF (2008) New pain terminology: a work in progress. *Pain* 140:399-400.
- Jessell TM, Iversen LL (1977) Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature* 268:549-551.

- Johanek LM, Meyer RA, Friedman RM, Greenquist KW, Shim B, Borzan J, Hartke T, LaMotte RH, Ringkamp M (2008) A role for polymodal C-fiber afferents in nonhistaminergic itch. *J Neurosci* 28:7659-7669.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8:275-282.
- Jordan BA, Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399:697-700.
- Josefsson LG (1999) Evidence for kinship between diverse G-protein coupled receptors. *Gene* 239:333-340.
- Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413:203-210.
- Kalivas PW, Miller JS (1984) Substance P modulation of dopamine in the nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 48:55-59.
- Kang HS, Trzaska KA, Corcoran K, Chang VT, Rameshwar P (2004) Neurokinin receptors: relevance to the emerging immune system. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 52:338-347.
- Katz J, Melzack R (1999) Measurement of pain. *Surg Clin North Am* 79:231-252.
- Kent JL, Pert CB, Herkenham M (1981) Ontogeny of opiate receptors in rat forebrain: visualization by in vitro autoradiography. *Brain research* 254:487-504.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:12048-12052.
- Kim E, Clark AL, Kiss A, Hahn JW, Wesselschmidt R, Coscia CJ, Belcheva MM (2006) Mu- and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors. *J Biol Chem* 281:33749-33760.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.
- Kiyama H, Morita Y, Noguchi K, Wang Y, Nakanishi S, Shiotani Y, Tohyama M (1988) Demonstration of rat preprotachykinin A mRNA in the rat trigeminal ganglion by in situ hybridization histochemistry. *J Chem Neuroanat* 1:125-132.
- Kombian SB, Ananthakshmi KV, Zidichouski JA, Saleh TM (2009) Substance P and cocaine employ convergent mechanisms to depress excitatory synaptic transmission in the rat nucleus accumbens in vitro. *The European journal of neuroscience* 29:1579-1587.
- Kondo I, Marvizon JC, Song B, Salgado F, Codeluppi S, Hua XY, Yaksh TL (2005) Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. *J Neurosci* 25:3651-3660.
- Kosik KS, Krichevsky AM (2005) The Elegance of the MicroRNAs: A Neuronal Perspective. *Neuron* 47:779-782.
- Koutsoulidou A, Mastrogiannopoulos NP, Furling D, Uney JB, Phylactou LA (2011) Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC developmental biology* 11:34.
- Krishtal OA, Marchenko SM, Obukhov AG, Volkova TM (1988) Receptors for ATP in rat sensory neurones: the structure-function relationship for ligands. *Br J Pharmacol* 95:1057-1062.
- Krishtal OA, Marchenko SM, Obukhov AG (1988) Cationic channels activated by extracellular ATP in

- rat sensory neurons. *Neuroscience* 27:995-1000.
- Krumins SA, Kim DC, Seybold VS, Larson AA (1989) Modulation of [3H]DAGO binding by substance P (SP) and SP fragments in the mouse brain and spinal cord via MU1 interactions. *Neuropeptides* 13:225-233.
- Krumins SA, Kim DC, Seybold VS, Larson AA (1989) Modulation of [3H]DAGO binding by substance P (SP) and SP fragments in the mouse brain and spinal cord via MU1 interactions. *Neuropeptides* 13:225-233.
- Kuraishi Y, Hirota N, Sugimoto M, Satoh M, Takagi H (1983) Effects of morphine on noxious stimuli-induced release of substance P from rabbit dorsal horn in vivo. *Life sciences* 33 Suppl 1:693-696.
- Kusuda R, Cadetti F, Ravanelli MI, Sousa TA, Zanon S, De Lucca FL, Lucas G (2011) Differential expression of microRNAs in mouse pain models. *Mol Pain* 7:17.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12:735-739.
- Lamberts JT, Jutkiewicz EM, Mortensen RM, Traynor JR (2011) mu-Opioid receptor coupling to Galpha(o) plays an important role in opioid antinociception. *Neuropsychopharmacology* 36:2041-2053.
- Lang CW, Duggan AW, Hope PJ (1991) Analgesic doses of morphine do not reduce noxious stimulus-evoked release of immunoreactive neurokinins in the dorsal horn of the spinal cat. *Br J Pharmacol* 103:1871-1876.
- Langheinrich U (2003) Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays* 25:904-912.
- Latremoliere A, Woolf CJ (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* 10:895-926.
- Law PY, Loh HH (1999) Regulation of opioid receptor activities. *J Pharmacol Exp Ther* 289:607-624.
- Law PY, Erickson-Herbrandson LJ, Zha QQ, Solberg J, Chu J, Sarre A, Loh HH (2005) Heterodimerization of mu- and delta-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. *J Biol Chem* 280:11152-11164.
- Le Douarin NM, Teillet MA, Catala M (1998) Neurulation in amniote vertebrates: a novel view deduced from the use of quail-chick chimeras. *The International journal of developmental biology* 42:909-916.
- Lecci A, Maggi CA (2003) Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opin Ther Targets* 7:343-362.
- Lee Y, Kawai Y, Shiosaka S, Takami K, Kiyama H, Hillyard CJ, Girgis S, MacIntyre I, Emson PC, Tohyama M (1985) Coexistence of calcitonin gene-related peptide and substance P-like peptide in single cells of the trigeminal ganglion of the rat: immunohistochemical analysis. *Brain research* 330:194-196.
- Lee YS, Kim HK, Chung S, Kim KS, Dutta A (2005) Depletion of human micro-RNA miR-125b reveals that it is critical for the proliferation of differentiated cells but not for the down-regulation of putative targets during differentiation. *J Biol Chem* 280:16635-16641.
- Lee CT, Chen J, Hayashi T, Tsai SY, Sanchez JF, Errico SL, Amable R, Su TP, Lowe RH, Huestis MA, Shen J, Becker KG, Geller HM, Freed WJ (2008) A mechanism for the inhibition of neural progenitor cell proliferation by cocaine. *PLoS Med* 5:e117.
- Lepsch LB, Munhoz CD, Kawamoto EM, Yshii LM, Lima LS, Curi-Boaventura MF, Salgado TM, Curi

- R, Planeta CS, Scavone C (2009) Cocaine induces cell death and activates the transcription nuclear factor kappa-B in PC12 cells. *Mol Brain* 2:3.
- Lessard A, Savard M, Gobeil F, Jr., Pierce JP, Pickel VM (2009) The neurokinin-3 (NK3) and the neurokinin-1 (NK1) receptors are differentially targeted to mesocortical and mesolimbic projection neurons and to neuronal nuclei in the rat ventral tegmental area. *Synapse* 63:484-501.
- Lewohl JM, Nunez YO, Dodd PR, Tiwari GR, Harris RA, Mayfield RD (2011) Up-regulation of microRNAs in brain of human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 35:1928-1937.
- Li M, Shang YX, Wei B, Yang YG (2011) The effect of substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration, and cytoplasmic calcium concentration in vitro. *Journal of inflammation (London, England)* 8:18.
- Li X, Feng R, Huang C, Wang H, Wang J, Zhang Z, Yan H, Wen T (2012) MicroRNA-351 regulates TMEM 59 (DCF1) expression and mediates neural stem cell morphogenesis. *RNA Biol* 9.
- Li Y, Tian S, Douglas SD, Ho WZ (2000) Morphine Up-regulates expression of substance P and its receptor in human blood mononuclear phagocytes and lymphocytes. *Cell Immunol* 205:120-127.
- Light AR, Perl ER (1979) Reexamination of the dorsal root projection to the spinal dorsal horn including observations on the differential termination of coarse and fine fibers. *J Comp Neurol* 186:117-131.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433:769-773.
- Liu H, Mazarati AM, Katsumori H, Sankar R, Wasterlain CG (1999) Substance P is expressed in hippocampal principal neurons during status epilepticus and plays a critical role in the maintenance of status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5286-5291.
- Liu JK, Laferriere A, Moss IR (2000) Repeated prenatal cocaine increases met-enkephalin immunoreactivity in respiratory-related medulla of developing swine. *Brain Res Bull* 51:419-424.
- Lloyd SA, Balest ZR, Corotto FS, Smeyne RJ (2010) Cocaine selectively increases proliferation in the adult murine hippocampus. *Neurosci Lett* 485:112-116.
- Loh HH, Liu HC, Cavalli A, Yang W, Chen YF, Wei LN (1998) mu Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain Res Mol Brain Res* 54:321-326.
- Longmore J, Hill RG, Hargreaves RJ (1997) Neurokinin-receptor antagonists: pharmacological tools and therapeutic drugs. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 75:612-621.
- Loonam TM, Noailles PA, Yu J, Zhu JP, Angulo JA (2003) Substance P and cholecystokinin regulate neurochemical responses to cocaine and methamphetamine in the striatum. *Life sciences* 73:727-739.
- Lopez Patino MA, Yu L, Yamamoto BK, Zhdanova IV (2008a) Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. *Physiol Behav* 95:36-47.
- Lopez-Patino MA, Yu L, Cabral H, Zhdanova IV (2008b) Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiol Behav* 93:160-171.
- Lorenz KA, Sherbourne CD, Shugarman LR, Rubenstein LV, Wen L, Cohen A, Goebel JR, Hagenmeier E, Simon B, Lanto A, Asch SM (2009) How reliable is pain as the fifth vital sign? *J Am Board Fam Med* 22:291-298.

- Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG (2008) An NF-kappaB-sensitive micro RNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem* 283:31315-31322.
- Machin KL (2001) Fish, amphibian, and reptile analgesia. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 4:19-33.
- Maekawa K, Minami M, Yabuuchi K, Toya T, Katao Y, Hosoi Y, Onogi T, Satoh M (1994) In situ hybridization study of mu- and kappa-opioid receptor mRNAs in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 168:97-100.
- Maggi CA, Schwartz TW (1997) The dual nature of the tachykinin NK1 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 18:351-355.
- Majumdar S, Grinnell S, Le Rouzic V, Burgman M, Polikar L, Ansonoff M, Pintar J, Pan YX, Pasternak GW (2011) Truncated G protein-coupled mu opioid receptor MOR-1 splice variants are targets for highly potent opioid analgesics lacking side effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:19778-19783.
- Malcangio M, Bowery NG (1999) Peptide autoreceptors: does an autoreceptor for substance P exist? *Trends Pharmacol Sci* 20:405-407.
- Mantyh PW, Gates T, Mantyh CR, Maggio JE (1989) Autoradiographic localization and characterization of tachykinin receptor binding sites in the rat brain and peripheral tissues. *J Neurosci* 9:258-279.
- Marker CL, Lujan R, Colon J, Wickman K (2006) Distinct populations of spinal cord lamina II interneurons expressing G-protein-gated potassium channels. *J Neurosci* 26:12251-12259.
- Martin BJ, Naughton BJ, Thirtamara-Rajamani K, Yoon DJ, Han DD, Devries AC, Gu HH (2011) Dopamine transporter inhibition is necessary for cocaine-induced increases in dendritic spine density in the nucleus accumbens. *Synapse* 65:490-496.
- Martling CR, Theodorsson-Norheim E, Lundberg JM (1987) Occurrence and effects of multiple tachykinins; substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Life sciences* 40:1633-1643.
- Masu Y, Nakayama K, Tamaki H, Harada Y, Kuno M, Nakanishi S (1987) cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. *Nature* 329:836-838.
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383:819-823.
- McCarson KE, Krause JE (1994) NK-1 and NK-3 type tachykinin receptor mRNA expression in the rat spinal cord dorsal horn is increased during adjuvant or formalin-induced nociception. *J Neurosci* 14:712-720.
- McCarson KE (1999) Central and peripheral expression of neurokinin-1 and neurokinin-3 receptor and substance P-encoding messenger RNAs: peripheral regulation during formalin-induced inflammation and lack of neurokinin receptor expression in primary afferent sensory neurons. *Neuroscience* 93:361-370.
- McCarthy L, Szabo I, Nitsche JF, Pintar JE, Rogers TJ (2001) Expression of functional mu-opioid receptors during T cell development. *J Neuroimmunol* 114:173-180.
- McCarthy LE, Nitsche JF, Pintar JE, Rogers TJ (2004) The delta-opioid receptor participates in T-cell development by promoting negative selection. *J Neuroimmunol* 153:91-98.
- McCurley AT, Callard GV (2008) Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female

- differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Mol Biol* 9:102.
- McGuire DB (1984) The measurement of clinical pain. *Nurs Res* 33:152-156.
- McLaughlin PJ, Allar MA (1998a) Preproenkephalin gene expression and [Met5]-enkephalin levels in the developing rat heart. *Brain Res Mol Brain Res* 60:160-167.
- McLaughlin PJ, Wu Y (1998b) Opioid gene expression in the developing and adult rat heart. *Dev Dyn* 211:153-163.
- McLean S, Snider RM, Desai MC, Rosen T, Bryce DK, Longo KP, Schmidt AW, Heym J (1993) CP-99,994, a nonpeptide antagonist of the tachykinin NK1 receptor. *Regul Pept* 46:329-331.
- Mendelson JH, Sholar MB, Mutschler NH, Jaszyna-Gasior M, Goletiani NV, Siegel AJ, Mello NK (2003) Effects of intravenous cocaine and cigarette smoking on luteinizing hormone, testosterone, and prolactin in men. *J Pharmacol Exp Ther* 307:339-348.
- Meng F, Xie GX, Thompson RC, Mansour A, Goldstein A, Watson SJ, Akil H (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9954-9958.
- Mercadante S, Gatti A, Porzio G, Lo Presti C, Aielli F, Adile C, Casuccio A (2012) Dosing fentanyl buccal tablet for breakthrough cancer pain: dose titration versus proportional doses. *Curr Med Res Opin*.
- Merighi A, Polak JM, Gibson SJ, Gulbenkian S, Valentino KL, Peirone SM (1988) Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. *Cell Tissue Res* 254:101-109.
- Meriney SD, Ford MJ, Oliva D, Pilar G (1991) Endogenous opioids modulate neuronal survival in the developing avian ciliary ganglion. *J Neurosci* 11:3705-3717.
- Merskey H (1986) Pain terms—a current list with definitions and notes on usage. *Pain, Suppl. 3 (Part II)* (1986), p. S217
- Merskey, H. and Bogduk, N. (1994) *Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definition of Pain Terms*, 2nd edn, p. 287. IASP Press, Seattle
- Merskey H (2007) The taxonomy of pain. *Med Clin North Am* 91:13-20, vii.
- Merskey H (2009) Nociception in Kyoto. *Pain* 143:159.
- Messlinger K (1997) [What is a nociceptor?]. *Anaesthetist* 46:142-153.
- Millan MJ, Przewlocki R, Millan MH, Herz A (1983) Evidence for a role of the ventro-medial posterior hypothalamus in nociceptive processes in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 18:901-907.
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355-474.
- Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL (1994) Mu- and kappa-opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons. *J Neurosci* 14:5903-5916.
- Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL (1994) mu-Opioid receptor-mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a G(o)-type GTP-binding protein. *J Neurosci* 14:3842-3851.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341:33-38.

- Myohanen TT, Venalainen JI, Garcia-Horsman JA, Mannisto PT (2008) Spatial association of prolyl oligopeptidase, inositol 1,4,5-triphosphate type 1 receptor, substance P and its neurokinin-1 receptor in the rat brain: an immunohistochemical colocalization study. *Neuroscience* 153:1177-1189.
- Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, Suzuki T (2006) Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem* 97:1494-1505.
- Nasevicius A, Ekker SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nature genetics* 26:216-220.
- Navari RM (2004) Aprepitant: a neurokinin-1 receptor antagonist for the treatment of chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Expert Rev Anticancer Ther* 4:715-724.
- Nawa H, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Nakanishi S (1983) Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature* 306:32-36.
- Nawa H, Kotani H, Nakanishi S (1984) Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature* 312:729-734.
- Nestler EJ (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 12:2439-2450.
- Nguyen AT, Marquez P, Hamid A, Kieffer B, Friedman TC, Lutfy K (2012) The rewarding action of acute cocaine is reduced in beta-endorphin deficient but not in mu opioid receptor knockout mice. *European journal of pharmacology* 686:50-54.
- Ninkovic J, Roy S (2011) Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids*.
- Noailles PA, Angulo JA (2002) Neurokinin receptors modulate the neurochemical actions of cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 965:267-273.
- Nordgreen J, Kolsrud HH, Ranheim B, Horsberg TE (2009) Pharmacokinetics of morphine after intramuscular injection in common goldfish *Carassius auratus* and Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat Organ* 88:55-63.
- Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW (2001) Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J Neurosci* 21:RC184.
- Opolka A, Straub RH, Pasoldt A, Grifka J, Grassel S (2012) Substance P and norepinephrine modulate chondrocyte proliferation and apoptosis. *Arthritis and rheumatism*.
- Ostlund E, Von Euler US (1956) Occurrence of a substance P-like polypeptide in fish intestine and brain. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 11:323-325.
- Otsuka M, Yanagisawa M (1990) Pain and neurotransmitters. *Cell Mol Neurobiol* 10:293-302.
- Otsuka M, Yoshioka K (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiological reviews* 73:229-308.
- Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, Lowry PJ (2003) Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6245-6250.
- Page NM (2005) New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides* 26:1356-1368.
- Pan HL, Wu ZZ, Zhou HY, Chen SR, Zhang HM, Li DP (2008) Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 117:141-161.
- Pasquinelli AE, Ruvkun G (2002) Control of developmental timing by micrnas and their targets.

- Annu Rev Cell Dev Biol 18:495-513.
- Pasternak GW, Pan YX (2011) Mix and match: heterodimers and opioid tolerance. *Neuron* 69:6-8.
- Patacchini R, Maggi CA (1995) Tachykinin NK1 receptors mediate both vasoconstrictor and vasodilator responses in the rabbit isolated jugular vein. *European journal of pharmacology* 283:233-240.
- Patacchini R, Lecci A, Holzer P, Maggi CA (2004) Newly discovered tachykinins raise new questions about their peripheral roles and the tachykinin nomenclature. *Trends Pharmacol Sci* 25:1-3.
- Patel L, Lindley C (2003) Aprepitant--a novel NK1-receptor antagonist. *Expert Opin Pharmacother* 4:2279-2296.
- Peng J, Sarkar S, Chang SL (2012) Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend*.
- Pennefather JN, Lecci A, Candenias ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA (2004) Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life sciences* 74:1445-1463.
- Perl ER (2011) Pain mechanisms: a commentary on concepts and issues. *Prog Neurobiol* 94:20-38.
- Perl ER (2007) Ideas about pain, a historical view. *Nat Rev Neurosci* 8:71-80.
- Pert CB, Snyder SH (1973) Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-1014.
- Petitot F, Saffroy M, Torrens Y, Lavielle S, Chassaing G, Loeuillet D, Glowinski J, Beaujouan JC (1992) Possible existence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum. *Peptides* 13:383-388.
- Petersson LM, Sundler F, Danielsen N (2002) Expression of orphanin FQ/nociceptin and its receptor in rat peripheral ganglia and spinal cord. *Brain research* 945:266-275.
- Pfeiffer M, Kirscht S, Stumm R, Koch T, Wu D, Laugsch M, Schroder H, Holt V, Schulz S (2003) Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *J Biol Chem* 278:51630-51637.
- Pichler FB, Laurenson S, Williams LC, Dodd A, Copp BR, Love DR (2003) Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat Biotechnol* 21:879-883.
- Pinal-Seoane N, Martin IR, Gonzalez-Nunez V, de Velasco EM, Alvarez FA, Sarmiento RG, Rodriguez RE (2006) Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish. *J Mol Endocrinol* 37:391-403.
- Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenias ML (2004) mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *European journal of pharmacology* 494:233-239.
- Placenza FM, Vaccarino FJ, Fletcher PJ, Erb S (2005) Activation of central neurokinin-1 receptors induces reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Neurosci Lett* 390:42-47.
- Placzek M, Jessell TM, Dodd J (1993) Induction of floor plate differentiation by contact-dependent, homeogenetic signals. *Development (Cambridge, England)* 117:205-218.
- Plenderleith MB, Haller CJ, Snow PJ (1990) Peptide coexistence in axon terminals within the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Synapse* 6:344-350.
- Porreca F, Tang QB, Bian D, Riedl M, Elde R, Lai J (1998) Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury. *Brain research* 795:197-203.

- Porteros A, Garcia-Isidoro M, Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE (1999) Expression of ZFOR1, a delta-opioid receptor, in the central nervous system of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 412:429-438.
- Postlethwait JH (2007) The zebrafish genome in context: ohnologs gone missing. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 308:563-577.
- Poulin JF, Chevalier B, Laforest S, Drolet G (2006) Enkephalinergic afferents of the centromedial amygdala in the rat. *J Comp Neurol* 496:859-876.
- Radhakrishnan V, Henry JL (1991) Novel substance P antagonist, CP-96,345, blocks responses of cat spinal dorsal horn neurons to noxious cutaneous stimulation and to substance P. *Neurosci Lett* 132:39-43.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123:621-629.
- Rao PP, Mohamed T (2011) Current and emerging "at-site" pain medications: a review. *J Pain Res* 4:279-286.
- Redila VA, Chavkin C (2008) Stress-induced reinstatement of cocaine seeking is mediated by the kappa opioid system. *Psychopharmacology (Berl)* 200:59-70.
- Regoli D, Drapeau G, Dion S, D'Orleans-Juste P (1987) Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life sciences* 40:109-117.
- Regoli D, Drapeau G, Dion S, D'Orleans-Juste P (1987) Pharmacological receptors for substance P and neurokinins. *Life sciences* 40:109-117.
- Regoli D, Boudon A, Fauchere JL (1994) Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacological reviews* 46:551-599.
- Rivas-Boyer AA, Herrero-Turrion MJ, Gonzalez-Nunez V, Sanchez-Simon FM, Barreto-Valer K, Rodriguez RE (2011) Pharmacological characterization of a nociceptin receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *J Mol Endocrinol* 46:111-123.
- Robertson B, Schulte G, Elde R, Grant G (1999) Effects of sciatic nerve injuries on delta -opioid receptor and substance P immunoreactivities in the superficial dorsal horn of the rat. *Eur J Pain* 3:115-129.
- Rodriguez RE, Barrallo A, Garcia-Malvar F, McFadyen IJ, Gonzalez-Sarmiento R, Traynor JR (2000) Characterization of ZFOR1, a putative delta-opioid receptor from the teleost zebrafish (*Danio rerio*). *Neurosci Lett* 288:207-210.
- Rodriguez-Martin I, Herrero-Turrion MJ, Marron Fdez de Velasco E, Gonzalez-Sarmiento R, Rodriguez RE (2007) Characterization of two duplicate zebrafish Cb2-like cannabinoid receptors. *Gene* 389:36-44.
- Roth-Deri I, Green-Sadan T, Yadid G (2008) Beta-endorphin and drug-induced reward and reinforcement. *Prog Neurobiol* 86:1-21.
- Roth-Deri I, Green-Sadan T, Yadid G (2008) Beta-endorphin and drug-induced reward and reinforcement. *Prog Neurobiol* 86:1-21.
- Rupniak NM, Boyce S, Williams AR, Cook G, Longmore J, Seabrook GR, Caesar M, Iversen SD, Hill RG (1993) Antinociceptive activity of NK1 receptor antagonists: non-specific effects of racemic RP67580. *Br J Pharmacol* 110:1607-1613.
- Rupniak NM, Webb JK, Williams AR, Carlson E, Boyce S, Hill RG (1995) Antinociceptive activity of the tachykinin NK1 receptor antagonist, CP-99,994, in conscious gerbils. *Br J Pharmacol* 116:1937-1943.

- Sager JJ, Torres GE (2011) Proteins interacting with monoamine transporters: current state and future challenges. *Biochemistry* 50:7295-7310.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4:406-425.
- Sanchez-Simon FM, Zhang XX, Loh HH, Law PY, Rodriguez RE (2010) Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b. *Mol Pharmacol* 78:935-942.
- Sanchez-Simon FM, Rodriguez RE (2008) Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience* 151:129-137.
- Sargeant TJ, Day DJ, Mrkusich EM, Foo DF, Miller JH (2007) Mu opioid receptors are expressed on radial glia but not migrating neuroblasts in the late embryonic mouse brain. *Brain research* 1175:28-38.
- Sarzi-Puttini P, Vellucci R, Zuccaro SM, Cherubino P, Labianca R, Fornasari D (2012) The appropriate treatment of chronic pain. *Clin Drug Investig* 32 Suppl 1:21-33.
- Schaefer A, Im HI, Veno MT, Fowler CD, Min A, Intrator A, Kjemis J, Kenny PJ, O'Carroll D, Greengard P (2010) Argonaute 2 in dopamine 2 receptor-expressing neurons regulates cocaine addiction. *J Exp Med* 207:1843-1851.
- Schedlowski M, Fluge T, Richter S, Tewes U, Schmidt RE, Wagner TO (1995) Beta-endorphin, but not substance-P, is increased by acute stress in humans. *Psychoneuroendocrinology* 20:103-110.
- Schenker S, Yang Y, Johnson RF, Downing JW, Schenken RS, Henderson GI, King TS (1993) The transfer of cocaine and its metabolites across the term human placenta. *Clin Pharmacol Ther* 53:329-339.
- Scherer LJ, Rossi JJ (2003) Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol* 21:1457-1465.
- Scherrer G, Befort K, Contet C, Becker J, Matifas A, Kieffer BL (2004) The delta agonists DPDPE and deltorphin II recruit predominantly mu receptors to produce thermal analgesia: a parallel study of mu, delta and combinatorial opioid receptor knockout mice. *The European journal of neuroscience* 19:2239-2248.
- Schiller PW (2010) Bi- or multifunctional opioid peptide drugs. *Life sciences* 86:598-603.
- Schindler CW, Goldberg SR (2012) Accelerating cocaine metabolism as an approach to the treatment of cocaine abuse and toxicity. *Future Med Chem* 4:163-175.
- Schmitt KC, Reith ME (2010) Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1187:316-340.
- Schneider SP, Eckert WA, 3rd, Light AR (1998) Opioid-activated postsynaptic, inward rectifying potassium currents in whole cell recordings in substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol* 80:2954-2962.
- Schroeder JA, Niculescu M, Unterwald EM (2003) Cocaine alters mu but not delta or kappa opioid receptor-stimulated in situ [<sup>35</sup>S]GTPgammaS binding in rat brain. *Synapse* 47:26-32.
- Schuller AG, King MA, Zhang J, Bolan E, Pan YX, Morgan DJ, Chang A, Czick ME, Unterwald EM, Pasternak GW, Pintar JE (1999) Retention of heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nat Neurosci* 2:151-156.
- Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5:R13.

- Seybold VS (2009) The role of peptides in central sensitization. *Handbook of experimental pharmacology*:451-491.
- Shang EH, Zhdanova IV (2007) The circadian system is a target and modulator of prenatal cocaine effects. *PloS one* 2:e587.
- Shigemoto R, Yokota Y, Tsuchida K, Nakanishi S (1990) Cloning and expression of a rat neuromedin K receptor cDNA. *J Biol Chem* 265:623-628.
- Shimada S, Inagaki S, Kubota Y, Kito S, Shiotani Y, Tohyama M (1987) Coexistence of substance P- and enkephalin-like peptides in single neurons of the rat hypothalamus. *Brain research* 425:256-262.
- Shippenberg TS, Zapata A, Chefer VI (2007) Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. *Pharmacol Ther* 116:306-321.
- Shults CW, Quirion R, Chronwall B, Chase TN, O'Donohue TL (1984) A comparison of the anatomical distribution of substance P and substance P receptors in the rat central nervous system. *Peptides* 5:1097-1128.
- Simon EJ, Hiller JM, Edelman I (1973) Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:1947-1949.
- Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, Le Meur M, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL (1998) Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J* 17:886-897.
- Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG (2005) Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *The European journal of neuroscience* 21:1469-1477.
- Smith MT (2000) Neuroexcitatory effects of morphine and hydromorphone: evidence implicating the 3-glucuronide metabolites. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27:524-528.
- Sneddon LU (2003) Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain research* 972:44-52.
- Sneddon LU (2004) Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 46:123-130.
- Sneddon LU (2009) Pain perception in fish: indicators and endpoints. *ILAR J* 50:338-342.
- Snider BJ, Choi DW (1996) Heat stress reduces glutamate toxicity in cultured neurons without hsp70 expression. *Brain research* 729:273-276.
- Snider WD, McMahon SB (1998) Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20:629-632.
- Snijdelaar DG, Dirksen R, Slappendel R, Crul BJ (2000) Substance P. *Eur J Pain* 4:121-135.
- Snijdelaar DG, Dirksen R, Slappendel R, Crul BJ (2000) Substance P. *Eur J Pain* 4:121-135.
- Snook LA, Milligan G, Kieffer BL, Massotte D (2006) Mu-delta opioid receptor functional interaction: Insight using receptor-G protein fusions. *J Pharmacol Exp Ther* 318:683-690.
- Soderman AR, Unterwald EM (2008) Cocaine reward and hyperactivity in the rat: sites of mu opioid receptor modulation. *Neuroscience* 154:1506-1516.
- Somaini L, Donnini C, Raggi MA, Amore M, Ciccocioppo R, Saracino MA, Kalluppi M, Malagoli M,

- Gerra ML, Gerra G (2011) Promising medications for cocaine dependence treatment. *Recent Pat CNS Drug Discov* 6:146-160.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 10:1026-1032.
- Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR (1997) Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1544-1549.
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5300-5305.
- Spencer RJ, Jin W, Thayer SA, Chakrabarti S, Law PY, Loh HH (1997) Mobilization of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in transfected neuro2a cells by activation of multiple opioid receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 54:809-818.
- Standifer KM, Pasternak GW (1997) G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cell Signal* 9:237-248.
- Stanley AH, Safford MM (2004) Treating chronic pain in the presence of substance abuse. *J Natl Med Assoc* 96:1102-1104.
- Stephan H, Sonntag H, Lange H, Lupke K (1989) [The effect of sufentanil in high doses on hemodynamics and electroencephalography activity in coronary patients]. *Anaesthesist* 38:510-518.
- Sternini C, Su D, Gamp PD, Bunnett NW (1995) Cellular sites of expression of the neurokinin-1 receptor in the rat gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 358:531-540.
- Stolberg VB (2011) The use of coca: prehistory, history, and ethnography. *J Ethn Subst Abuse* 10:126-146.
- Su TP, Hayashi T (2001) Cocaine affects the dynamics of cytoskeletal proteins via sigma(1) receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:456-458.
- Sundelin JB, Provvedini DM, Wahlestedt CR, Laurell H, Pohl JS, Peterson PA (1992) Molecular cloning of the murine substance K and substance P receptor genes. *Eur J Biochem* 203:625-631.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12481-12486.
- Takahashi T, Otsuka M (1975) Regional distribution of substance P in the spinal cord and nerve roots of the cat and the effect of dorsal root section. *Brain research* 87:1-11.
- Takeda Y, Takeda J, Smart BM, Krause JE (1990) Regional distribution of neuropeptide gamma and other tachykinin peptides derived from the substance P gene in the rat. *Regul Pept* 28:323-333.
- Takeda Y, Chou KB, Takeda J, Sachais BS, Krause JE (1991) Molecular cloning, structural characterization and functional expression of the human substance P receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 179:1232-1240.
- Tamiya R, Hanada M, Kawai Y, Inagaki S, Takagi H (1990) Substance P afferents have synaptic contacts with dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat. *Neurosci Lett* 110:11-15.

- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28:2731-2739.
- Tansky MF, Pothoulakis C, Leeman SE (2007) Functional consequences of alteration of N-linked glycosylation sites on the neurokinin 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10691-10696.
- Teillet M, Watanabe Y, Jeffs P, Duprez D, Lapointe F, Le Douarin NM (1998) Sonic hedgehog is required for survival of both myogenic and chondrogenic somitic lineages. *Development (Cambridge, England)* 125:2019-2030.
- Terenius L (1973) Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 32:317-320.
- Terenius L (2000) From opiate pharmacology to opioid peptide physiology. *Ups J Med Sci* 105:1-15.
- Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron* 11:903-913.
- Thota RS, Jain P, Bakshi SG, Dhanve CN (2011) Opioid-prescribing Practices in Chronic Cancer Pain in a Tertiary Care Pain Clinic. *Indian J Palliat Care* 17:222-226.
- Todd AJ, Puskar Z, Spike RC, Hughes C, Watt C, Forrest L (2002) Projection neurons in lamina I of rat spinal cord with the neurokinin 1 receptor are selectively innervated by substance p-containing afferents and respond to noxious stimulation. *J Neurosci* 22:4103-4113.
- Townley-Tilson WH, Callis TE, Wang D (2010) MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 42:1252-1255.
- Trafton JA, Abbadie C, Marchand S, Mantyh PW, Basbaum AI (1999) Spinal opioid analgesia: how critical is the regulation of substance P signaling? *J Neurosci* 19:9642-9653.
- Trafton JA, Basbaum AI (2000) The contribution of spinal cord neurokinin-1 receptor signaling to pain. *J Pain* 1:57-65.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H (2008) Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11:S133-153.
- Trigo JM, Martin-Garcia E, Berrendero F, Robledo P, Maldonado R (2010) The endogenous opioid system: a common substrate in drug addiction. *Drug Alcohol Depend* 108:183-194.
- Tso PH, Wong YH (2003) Molecular basis of opioid dependence: role of signal regulation by G-proteins. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:307-316.
- Ueda H, Inoue M, Mizuno K (2003) New approaches to study the development of morphine tolerance and dependence. *Life sciences* 74:313-320.
- Unterwald EM, Horne-King J, Kreek MJ (1992) Chronic cocaine alters brain mu opioid receptors. *Brain research* 584:314-318.
- Unterwald EM, Rubinfeld JM, Kreek MJ (1994) Repeated cocaine administration upregulates kappa and mu, but not delta, opioid receptors. *Neuroreport* 5:1613-1616.
- Unterwald EM (2001) Regulation of opioid receptors by cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 937:74-92.
- Van Loy T, Vandersmissen HP, Poels J, Van Hiel MB, Verlinden H, Vanden Broeck J (2010) Tachykinin-related peptides and their receptors in invertebrates: a current view. *Peptides* 31:520-524.
- van Straaten HW, Hekking JW, Thors F, Wiertz-Hoessels EL, Drukker J (1985) Induction of an additional floor plate in the neural tube. *Acta morphologica Neerlando-Scandinavica* 23:91-

97.

- Vanegas H, Schaible HG (2004) Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Brain Res Rev* 46:295-309.
- Vannucchi MG, De Giorgio R, Fausone-Pellegrini MS (1997) NK1 receptor expression in the interstitial cells of Cajal and neurons and tachykinins distribution in rat ileum during development. *J Comp Neurol* 383:153-162.
- Venepalli BR, Aimone LD, Appell KC, Bell MR, Dority JA, Goswami R, Hall PL, Kumar V, Lawrence KB, Logan ME, et al. (1992) Synthesis and substance P receptor binding activity of androstano[3,2-b]pyrimido[1,2-a]benzimidazoles. *J Med Chem* 35:374-378.
- Venkatachalam K, Montell C (2007) TRP channels. *Annu Rev Biochem* 76:387-417.
- Wan Q, Douglas SD, Wang X, Kolson DL, O'Donnell LA, Ho WZ (2006) Morphine upregulates functional expression of neurokinin-1 receptor in neurons. *Journal of neuroscience research* 84:1588-1596.
- Wang H, Wessendorf MW (2001) Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol* 429:590-600.
- Wang WX, Rajeev BW, Stromberg AJ, Ren N, Tang G, Huang Q, Rigoutsos I, Nelson PT (2008) The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci* 28:1213-1223.
- Weber ES, 3rd (2011) Fish analgesia: pain, stress, fear aversion, or nociception? *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 14:21-32.
- Wessendorf MW, Dooyema J (2001) Coexistence of kappa- and delta-opioid receptors in rat spinal cord axons. *Neurosci Lett* 298:151-154.
- West CH, Michael RP (1991) Substance P injections into the ventral tegmentum affect unit activity in mesolimbic terminal regions. *Brain Res Bull* 26:229-233.
- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH (2005) MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309:310-311.
- Wilding TJ, Womack MD, McCleskey EW (1995) Fast, local signal transduction between the mu opioid receptor and Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* 15:4124-4132.
- Willis WD, Westlund KN (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14:2-31.
- Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11:228-234.
- Winzer-Serhan UH, Chen Y, Leslie FM (2003) Expression of opioid peptides and receptors in striatum and substantia nigra during rat brain development. *J Chem Neuroanat* 26:17-36.
- Wu ZZ, Chen SR, Pan HL (2004) Differential sensitivity of N- and P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel currents to a mu opioid in isolectin B4-positive and -negative dorsal root ganglion neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 311:939-947.
- Wu Q, Law PY, Wei LN, Loh HH (2008) Post-transcriptional regulation of mouse mu opioid receptor (MOR1) via its 3' untranslated region: a role for microRNA23b. *FASEB J* 22:4085-4095.
- Wu ZZ, Chen SR, Pan HL (2008) Distinct inhibition of voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels by delta-opioid agonists in dorsal root ganglion neurons devoid of functional T-type Ca<sup>2+</sup> currents.

- Neuroscience 153:1256-1267.
- Wu ZZ, Cai YQ, Pan HL (2009) A functional link between T-type calcium channels and mu-opioid receptor expression in adult primary sensory neurons. *J Neurochem* 109:867-878.
- Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O, Strehle M, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R (2007) Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB J* 21:415-426.
- Xu X, Meiler SE, Zhong TP, Mohideen M, Crossley DA, Burggren WW, Fishman MC (2002) Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nature genetics* 30:205-209.
- Yamamizu K, Furuta S, Katayama S, Narita M, Kuzumaki N, Imai S, Nagase H, Suzuki T, Yamashita JK (2011) The kappa opioid system regulates endothelial cell differentiation and pathfinding in vascular development. *Blood* 118:775-785.
- Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species. *RNA* 17:312-326.
- Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6736-6740.
- Yekta S, Shih IH, Bartel DP (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 304:594-596.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17:3011-3016.
- Yokota Y, Sasai Y, Tanaka K, Fujiwara T, Tsuchida K, Shigemoto R, Kakizuka A, Ohkubo H, Nakanishi S (1989) Molecular characterization of a functional cDNA for rat substance P receptor. *J Biol Chem* 264:17649-17652.
- Yoo JH, Cho JH, Lee SY, Loh HH, Ho IK, Jang CG (2005) A lack of mu-opioid receptors modulates the expressions of neuropeptide Y and substance P mRNA. *Neurosci Lett* 384:29-32.
- Yoshida Y, Han B, Mendelsohn M, Jessell TM (2006) PlexinA1 signaling directs the segregation of proprioceptive sensory axons in the developing spinal cord. *Neuron* 52:775-788.
- Yu YJ, Arttamangkul S, Evans CJ, Williams JT, von Zastrow M (2009) Neurokinin 1 receptors regulate morphine-induced endocytosis and desensitization of mu-opioid receptors in CNS neurons. *J Neurosci* 29:222-233.
- Yuferov V, Zhou Y, Spangler R, Maggos CE, Ho A, Kreek MJ (1999) Acute "binge" cocaine increases mu-opioid receptor mRNA levels in areas of the rat mesolimbic mesocortical dopamine system. *Brain Res Bull* 48:109-112.
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386:499-502.
- Zagon IS, McLaughlin PJ (1991) Identification of opioid peptides regulating proliferation of neurons and glia in the developing nervous system. *Brain research* 542:318-323.
- Zahniser NR, Sorkin A (2004) Rapid regulation of the dopamine transporter: role in stimulant addiction? *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:80-91.
- Zeng Y (2009) Regulation of the mammalian nervous system by microRNAs. *Mol Pharmacol* 75:259-264.
- Zhang X, Zeng Y (2010) The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and

- Dicer. *Nucleic Acids Res* 38:7689-7697.
- Zhang Z, Pan ZZ (2010) Synaptic mechanism for functional synergism between delta- and mu-opioid receptors. *J Neurosci* 30:4735-4745.
- Zhang J, Nei M (1997) Accuracies of ancestral amino acid sequences inferred by the parsimony, likelihood, and distance methods. *J Mol Evol* 44 Suppl 1:S139-146.
- Zhang X, Bao L, Shi TJ, Ju G, Elde R, Hokfelt T (1998) Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience* 82:223-240.
- Zheng H, Chu J, Zeng Y, Loh HH, Law PY (2010) Yin Yang 1 phosphorylation contributes to the differential effects of mu-opioid receptor agonists on microRNA-190 expression. *J Biol Chem* 285:21994-22002.
- Zhou W, Li Y, Wang X, Wu L, Wang Y (2011) MiR-206-mediated dynamic mechanism of the mammalian circadian clock. *BMC systems biology* 5:141.
- Zhou R, Yuan P, Wang Y, Hunsberger JG, Elkahloun A, Wei Y, Damschroder-Williams P, Du J, Chen G, Manji HK (2009) Evidence for selective microRNAs and their effectors as common long-term targets for the actions of mood stabilizers. *Neuropsychopharmacology* 34:1395-1405.
- Zhu Y, King MA, Schuller AG, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, Unterwald E, Pasternak GW, Pintar JE (1999) Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron* 24:243-252.
- Zhuo M, Gebhart GF (1990) Characterization of descending inhibition and facilitation from the nuclei reticularis gigantocellularis and gigantocellularis pars alpha in the rat. *Pain* 42:337-350.
- Zhuo M, Gebhart GF (1997) Biphasic modulation of spinal nociceptive transmission from the medullary raphe nuclei in the rat. *J Neurophysiol* 78:746-758.
- Zimmer A, Zimmer AM, Baffi J, Usdin T, Reynolds K, Konig M, Palkovits M, Mezey E (1998) Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2630-2635.