

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

**Efecto de la cocaína sobre el desarrollo y regulación
del sistema dopaminérgico en embriones de pez cebra**

Katherine Barreto Valer

2011

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

Efecto de la cocaína sobre el desarrollo y regulación del sistema dopaminérgico en embriones de pez cebra

Memoria, presentada por Katherine Barreto Valer

para optar al título de Doctor

por la Universidad de Salamanca

Katherine Barreto Valer

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

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado **“Efecto de la cocaína sobre el desarrollo y regulación del sistema dopaminérgico en embriones de pez cebra”**, que presenta la doctorando Dña. Katherine Barreto Valer, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, y en del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 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 14 de Noviembre de 2011.

Fdo. Prof. Raquel E. Rodríguez Rodríguez

Esta tesis está dedicada:

***A mi esposo por su cariño, gran espíritu y
constante apoyo.***

***A mis padres por sus enseñanzas, consejos y
estímulo a seguir siempre adelante.***

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

A la Prof. Raquel E. Rodríguez por su valiosa ayuda, por darme la oportunidad de inmiscuirme en la ciencia, por su confianza brindada durante todo este tiempo, por su apoyo y consejos en el campo científico y también personales, mis más sinceros agradecimientos.

Al doctor Javier Herrero por su amistad y ayuda incondicional brindada en todo momento desde mí llegada.

A todos mis compañeros de laboratorio con quienes he compartido momentos de trabajo y he aprendido un poco más de las cosas que ofrece la ciencia. A la Dra. Verónica Gonzáles por sus consejos, ayuda y sus charlas de ciencia. Al Dr. Ezequiel Marrón por su ayuda y lecciones durante mis primeros instantes en el laboratorio. A la Dra. Fátima Macho por todo el apoyo que me ha proporcionada en la realización del trabajo de la tesis doctoral, por su amistad y ayuda incondicional, a Ada por su alegría y manera de ser, a los nuevos integrantes que se vienen sumando y renovando las ilusiones del grupo del laboratorio 13.

A mis amigas y amigos: a Tao, Yanneri, Blanca, Flora, Verónica, Ernesto, Mauricio, Rosario, con quienes iniciamos este recorrido y aún seguimos en la misma dirección de la investigación, por su amistad y haber compartido momentos inolvidables, gracias por su amistad brindada.

A Roger por su inmenso corazón y enseñarme a ver la vida de otro modo, por los gratos momentos compartidos, y soporte emocional, por su ayuda y apoyo incondicional y por sobretodo su comprensión y paciencia.

A mis padres por todo el esfuerzo que han dedicado a mi formación, por ofrecerlo todo, por querer siempre lo mejor para sus hijas, son mi motivo para seguir adelante. A mis hermanas, Rocío, Giovanna y Patricia, por los buenos momentos compartidos, por su amistad, por apoyo ofrecido y brindado en todo momento. A mis sobrinos por regalarme su cariño inconmensurable y encontrar en cada abrazo y beso un sincero afecto. A Alex, Jan y Felicia.

A mis cuñados, Klaus y Dieter, por su don de persona y su manera de ser, por su hospitalidad y afecto.

Además gracias a:

Gracias a la Agencia Universitaria Iberoamericana de Postgrado (AUIP) por la Beca de Movilidad para estudios de Máster de en la Universidad de Salamanca, para el periodo académico 2008-2009, que se me fue concedida.

Gracias al proyecto de LA MARATÓ TV3 de Barcelona por el contrato ofrecido, el que me ayudo a continuar mis estudios de doctorado durante el 2009-2010.

Gracias al Dr. Luis Fernando Alguacil de la Universidad CEU San Pablo, Madrid-España por proporcionarnos el clorhidrato de cocaína.

Gracias al Dr. Daniel S. Kessler del Departamento de Biología Celular y Desarrollo de la Universidad de Pennsylvania por proporcionarnos las ribosondas del factor de transcripción *Imx1b.1* y *Imx1b.2*.

INDICE

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Adicción	2
1.2. La cocaína como droga de abuso	3
1.3. Mecanismos de acción de la cocaína	6
1.4. Exposición prenatal a cocaína	7
1.5. Sistema dopaminérgico endógeno	8
1.6. Síntesis de la dopamina	10
1.7. Receptores de dopamina	11
1.8. Sistema dopaminérgico en el pez cebra	13
1.9. Factores de transcripción relacionados con el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y la señalización Nodal	16
1.9.1. El receptor hormonal nuclear huérfano Nurr1	17
1.9.2. Pitx3	18
1.9.3. El factor de transcripción Lmx1b	20
1.9.4. La proteína Ortopedia (Otp)	23
1.9.5. Factores de transcripción y su función en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas	24
1.9.6. La señalización Nodal	25
1.10. Regulación transcripcional por los micro RNAs	28
1.11. Modelos animales empleados en la investigación de la biomedicina	31
1.12. Pez cebra como herramienta de estudio	32
1.13. Nomenclatura de los genes y las proteínas	35
2. Hipótesis y Objetivos	37
2.1. Hipótesis general	38
2.2. Objetivo general	38

2.3. Objetivos específicos	38
3. Material y métodos	42
3.1. Mantenimiento y cría de embriones	42
3.2. Exposición de cocaína a los embriones de peces cebra	44
3.3. La extracción de RNA total de embriones de pez cebra	46
3.4. Tratamiento de RNA total con DNasa I	46
3.5. Cuantificación de las muestras de RNA	47
3.6. Obtención de cDNA	47
3.7. Síntesis de cDNA de microRNAs	49
3.8. Tratamiento de cDNA con RNasa A	49
3.9. Reacción en cadena de la polimersa (PCR)	50
3.10. PCR a Tiempo real (qPCR)	53
3.11. Análisis de la expresión génica por qPCR	56
3.12. Hibridación in situ (<i>ISH</i>) en embriones enteros	57
3.13. Inmunohistoquímica (<i>IHC</i>)	58
3.14. Clonación de la región 3'UTR de Pitx3	59
3.15. Microinyección de morfolidos y de DNA	61
3.16. Análisis de las imágenes	64
3.17. Análisis estadístico	64
4. Resultados	66
4.1. Expresión de receptores dopaminérgicos durante el desarrollo embrionario del pez cebra.	69
4.2. Análisis del efecto de la cocaína sobre la expresión de la tirosina hidroxilasa (<i>th</i>) y del transportador de dopamina (<i>dat</i>)	75
4.2.1. Análisis de la expresión de la <i>th</i> por efecto de la cocaína	76
4.2.2. Análisis de la expresión del <i>dat</i> por efecto de la cocaína	78
4.3. Análisis de la expresión de <i>nurr1</i> , <i>pitx3</i> , <i>lmx1b.1</i> , <i>lmx1b.2</i> , <i>otpa</i> ,	79

<i>otpb</i> y <i>ndr2</i> por efecto de la cocaína	
4.3.1. Análisis de la expresión de los factores de transcripción <i>nurr1</i> y <i>pixt3</i> tras la exposición de clorhidrato de cocaína	80
4.3.2. Análisis de la expresión temporal de los factores de transcripción <i>lmx1b.1</i> y <i>lmx1b.2</i> por efecto de la cocaína	82
4.3.3. Distribución del factor de transcripción <i>lmx1b.1</i> y <i>lmx1b.2</i> en embriones de 24 y 48 hpf expuestos a cocaína.	84
❖ Factor de transcripción <i>lmx1b.1</i>	84
❖ Factor de transcripción <i>lmx1b.2</i>	84
4.3.4. Análisis de la expresión de los factores de transcripción <i>otpa</i> y <i>otpb</i> tras la exposición de cocaína	92
4.3.5. Análisis de la expresión de <i>ndr2</i> tras la exposición de cocaína	94
4.4. Efectos del silenciamiento del miR-133b sobre la expresión <i>drd2a</i> y <i>drd2b</i> y del factor de transcripción <i>pitx3</i>	95
4.5. Análisis de la expresión temporal y espacial del miR-133b	98
4.5.1. Análisis de la expresión temporal del miR-133b	98
4.5.2. Distribución del miR-133b en embriones de 24 y 48 hpf expuestos a cocaína.	100
4.6. Estudio de la variación de TH en embriones expuestos a cocaína	104
4.7. Expresión de la th en embriones knockdown de <i>Lmx1b.1</i> y <i>Lmx1b.2</i>	107
4.7.1. Inhibición de los factores de transcripción <i>Lmx1b.1</i> y <i>Lmx1b.2</i> por la microinyección de morfolidos	107
4.8. Expresión del gen <i>nurr1</i> en embriones knockdown de <i>Lmx1b.1-2</i>	109
4.9. Inhibición de los factores de transcripción <i>Otpa</i> y <i>Otpb</i>	110

5. Discusión

5.1. Expresión de los receptores dopaminérgicos: <i>drd1</i> , <i>drd2a</i> , <i>drd2b</i> y <i>drd3</i> y la implicación de la cocaína durante el desarrollo embrionario del pez cebra	115
---	-----

5.2. Efectos de la cocaína en la expresión de <i>th</i> y <i>dat</i>	123
5.3. Estudio de la variación de la TH en embriones expuestos a cocaína	125
5.4 Análisis de la expresión de <i>nurr1</i> , <i>pitx3</i> , <i>lmx1b.1</i> , <i>lmx1b.2</i> , <i>otpa</i> , <i>otpb</i>	126
Por efecto de la cocaína	
5.5. Efecto de la cocaína en la distribución espacial del factor de transcripción <i>lmx1b.1</i> y <i>lmx1b.2</i> en embriones de 24 y 48 hpf	130
5.6. Silenciamiento (Knockdown) del factor de transcripción <i>Lmx1b</i> y <i>Otp</i>	131
5.7. Efectos de la cocaína en la expresión de <i>ndr2</i>	133
5.8. Efectos de la cocaína en la expresión del miR-133b	134
5.9 Efecto de la cocaína en la distribución espacial del miR-133b en embriones de 24 y 48 hpf	135
5.10. Silenciamiento del miRNA 133b	138
6. Conclusiones	144
8. Anexos	147
7. Bibliografía	154

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

La dopamina es uno de los principales neurotransmisores (NT) catecolaminérgicos del Sistema Nervioso Central (SNC) de los vertebrados. Está implicada en diversas funciones como control de la actividad motora, emoción, sistemas cognitivos, refuerzo positivo, ingesta de alimentos y regulación endocrina (Wise, 2004; Zhou y cols., 2011). La disfunción dopaminérgica se ha relacionado directa o indirectamente con diversas patologías como por ejemplo la enfermedad de Parkinson (Huang y cols., 2011), síndrome de Tourette, esquizofrenia, hiperprolactinemia, depresión y adicción a drogas como a la cocaína (Kelley y Berridge, 2002; Dailly y cols., 2004; Chao y Nestler, 2004; Prakash y cols., 2006; Wightman y cols., 2009; Zhou y cols., 2011). El aumento de la dopamina, en el espacio sináptico, por la inhibición del transportador de la dopamina (DAT) en las neuronas presinápticas, es un mecanismo importante de la acción de la cocaína (Adinoff, 2007; Zhou y cols., 2011; Gardner y cols., 2011), lo cual conlleva a una continua activación de los receptores dopaminérgicos y por lo tanto a una señalización intracelular diferente de lo habitual, alterando de este modo el sistema dopaminérgico (McClung y cols., 2005). Por otro lado, durante el desarrollo embrionario cuando el DAT aún no tiene la función que presenta en el adulto, los niños expuestos de forma prenatal a cocaína presentan déficits neurológicos y cognitivos, incluso con anomalías en el tono muscular y la postura (Hyman, 2008). Puesto que diversas funciones como control de la actividad motora, emoción, cognición están relacionadas con el sistema dopaminérgico (Wise, 2004; Zhou y cols., 2011), la alteración de los factores de transcripción implicados en la formación del sistema dopaminérgico pueden estar alterados por la acción de la cocaína. En mamíferos se han descrito diversos

factores de transcripción relacionados con el desarrollo de las neuronas del sistema dopaminérgico, tales como *Lmx1b* (Smidt y cols., 2000), *Otp* (Acampora y cols., 1999; Wang y Lufkin, 2000), *Nurr1* (Martinat y cols., 2006) y *Pitx3*, incluso este último puede ser regulado por el microRNA 133b (Kim y cols., 2007), es decir que la cocaína puede modular también algunos reguladores de los factores de transcripción. Es muy importante poder determinar cómo la cocaína afecta estos factores de transcripción, así como uno de los reguladores (*miR-133b*) durante el desarrollo embrionario, para lo cual empleamos como modelo de estudio embriones de pez cebra, que simularían la exposición prenatal de cocaína en mamíferos.

1.1. Adicción

La adicción es considerada una enfermedad desde mediados de los años 60 (Leshner, 2000; Clay y cols, 2008) y se define como la necesidad compulsiva a ciertas sustancias psicotrópicas (drogas) con alto potencial de abuso y dependencia sin prestarle atención a las consecuencias negativas que esto conlleva tanto para el individuo como para su entorno (Adinoff, 2004; Clay y cols, 2008). Por otro lado, además de las drogas de abuso es necesario ciertos factores que puedan intervenir en el individuo para que se desarrolle la adicción (Kreek y cols., 2005a; Kreek y cols., 2005b) con todas sus consecuencias, tales como el factor genético, la vulnerabilidad del individuo y la alteración fisiológica causado por la droga que puede ser a nivel molecular, bioquímico, neuroquímico o comportamental y que estos cambios sean persistentes o permanentes (Kreek, 2001; Gardner, 2011).

Durante las últimas décadas se han realizado grandes avances en el conocimiento de las bases neurobiológicas de la adicción, sin embargo existen

aspectos cruciales del proceso adictivo que permanecen todavía sin resolver, como los mecanismos neurobiológicos y psicopatológicos (Corominas-Roso y cols., 2007) que desencadena el consumo crónico de la cocaína.

1.2. La cocaína como droga de abuso

La cocaína es un alcaloide aislado a partir de las hojas de la planta *Erythroxylum coca* (Fig. 1), originaria de Bolivia, Perú, Colombia, Ecuador, Indonesia y en estados africanos (Jaffe y Kimmel, 2006). 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



Fig. 1. Planta de *Erythroxylum coca* cultivada en los andes sudamericanos.

psicoactivos y su uso es propio de su cultura (Pascual, 2001). En los Estados Unidos, a finales del siglo XIX no existían reglas que restringiesen su consumo o venta, se podía encontrar en farmacias, tiendas de comestibles y en diferentes formas como cigarrillos, puros, jarabes, bebidas ligeras (Coca-Cola) y hasta en famosos vinos, pero en 1914 esto fue prohibido (Appelboom, 1991; Das, 1993). Posteriormente, el uso terapéutico legal quedó restringido como anestésico local en otorrinolaringología (Hashiasaki y Johns, 1987) y para la cirugía de ojos (Brick y Erickson, 1998).

La cocaína actualmente es mucho más potente y tiene gran potencial de abuso, adicción y toxicidad con respecto a las producidas en sus inicios, es un poderoso estimulante del SNC, pero de acción corta, siendo en nuestros días una de las drogas de uso recreativo más consumida, y la que más problemas de adicción ocasiona, por lo que es considerada droga de abuso (Adinoff, 2004). 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) y respiratorio (fallo respiratorio global causado por una bronco constricción) (Lizasoáin y cols., 2002).

La cocaína se presenta en dos formas básicamente, la forma ácida o clorhidrato de cocaína y cocaína base libre (Crack) (Jaffel y Kimmel, 2006). El clorhidrato de cocaína se obtiene por tratamiento de la pasta de coca con ácido clorhídrico, que resulta en un polvo blanco cristalino, con sabor amargo que puede inhalarse por vía intranasal (para esnifar), inyectarse vía intravenosa, ingerirse por vía oral, o aplicarse directamente en mucosas donde ejerce un efecto anestésico característico (Lizasoáin y cols., 2002; Jaffel y Kimmel, 2006). La cocaína es una base débil, con un $pK_a = 8,6$, (Fig. 2) que atraviesa rápidamente y eficientemente todas las membranas corporales, como la membrana hematoencefálica y placentaria e incluso llegar a excretarse en la leche materna (Arbeille y cols., 1997; Ursitti y cols., 2001; Lizasoáin y cols., 2002). Asimismo, ante el continuo consumo de cocaína por la embarazada la placenta se convierte en depósito de la cocaína (Ursitti y cols, 2001), lo que afectará el adecuado desarrollo del embrión o feto.

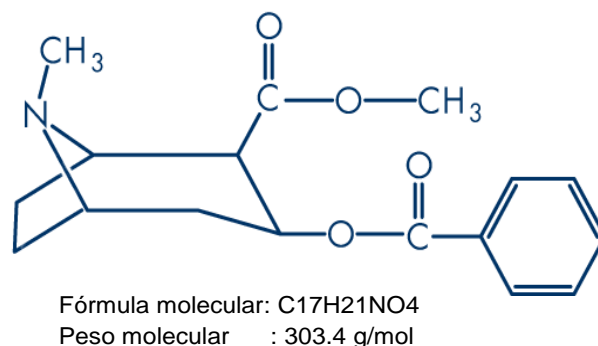


Fig.2 Estructura química de la cocaína, benzoilmetilecgonina, la cual es obtenida a partir de las hojas de coca después de muchos procesos químicos.

El metabolismo de la cocaína tiene lugar a nivel hepático, donde se producen metabolitos inactivos como la benzoilecgonina (45%), metilesterecgonina (45%) (Ambre y cols., 1988) y ecgonina que tienen poco significado clínico en humanos. También, como producto del metabolismo se encuentra norcocaína, que presenta acciones clínicas poco relevantes. Entre 1 a 5 % de la cocaína es excretado por la orina sin cambios (Ambre y cols., 1988).

Por otro lado, el consumo habitual de cocaína incrementa el riesgo de padecer enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (Rivera y cols., 2009), glomerulonefritis, aterogénesis, hipertensión arterial (Jaffel y Kimmel, 2006). Tanto la nicotina como el alcohol potencian los efectos excitatorios de la cocaína sobre el Sistema Nervioso Central, lo que provoca un mayor número de ingresos hospitalarios a causa de una intoxicación aguda por cocaína, que puede provocar incluso la parálisis cerebral, coma y/o muerte del individuo. A pesar de los esfuerzos que la comunidad científica ha hecho en este sentido, aún no se conoce un antídoto eficaz para tratar la intoxicación por la cocaína ni la adicción que su consumo produce.

En los últimos años el consumo de cocaína en EEUU ha disminuido, pero se ha incrementado en Europa, especialmente en España, Italia y Reino Unido. España es el punto de mayor entrada de la cocaína en Europa, y por lo menos donde el 3% de la población la ha consumido (Anual Report of United Nations Office on Drugs and Crime, 2008). Este consumo parece estar incrementándose (Observatorio Español sobre España, OED, 2009), lo que hace necesario políticas adecuadas para frenar este aumento y lo más importante seguir con las investigaciones biomédicas que en futuro, nos brinde la posibilidad de controlar el problema de la adicción que el consumo de la cocaína produce.

1.3. Mecanismos de acción de la cocaína

La cocaína actúa fundamentalmente a nivel del SNC inhibiendo el transportador de neurotransmisores (NTs) como la serotonina, noradrenalina y dopamina (Kreek y cols., 2002; Gainetdinov y cols., 2002; Chen y cols., 2006; Tilley y cols. 2007; Huang y cols., 2009) (Fig. 3), lo que genera un aumento de noradrenalina, serotonina y dopamina en el espacio sináptico, produciéndose por lo tanto una sobre activación de los receptores adrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos respectivamente (Kreek y cols., 2005; Callahan y cols., 1997; Hyman, 1996), incluso la cocaína tiene afinidad por los receptores de serotonina, receptores muscarínicos M1 y M2 y el receptor sigma. Asimismo, el exceso de dopamina que resulta, por el bloqueo del transportador de dopamina por la cocaína (Kreek y cols., 2005; Dackis y Gold, 1985), activaría un receptor dopaminérgico asociado a proteína Gq que aumenta la concentración de calcio intracelular, lo cual puede inducir la disociación del complejo Sigma 1–Ankirina del receptor de IP3 (inositol trifosfato). Este complejo disociado produce cambios en el citoesqueleto y puede afectar la expresión de genes (Su y Hayashi, 2001). Además, la cocaína bloquea los canales de sodio, alterando la propagación de los potenciales de acción, de manera que durante un tiempo, se utilizó como anestésico local (Ruetsch y cols., 2001), pero al aparecer signos de toxicidad por el empleo de la cocaína pusieron en debate su uso clínico y posteriormente la síntesis de nuevos anestésicos locales más seguros y efectivos como la lidocaína, articaína y bupivacaína relegaron casi por completo su uso (Ruetsch y cols., 2001).

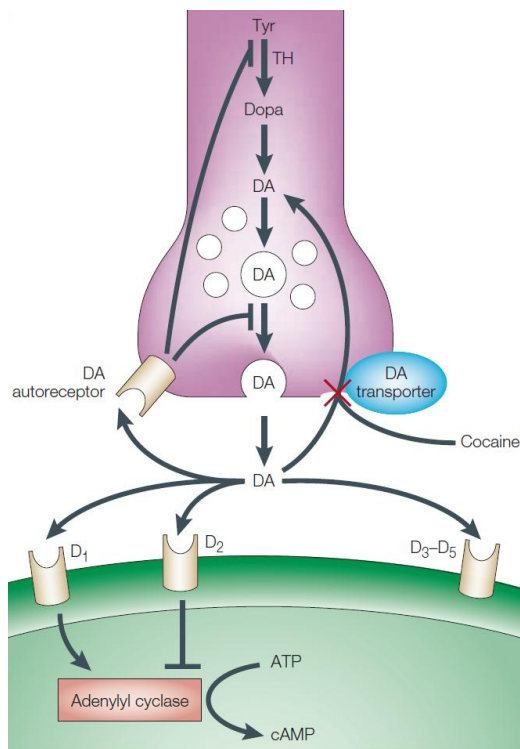


Fig. 3. Aumento de la dopamina en el espacio sináptico, por bloqueo del transportador de dopamina por acción de la cocaína en la neurona presináptica. Este hecho induce que la dopamina, que se encuentra aumentada en el espacio extracelular, active los receptores dopaminérgicos postsinápticos e induzcan la activación e inhibición de la adenilil ciclasa. Asimismo, el incremento de dopamina puede activar a los autoreceptores y producir la disminución de la síntesis de TH y de dopamina. Tomado de Kreek y cols., 2002.

1.4. Exposición prenatal a cocaína

El consumo de cocaína durante el embarazo puede afectar tanto a la placenta como al feto, debido a que la cocaína, por su pequeño tamaño (PM 303,4 g/mol), puede atravesar fácilmente la barrera placentaria y entrar a la circulación fetal (Schenker y cols., 1993), produciendo un riesgo elevado de aborto, muerte fetal intrauterina, partos prematuros, abrupción placentaria, bebés con bajo peso al nacer, anomalías en el hígado, pulmones, genitales, sistema cardiaco (Plessinger y Woods, 1998; Feng, 2005; Messiah y cols., 2011) y neurológico (Delaney-Black y cols., 1996; Eyler y cols., 2009). En modelos animales han documentado una variedad de anomalías morfológicas del cerebro (Lidow y Song, 2001; Stanwood y cols., 2001; Salvatore y cols., 2004) y alterando el mecanismo de señalización dopaminérgica en el cerebro del feto

(Choi y cols., 1998; Jones y cols., 2000; Stanwood y Levitt, 2007; Kubrusly y Bhide, 2010). Estudios detallados han mostrado que la exposición prenatal con cocaína puede tener efectos negativos de larga duración sobre el sistema de atención y cognitivo lo cual es mediado por la corteza prefrontal y otras áreas corticales los cuales expresan receptores dopaminérgicos y reciben diversas proyecciones dopaminérgicas desde el mesencéfalo (Mayes y cols., 2003; Singer y cols., 2004). Diferentes estudios en humanos y en modelos animales, confirman que la exposición prenatal a cocaína resulta en cambios permanentes específicos como comportamental, celular y molecular (Ursitti y cols., 2001; Harvey, 2004; Stanwood y Levitt, 2003). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares, responsables de las anomalías durante el desarrollo del feto, inducidos por la cocaína aún no están muy claros.

1.5. Sistema dopaminérgico endógeno

El sistema dopaminérgico mesencefálico está formado por dos proyecciones principales: el sistema nigroestriatal, que se proyecta desde la zona compacta de la sustancia negra al cuerpo del estriado, y el sistema mesocorticolímbico (Wise, 2004) el cual se origina en el área tegmental ventral (VTA) y se prolonga al núcleo *accumbens*, tubérculo olfatorio, amígdala y a la corteza prefrontal (Nestler, 2001; Koob, 1996; Schmidt, 2000). El sistema mesocorticolímbico (Fig. 4) está relacionada con el comportamiento emocional y el mecanismo de recompensa, por lo que cumple un rol esencial en el desarrollo a la dependencia de drogas como la cocaína, nicotina y opioides (Koob, 1996; Schmidt, 2000; Nestler, 2001; Volkow y Li, 2004; Nestler, 2005; Sulzer, 2011). Un mecanismo que comparte la cocaína con otras sustancias adictivas es que incrementa la dopamina, en el espacio sináptico en el área del núcleo *accumbens* (Fig.5), lo cual induce procesos neurobiológicos y de plasticidad neuronal que

hace que el sujeto siga consumiendo las sustancias adictivas a pesar de conocer los daños que está produciendo (Gardner, 2011; Sulzer, 2011).

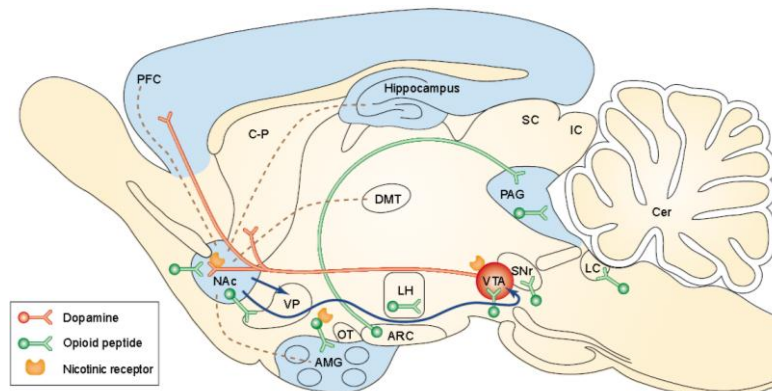


Figura 4. En naranja la vía mesolímbicocortical. Las neuronas dopaminérgicas procedentes del área tegmental ventral (VTA) se proyectan al núcleo accumbens (NAc), amígdala, tubérculo olfatorio, área ventral del caudado-putamen (C-P) y a la corteza pre frontal entre otros. Tomado de Nestler, 2001.

A pesar de que las neuronas dopaminérgicas conforman menos del 1% del total de neuronas del cerebro (Chinta y cols., 2005), desempeñan un rol importante en la regulación de funciones básicas del cerebro, como en el sistema de recompensa, que controla el aprendizaje y muchos comportamientos específicos (Zhou y cols., 2011; Schultz, 1997). La dopamina es uno de los NTs catecolaminérgicos del SNC de los mamíferos que participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendocrina (Zhou y cols., 2004; Wise, 2004; Balldin y cols., 1993).

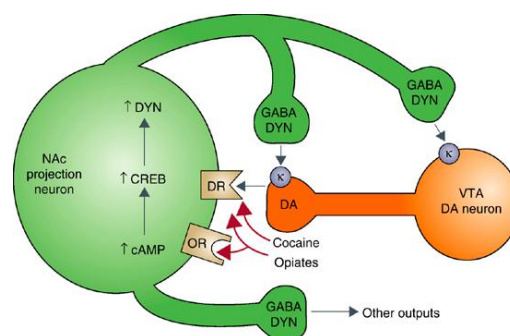


Fig. 5. Retroalimentación entre el NAc y VTA a través de la activación de CREB. La cocaína activa la expresión génica de la prodinorfina en el núcleo accumbens (NAc) y el estriado dorsal a través de la estimulación de los receptores D1 de dopamina, la vía del cAMP y la fosforilación de CREB. La dinorfina resultante se transporta a las terminales presinápticas y sobre las neuronas dopaminérgicas. La dinorfina es agonista de los receptores opiáceos kappa, que al ser activados disminuyen la liberación de dopamina. Tomado de McClung y Nestler, 2006.

1.6. Síntesis de la dopamina.

La síntesis de la dopamina tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables de la síntesis de dopamina, la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o DOPA descarboxilasa (DDC) (Best y cols., 2009; Kreek y cols., 2010). La hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC (Nagatsu y cols., 1964; Best y cols., 2009) y en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina (Levitt y cols., 1965; Jakowec y cols., 2004; Best y cols., 2009). La TH es un péptido de 498 aminoácidos (56 KDa) presente de manera predominante en la fracción citosólica de las terminales catecolaminérgicas. La enzima es una oxidasa que utiliza L-tirosina y oxígeno como sustratos, además de la tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido y formar L-DOPA, luego por acción de la DDC se descarboxila la L-DOPA y se forma la dopamina (Best y cols., 2009) (Fig. 6).

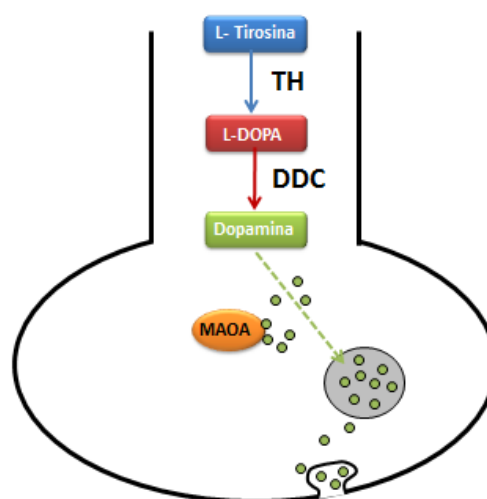


Figura 6. Síntesis de dopamina a partir de la L-tirosina en las neuronas dopaminérgicas. TH: Tirosina hidroxilasa; DDC: Descarboxilasa de aminoácidos aromáticos; MAOA: monoamino oxidasa.

1.7. Receptores de dopamina.

Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de 5 tipos de receptores dopaminérgicos, divididos en dos familias farmacológicas denominadas D1 y D2, miembros de los receptores acoplados a la proteína G con siete dominios transmembrana (Probst y cols., 1992). Los receptores de la familia D1, subtipos D1 y D5, están acoplados a proteínas $G_{\alpha s}$ / $G_{\alpha olf}$ (clases de la proteína G) y estimulan la formación de cAMP (Adenosina monofosfato cíclico) como principal mecanismo de transducción de señales de segundos mensajeros (Zhuang y cols., 2000; Jin y cols., 2001) (Fig. 7)

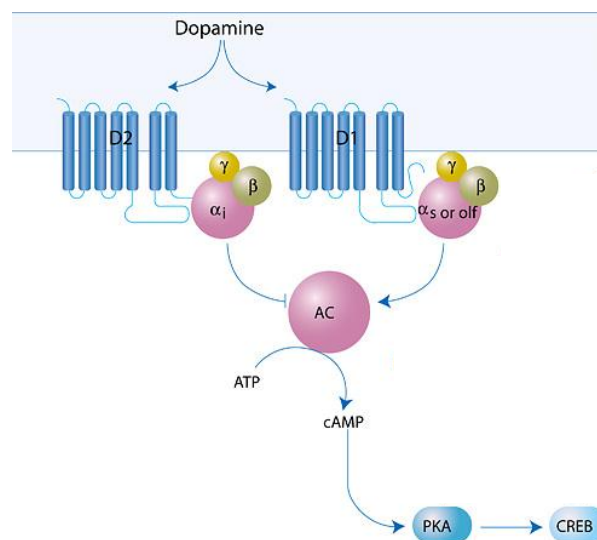


Figura 7. Receptores dopaminérgicos de la familia D1 y D2. El receptor D1 activa la síntesis de cAMP, y este luego activa a la PKA y este último induce la activación de CREB. El receptor D2 inhibe la síntesis de cAMP. AC: adenilato ciclasa; PKA: Proteína quinasa A; CREB: Elemento de respuesta al cAMP.

Los subtipos pertenecientes a la familia D2 (D2, D3 y D4) inhiben la formación de cAMP, activan canales de K^+ y reducen la entrada de iones de Ca^{2+} a través de canales dependientes de voltaje, efectos mediados por las proteínas $G_{\alpha i}$ y $G_{\alpha o}$ (Missale y cols., 1993; 1998). Los receptores dopaminérgicos están conformados por un terminal amino, el cual tiene similar número de aminoácidos para todos los subtipos de receptores, un terminal carboxilo, el cual es 7 veces

más largo para la familia de receptores D1 que para la familia D2, es rico en residuos de serina y treonina, contiene residuos de cisteína que es conservado en todas los receptores acoplados a la proteína G, la familia de receptores D2 tiene el tercer lazo intracelular largo lo cual es característico en receptores que interactúan con la proteína G α_i mientras la familia D1 se caracterizan por tener el tercer lazo más corto como muchos receptores acoplados a la proteína G α_s (Sibley y cols., 1992; Sibley y Monsma, 1992; Sibley y cols., 1992; Civelli y cols., 1993; Namkung y cols., 2009; Beaulieu y cols., 2011) (Fig. 8).

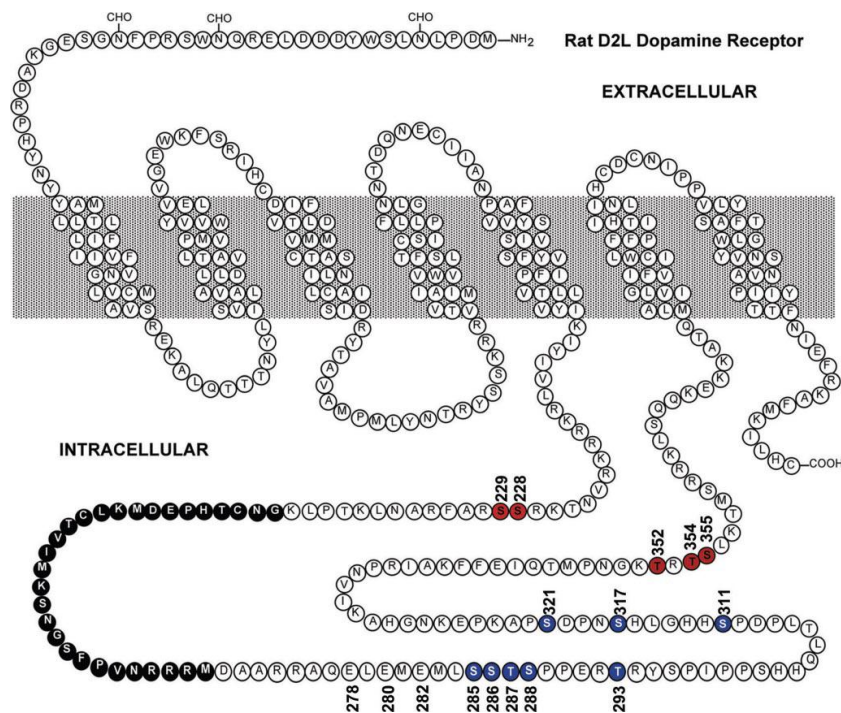


Fig. 8. Estructura del receptor D2 de rata. Existen dos tipos de D2 en ratas, una forma larga y otra corta que se denominan D2L y D2S, respectivamente. Los receptores dopaminérgicos son receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteína G. Los aminoácidos negros representan la secuencia ausente en la forma D2s. Los aminoácidos marcados de rojo son sitios de fosforilación de PKC y los marcados de azul lugares de fosforilación de GRK (Kinasas acopladas a proteína G). Tomado de Namkung y cols., 2009.

Los receptores dopaminérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del SNC (aunque de manera diferencial de acuerdo al subtipo) donde son responsables de las diversas acciones fisiológicas de la dopamina. Los receptores D1 y D2 se encuentran en el núcleo *accumbens*, D1, D2 y D3 en la

corteza prefrontal y D2 presináptico en el VTA como lo explica la figura 9 (Berke y Hyman; 2000).

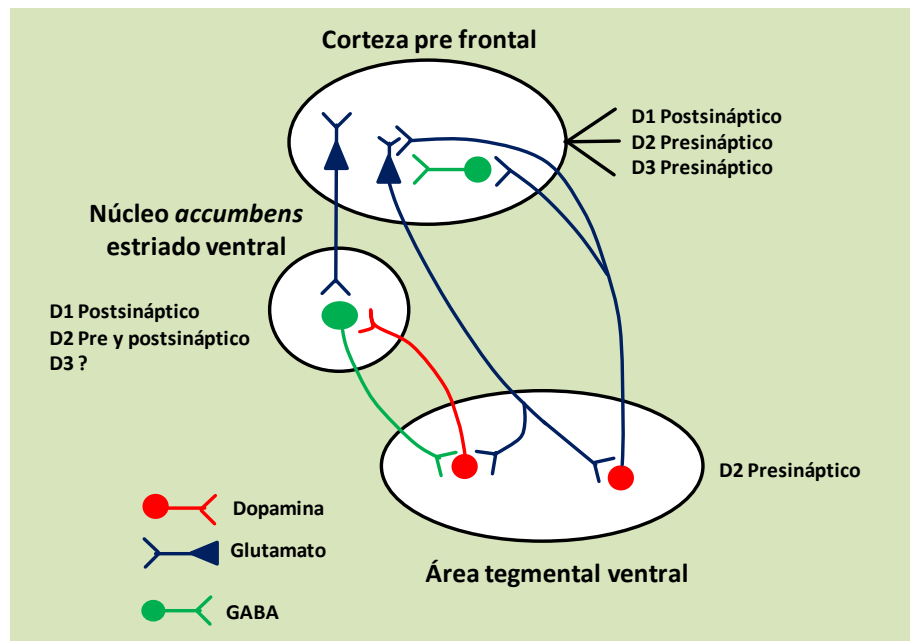


Fig. 9. Distribución de los diferentes tipos de receptores dopaminérgicos en las áreas del SNC implicadas en la adicción y la recompensa. En el núcleo accumbens se pueden encontrar los receptores D1 y D2, mientras que en la corteza prefrontal están D1, D2 y D3, mientras que en el VTA se distribuyen los autoreceptores D2.

1.8. Sistema dopaminérgico en el pez cebra

A diferencia de los mamíferos donde las neuronas dopaminérgicas se desarrollan tanto en el cerebro anterior como en el cerebro medio (Chinta y Andersen, 2005), en los teleosteos, incluido el pez cebra, el sistema dopaminérgico se localiza en el cerebro anterior (telencéfalo y diencéfalo) (Holzschuh y cols., 2001; Smeets y González, 2000). Sin embargo, diversos trabajos de investigación sugieren que algunas de estas neuronas funcionan análogamente o que representan una extensión de las neuronas de la sustancia negra y del área tegmental ventral del mesencéfalo en mamíferos (Reiner y Northcutt, 1992; Puelles y Verney, 1998; Wullmann y Knipp, 2000, Kaslin y Panula, 2001; Rink y Wullmann, 2002), además de identificarse el sistema

dopaminérgico ascendente en teleósteos que va del tubérculo posterior al estriado (Rink y Wulliman, 2001). Los receptores dopaminérgicos en el pez cebra fueron clonados empleando la secuencia de los receptores de dopamina en humanos y se denominan como: Drd1; Drd2a, Drd2b, Drd2l, Drd3, Drd4a, Drd4b y Drd4rs (Boehmler y cols., 2004; Li y cols., 2007; Boehmler y cols., 2007) (Tabla 1).

Receptores dopaminérgicos en el pez cebra	
Humano	Pez cebra
D1	Drd1
	Drd2a
D2	Drd2b
	Drd2l
	Drd3
D3	Drd4a
	Drd4b
	Drd4rs
	D5

Tabla1. Correspondencia de los receptores de dopamina del humano con el pez cebra. La nomenclatura está basada en la clasificación del ZFIN (www.zfin.org). El pez cebra presenta cuatro receptores dopaminérgicos a diferencia de los mamíferos que presentan 5 tipos.

En general, la identidad de las proteínas del pez cebra con respecto a las del humano es menor del 70% (Langheinrich, 2003), pero la conservación de los dominios funcionales, así como las regiones de unión a los substratos o ligandos es muy alto en el pez cebra, cercano al 100% de identidad con la del ser humano, lo que le otorga al pez cebra, ser un modelo muy valioso, para el estudio del descubrimiento de nuevos fármacos, sitios de unión de los fármacos, validación de fármacos y estrategias para el estudio de toxicidad (Langheinrich, 2003). En el

caso específico de los receptores dopaminérgicos del pez cebra, estos presentan una identidad de hasta un 71% entre el receptor Drd1 y el receptor D1 de humano, siendo menores las identidades del resto de receptores dopaminérgicos (Drd2a, Drd2b, Drd2c, Drd3, Drd4a, Drd4b, Drd4rs) del pez cebra con sus equivalentes en humanos, alrededor del 47 a 68 % (Tabla 2).

Pez cebra	Drd1	Drd2a	Drd2b	Drd2l	Drd3	Drd4a	Drd4b	drd4rs
Humano	71	67	69	56	59	49	53	48
Rata	69	66	69	56	56	50	52	50
Ratón	69	69	69	56	54	50	53	51
Mamíferos*	D1	D2			D3	D4		

* Mamíferos: humano, rata y ratón

Tabla 2. Homología en porcentaje de los amino ácidos de los receptores dopaminérgicos del pez cebra con diferentes mamíferos (rata, ratón y humano). En la fila superior se aprecia los receptores dopaminérgicos del pez cebra, mientras que en la parte inferior se disponen los receptores dopaminérgicos de mamíferos. La mayor homología esta entre el receptor Drd1 de pez cebra con el D1 de mamíferos con un 69-71%, seguido de Drd2b (69%)

La tirosina hidroxilasa (TH) es indispensable para la síntesis de dopamina en las neuronas dopaminérgicas en los mamíferos, siendo la primera enzima y la limitante de la síntesis de dopamina (Wallen y Perlmann, 2003; Martinat y cols., 2006). En el pez cebra existen dos duplicados del gen de la TH, Th1 y Th2, que muestran una expresión complementaria (Fig. 10). La Th1 es el que se expresa en mayor proporción en el cerebro, además que su distribución se asemeja a DAT, mientras que Th2 juega un rol menor en la síntesis de dopamina durante el desarrollo temprano (Filippi y cols 2010) y actúa preferentemente en la periferia (Chen y cols., 2009). Por el contrario en estadios más avanzados del pez cebra como en alevines y peces adultos, la Th2 parece contribuir de una manera predominante en el diencéfalo (Filippi y cols., 2010; Yamamoto y cols., 2010).

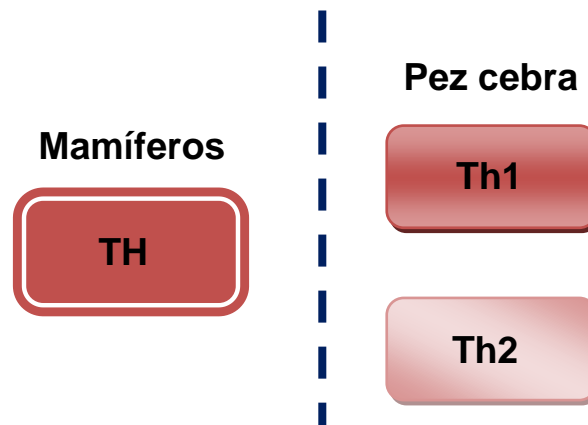


Fig. 10 La tirosina hidroxilasa en el pez cebra se encuentra duplicada, los cuales se denominan Th1 y Th2. La Th1 es la que mayor homología presenta con la TH de mamíferos y la que tiene mayor distribución en estadios tempranos del pez cebra.

1.9. Factores de transcripción relacionados con el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y la señalización Nodal

Los factores de transcripción son proteínas que regulan la transcripción de genes al unirse a secuencias específicas del DNA o a otros factores de transcripción (Jankovic et al., 2005). En mamíferos existen diversos factores de transcripción intracelulares, relacionados con el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y entre ellos tenemos: Lmx1b (Smidt MP y cols., 2000), Otp (Acampora y cols., 1999; Wang y Lufkin, 2000), Nurr1 (Martinat y cols., 2006) y Pitx3 (Kim y cols., 2007). Estos factores están involucrados en la adquisición del fenotipo dopaminérgico, diferenciación maduración y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. Lmx1b (Bergman y cols., 2010; Yan y cols., 2011) y Otp (Wang y Lufkin, 2000) están relacionados con la especificación de los precursores tempranos, mientras que el receptor nuclear huérfano Nurr1 y Pitx3 parecen contribuir posteriormente a la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas en mesencéfalo y diencéfalo (Smits y Smidt, 2006; Martinat y cols., 2006, Shimada y cols., 2009). Esto indica que la transmisión dopaminérgica requiere la expresión coordinada de genes específicos para sintetizar y reciclar al

transmisor, recibir y controlar las señales químicas y para traducir esta información en respuestas celulares relevantes.

1.9.1. El receptor hormonal nuclear huérfano Nurr1. Este receptor fue descubierto en 1992 por Law y cols. (1992), pertenece a la superfamilia de factores de transcripción de dedos de zinc (Ramsden y cols., 2001). Se encuentra expresado en las neuronas mesencefálicas y diencefálicas de la sustancia negra y el área tegmental ventral durante el desarrollo y la adultez (Zetterström y cols., 1996). Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y diencefalo están involucradas en el control voluntario de los movimientos, en la regulación del comportamiento relacionado a las emociones y también son afectados por muchos desórdenes psiquiátricos como la enfermedad de Parkinson, depresión y la esquizofrenia (Nunes y cols., 2003; Smidt y Burbach, 2007)

El rol crítico de Nurr1 en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (mDA) fue observado por la ausencia completa de la TH en embriones de ratones sin la presencia de Nurr1 (Zetterström y cols., 1997; Saucedo-Cardenas y cols., 1998). El mecanismo por el cual Nurr1 induce la TH aún no se ha dilucidado. Interesantemente, otros reguladores del desarrollo de estas neuronas, como los genes *En1/2*, *FoxA2*, *Lmx1b* y *Pitx3* se expresaban en los ratones carentes de Nurr1, sugiriendo la existencia de múltiples vías paralelas que actúan en conjunto para el adecuado desarrollo de las neuronas dopaminérgicas (Saucedo-Cárdenas y cols., 1998; Smidt y cols., 2000; Wallen y cols., 1999; Smits y cols., 2003). Además, otras investigaciones han mostrado que Nurr1 es requerido para el mantenimiento de las neuronas de mDA (Saucedo-Cardenas y cols., 1998; Zhang y cols., 2011) y necesario, además de la TH, para la expresión del transportador vesicular monoaminérgico 2 (VMAT2),

transportador de dopamina (DAT) (Smits y cols., 2003) y el receptor dopaminérgico D2 (Jacobs y cols., 2009). Estas acciones las realiza en conjunto con otro factor de transcripción, el Pitx3. Asimismo, estos factores están relacionados en la diferenciación, crecimiento axonal, patrón neuronal y supervivencia neuronal (Jacobs y cols., 2009a; Jacobs y cols., 2009b) (Fig. 11). Se ha sugerido que la inducción de las neuronas dopaminérgicas por Nurr1 no es suficiente para determinar la diferenciación fenotípica (Kim y cols., 2003). Nurr1 es regulado también por otros factores como el Lmx1a en las neuronas mesencefálicas, puesto que el empleo de RNA de interferencia contra Lmx1a resultó en una disminución drástica de Nurr1 en la parte ventral del mesencéfalo de pollo (Andersson y cols., 2006).

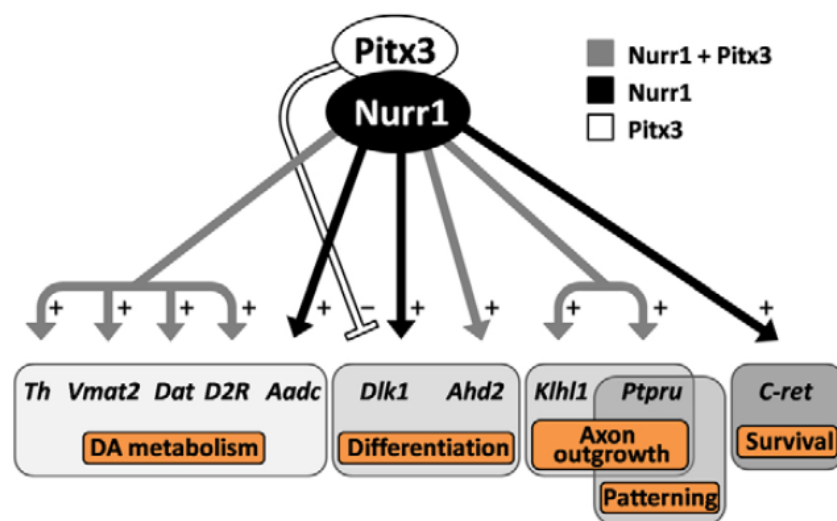


Fig. 11 Nurr1 y Pitx3 regulan la expresión de genes involucrados en el metabolismo de la dopamina, diferenciación terminal, crecimiento axonal y patrón neuronal. La leyenda muestra que Nurr1+pitx3 (plomo), actuando en conjunto participan en la formación del sistema dopaminérgico, además Nurr1 (Negro) y Pitx3 (Blanco) independientemente tienen otras acciones. Tomado de Jacobs y cols., 2009.

1.9.2. Factor de transcripción Pitx3. Es un factor que fue inicialmente caracterizado como un gen bicoide (gen materno), que está exclusivamente expresado en poblaciones neuronales dopaminérgicas del mesencéfalo (Smidt y cols., 1997, Smidt y cols., 2004; Prakash y Wurst, 2006). Pitx3 pertenece a la

familia de genes homeobox y es homólogo de Ptx1 y Ptx2 que fueron clonados previo a Ptx3 (Smidt y cols., 2004). Inicialmente fueron llamados como Ptx por los genes homeobox de la pituitaria, pero como anteriormente se había utilizado Ptx para nombrar a las pentraxinas, se les cambió a Pitx. La expresión del gen de Ptx3 se ha encontrado en todas las neuronas mDA del SNC (Smidt, 1997; Smidt y Burbach, 2007). Ptx3 es requerido para la expresión de Th en un subgrupo de neuronas mDA (Maxwell y cols., 2005). En ausencia de Ptx3, las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta (SNpc) y aproximadamente el 50% de las neuronas del VTA se pierden durante el desarrollo (Hwang y cols., 2003; Smidt y cols., 2004; Maxwell y cols., 2005; Prakash y Wurst, 2006). Por lo tanto, Ptx3 es un factor de transcripción importante para el desarrollo y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Nunes y cols., 2003; Van den Munckhof y cols., 2003; Smits y Smidt, 2006). Asimismo, Ptx3 es esencial para el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas de la SN (Nunes y cols., 2003). Ptx3 está regulado por el factor de transcripción Lmx1b en las neuronas mDA (Smidt y cols., 2000; Prakash y Wurst, 2006), puesto que hay una disminución del mRNA de Ptx3 en ratones *knock-out* del factor de transcripción Lmx1b. Asimismo, Ptx3 potencia al factor de transcripción Nurr1, induciendo la liberación de un receptor nuclear co-represor SMRT del complejo transcripcional, activando de esta manera los genes diana de Nurr1 (Jacobs y cols., 2009) (Fig. 12). Comprendiendo los mecanismos moleculares que describen la actividad de Ptx3, podremos mejorar la comprensión y el tratamiento de enfermedades degenerativas como la enfermedad de Parkinson (Smidt y Burbach, 2007), ya que el 75 % de neuronas dopaminérgicas están localizadas en el mesencéfalo y los dos mayores grupos de neuronas son de la SNpc y VTA, que están relacionadas al movimiento voluntario (Li y cols., 2009) y a las adicciones, respectivamente.

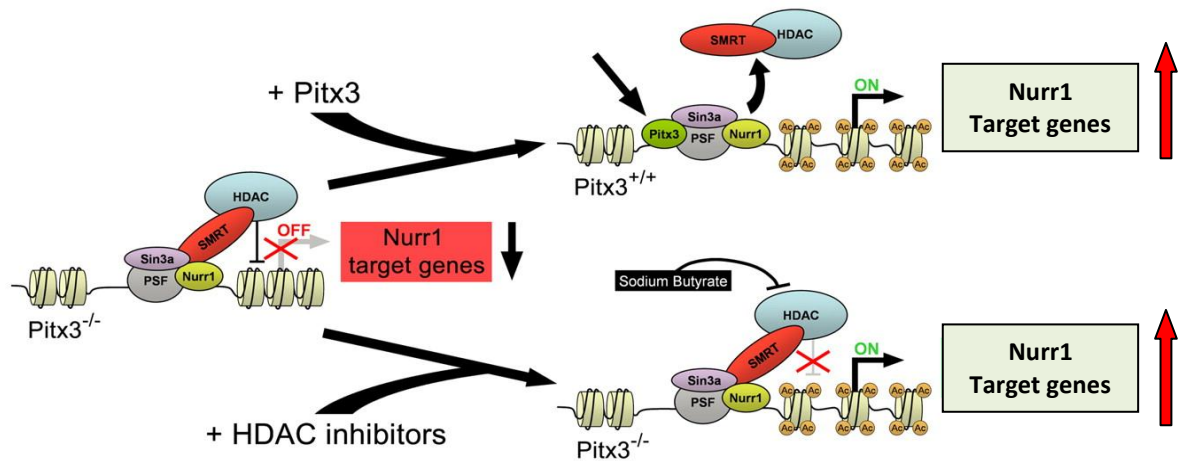


Fig. 12 Pitx3 activa a Nurr1 produciendo la liberación de los co-represores SMRT-HDAC, induciendo de esta manera la activación de los genes diana de Nurr1. SMRT: mediador del silenciamiento del ácido retinoico y del receptor de la hormona tiroidea; HDAC. Histona deacetilasa. Tomado de Jacobs y cols., 2009.

1.9.3. El factor de transcripción Lmx1b. es un miembro de la familia de homeodominio LIM, junto con Lmx1a cumplen un rol importante en el desarrollo del cerebro. Lmx1b fue reconocido por tener un rol en el patrón de expresión dorso ventral de los miembros (Ramsden y cols, 2001). Su expresión anterior a células positivas a Nurr1 y Pitx3 sugieren que Lmx1b pueda actuar genéticamente como un activador de estos genes y estar asociado con la preparación del lugar para el origen y diferenciación del sistema dopaminérgico mesencefálico (Smidt y cols., 2000). Es uno de los factores involucrados en la generación de neuronal de mDA y es esencial para la generación de la adecuada diferenciación de neuronas mDA (Smidt y Burbach, 2007). También se ha descrito la importancia de Lmx1a en la especificación del fenotipo de las neuronas mDA (Smidt y Burbach, 2007). Este efecto muy temprano en la diferenciación de las mDNA por estos factores de transcripción (Lmx1a y Lmx1b) ofrece nuevas posibilidades para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Aunque la expresión de Nurr1 es esencial para la diferenciación de las

células madre en neuronas dopaminérgicas, este factor no puede iniciar y completar este proceso por sí mismo. El desarrollo y diferenciación neuronal ocurre como consecuencia de las acciones sucesivas de factores de transcripción. En las etapas tempranas de transformación de células madres, Sonic hedgehog (Shh) y el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (FGF-8) parecen ser los principales mediadores de la formación de las neuronas dopaminérgicas, ya que inducen la expresión de Lmx1b en etapas tempranas y este a su vez estimula otros factores de transcripción como Nurr1 y Pitx3 (Ramsden y cols, 2001; Goridis y Rohrer, 2002; Smidt y Burbach, 2007) (Fig. 13 A y B).

En el pez cebra se ha visto que para la formación de las neuronas dopaminérgicas se requiere de Lmx1b.1 y Lmx1b.2, dos ortólogos de Lmx1b de mamíferos, ambos son necesarios para la mantención del límite mesencéfalo rombencéfalo (MHB) (O'Hara y cols., 2005). Lmx1b, no se expresa en neuronas maduras mesencefálicas lo que revela un rol en las poblaciones de los precursores del diencéfalo ventral contribuyendo con las neuronas dopaminérgicas de esa región (Filippi y cols., 2007).

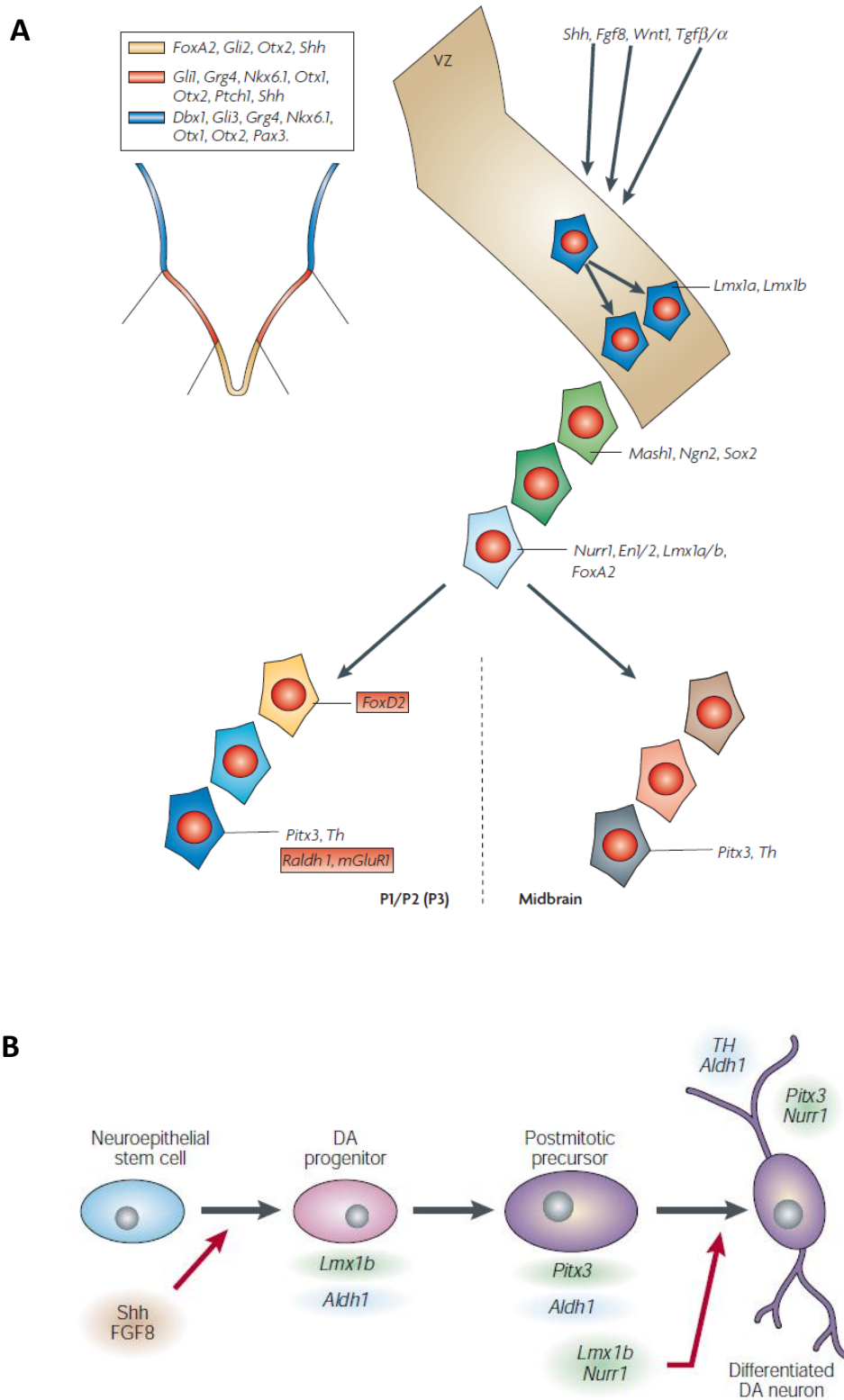


Fig. 13 A) Los factores de transcripción *Lmx1a* y *Lmx1b* se expresan más temprano que *Nurr1* y *Pitx3*, durante el desarrollo embrionario de ratones del día 12.5. Se muestra el desarrollo inicial de la diferenciación en la zona ventricular y en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Tomado de Smidt y Burbach 2007. B) El factor de transcripción *Lmx1b* junto con *Aldh1* son importantes en las neuronas progenitoras de dopamina que posteriormente darán origen a los precursores y neuronas diferenciadas de dopamina. *Aldh1* (Aldehído deshidrogenasa envuelta en la síntesis de ácido retinoico). Tomado de Goridis y Rohrer, 2002.

1.9.4. La proteína Ortopedia (Otp) es un factor de transcripción que tiene un rol importante en la proliferación, supervivencia, así como en la migración y diferenciación celular para el establecimiento del hipotálamo neuroendocrino (Acampora y cols., 1999). Por lo que Otp es un determinante clave que controla la especificación de las neuronas hipotalámicas (Acampora y cols., 1999; Wang y Lufkin, 2000). El desarrollo de neuronas específicas de dopamina en el tubérculo posterior del hipotálamo es dependiente de la función de Otp (Blechman et al., 2007; Del Giacco et al., 2006; Ryu et al., 2007). Asimismo, Otp es esencial para el desarrollo de subgrupos específicos de neuronas dopaminérgicas en el diencefalo (Ryu y cols., 2007). Otp se expresa en precursores postmitóticos tempranos así como en neuronas maduras dopaminérgicas especificadas y parece tener una mayor función en la diferenciación de neuronas dopaminérgicas del diencefalo ventral. En el pez cebra se encuentran dos duplicados de la proteína Otp: Otpa y Otpb con un homología con la proteína de ratón de 81% para Otpa y de 78% para otpb (Del Giacco y cols., 2006), ambos son requeridos coordinadamente para el desarrollo de la mayor parte de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas, así mismo la sobreexpresión de Otp puede inducir expresión ectópica de la tirosina hidroxilasa y del transportador de dopamina, indicando que Otp puede especificar aspectos de la identidad de las neuronas dopaminérgicas (Ryu y cols., 2007). Por otro lado, Otp junto con Arnt2 y Sim1 son importantes en la especificación y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del tubérculo posterior del hipotálamo (Ryu y cols., 2007; Löhr y cols., 2009) (Fig. 14). En ratones mutantes de Otp, se ha observado una deficiencia de neuronas dopaminérgicas en el pretectum e hipotálamo, lo que revela una relación en la evolución de los mamíferos y los teleósteos (Ryu y cols., 2007).

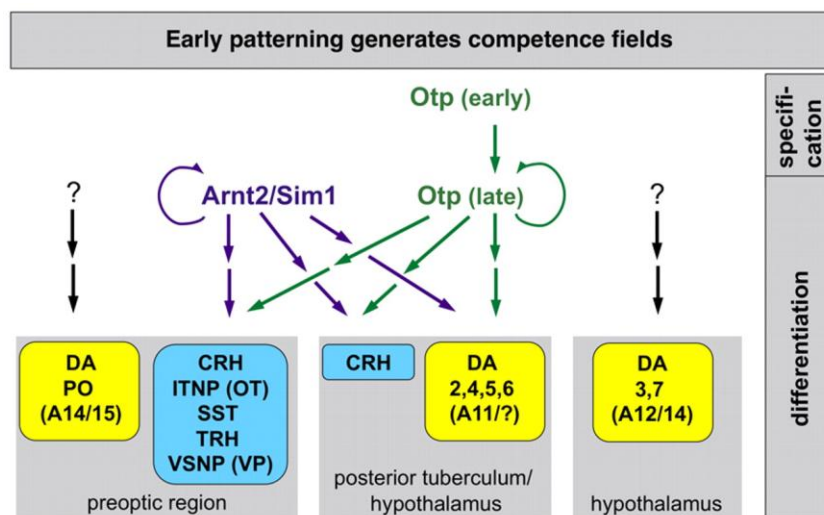


Fig. 14 Otp es importante en la especificación y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del tubérculo posterior del hipotálamo, asimismo intervienen otros factores como Arnt2 y Sim1 en la acción de Otp. Tomado de Löhr y cols., 2009.

1.9.5. Factores de transcripción Lmx1b, Otp, Nurr1 y Pitx3 y su función en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas

Por lo tanto, para la formación del sistema dopaminérgico se requiere la expresión coordinada de genes específicos para el correcto desarrollo de las neuronas dopaminérgicas, la supervivencia y dar las características fenotípicas de las neuronas dopaminérgicas (Tabla 3).

Factor de Transcripción	Expresión en neuronas dopaminérgicas	Función en células mesencefálicas	Referencias
Lmx1b	Progenitores, neuronas inmaduras y maduras	Requerido para el mantenimiento de neuronas mDA	Smidt y cols., 2000
Otp	Neuronas inmaduras y maduras	desarrollo de neuronas dopaminérgicas en el tuberculo posterior del hipotálamo	Löhr y cols., 2009
Nurr1	Neuronas inmaduras y maduras	Requerido para el mantenimiento de neuronas mDA y la expresión de marcadores de la diferenciación tardío	Zetterstrom y cols., 2005; Wallen y cols., 2001 Saucedo-Cardenas y cols., 1997 Wallen y cols., 1999, Smits y cols., 2003
Pitx3	Neuronas maduras	requerido para la expresión de Th en neuronas maduras mDA y la supervivencia de neuronas maduras primarias del la SNpc y VTA	Hwang y cols., 2003; Nunes y cols., 2003 van den Munckhof y cols., 2003; Smidt y cols., 2004; maxwell y cos., 2005

Tabla 3 Resumen de la acción de los factores de transcripción en el desarrollo y función de las neuronas dopaminérgicas. Modificado de Ang, 2006.

1.9.6. La señalización Nodal

La señalización nodal es una importante vía de señalización durante el desarrollo embrionario (Fig. 15) (Agathon y cols., 2003), es una vía de transducción, requerido para el establecimiento y desarrollo del hipotálamo y el telencéfalo ventral (Rohr y cols., 2001). Las proteínas relacionadas a nodal pertenecen a un subgrupo de ligandos del factor de crecimiento transformante Beta (TFG β). El número de moléculas relacionadas con Nodal varían entre vertebrados por ejemplo en ratones encontramos un solo gen que codifica para Nodal, en *Xenopus laevis* tiene al menos 6 genes relacionados y en el pez cebra encontramos tres: Ndr1 (nodal related 1 ó squint), Ndr2 (nodal related 2 ó cyclop) y southpaw (previamente denominado como Ndr3) (Rebagliati y cols., 1998a; Weng y Stemple, 2003; Tian, 2008). Ndr1 y Ndr2 son esenciales para el desarrollo de la región del organizador del istmo y también para la formación del mesodermo y endodermo (Feldman y cols., 1998). La carencia de la señal Nodal Ndr2), tiene como resultado una ausencia completa del cerebro anterior, una severa disminución de las células de la placa basal, conllevando a una malformación de los derivados del cerebro anterior, fusión de los ojos, eje del cuerpo curvado, y alteración en la extensión axonal dentro de la médula espinal (Tongiorgi, 1998; Aquilina-Beck y cols., 2007). El Ndr1 es requerido para la formación del mesodermo y estructuras dorsales (Tian y cols., 2008).

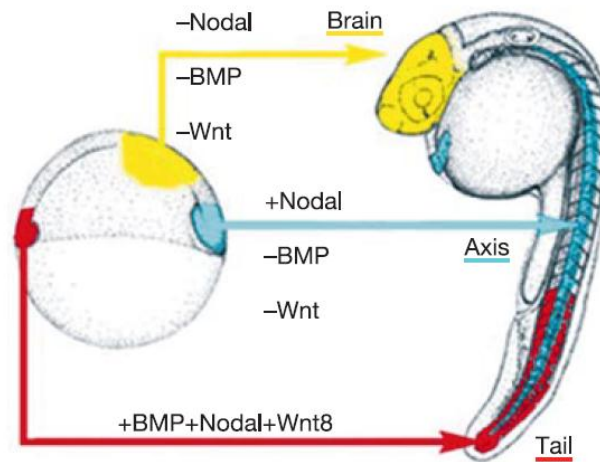


Fig. 15 El patrón de expresión del pez cebra por la combinación de la actividad de BMP, Nodal y Wnt. La formación de la cabeza resulta de la triple inhibición de BMP, Nodal y Wnt. En la formación del eje (la placa precordial, mesodermos cordal, y la parte ventral del tubo neural) resulta de la inhibición de BMP y Wnt y la estimulación de Nodal. La formación de la cola depende de una triple estimulación de BMP, Nodal y Wnt8. Tomado de Agathon y cols., 2003

El silenciamiento de la función de Southpaw por morfolinós sugiere que es importante para el mantenimiento de la asimetría de derecha-izquierda (Long y cols., 2003). *Ndr2*, también llamado Cyclops, a diferencia de *Ndr1* se expresa mayormente durante la gastrulación, pero también en estadios tardíos. Con lo que tendría funciones tempranas y tardías en el embrión, a diferencia de *Ndr1*, que tiene una expresión muy temprana y está relacionada con la inducción temprana del mesodermo en estadio de blástula, mientras, *Ndr2* tiene poca actividad inductora del mesodermo con respecto a *ndr1* pero una mayor actividad inductora neuronal (Rebagliati y cols., 1998b).

En embriones mutantes del gen *ndr2* se observaron, además de la alteración del desarrollo de estructuras de SNC ventral, que el factor de transcripción *otpb* dejaba de expresarse en el tubérculo posterior y que una sobreexpresión de *ndr2* producía una moderada expansión de *otpb* en la misma zona, además determinaron que para la especificación de *Otpb* en el diencéfalo posterior, en el pez cebra, no eran necesarios SHH ni el FGF8. Esto indica que la señalización Nodal es un regulador positivo de la expresión de *otpb* y de las

funciones en la determinación de las neuronas dopaminérgicas en la placa basal posterior del hipotálamo (Del Giacco y cols, 2006) (Fig. 16). Se ha determinado que el FGF8 no es estrictamente requerido para la formación de neuronas dopaminérgicas en el cerebro anterior pero si para el desarrollo de neuronas catecolaminérgicas en el *locus coeruleus*, y que la señalización Nodal es importante tanto para el establecimiento temprano del hipotálamo y también para la formación de neuronas dopaminérgicas en el resto de zonas del cerebro anterior, ya que los mutantes de la señalización nodal carecían de las neuronas dopaminérgicas diencefálicas en la placa basal (tubérculo posterior e hipotálamo) así como en la placa alar (tálamo y grupos pretectales) (Holzschuh y cols., 2003).

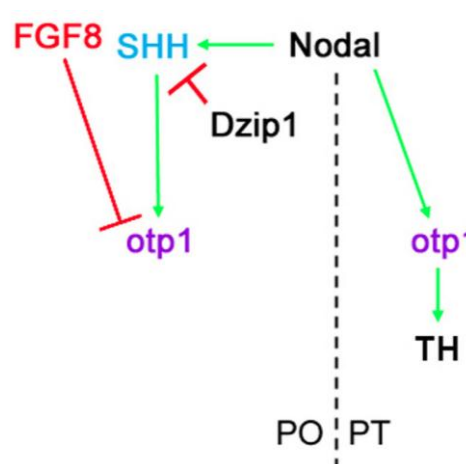


Fig. 16 La señalización nodal regula positivamente al factor de transcripción (sin la intervención de SHH y FGF8) a Otp1 (actualmente denominado Otpb) y este a su vez a la TH de las neuronas dopaminérgicas del tubérculo posterior del hipotálamo. En el caso del área preóptica la señalización nodal regula Otp1 por intermedio de SHH y FGF8. PO: área preóptica del hipotálamo; PT: tubérculo posterior del hipotálamo. Tomado de Del Giacco y cols., 2006.

Nodal propaga su señal uniéndose a complejos receptores heterodiméricos tipo I (activin-like-kinases, ALKs, 4 y 7) y tipo II ALK (ACTRIIB). Esto produce la fosforilación de SMAD2/3 y unido a SMAD4 y se translocan al núcleo, donde regulan la expresión de genes a través de FOXH1. Nodal promueve la expresión de genes como LEFTY1 Y LEFTY2 y goosecoid (GSC). Además, nodal regula su

propia expresión por una retroalimentación positiva (Hendrix y col., 2007) (Fig.17)

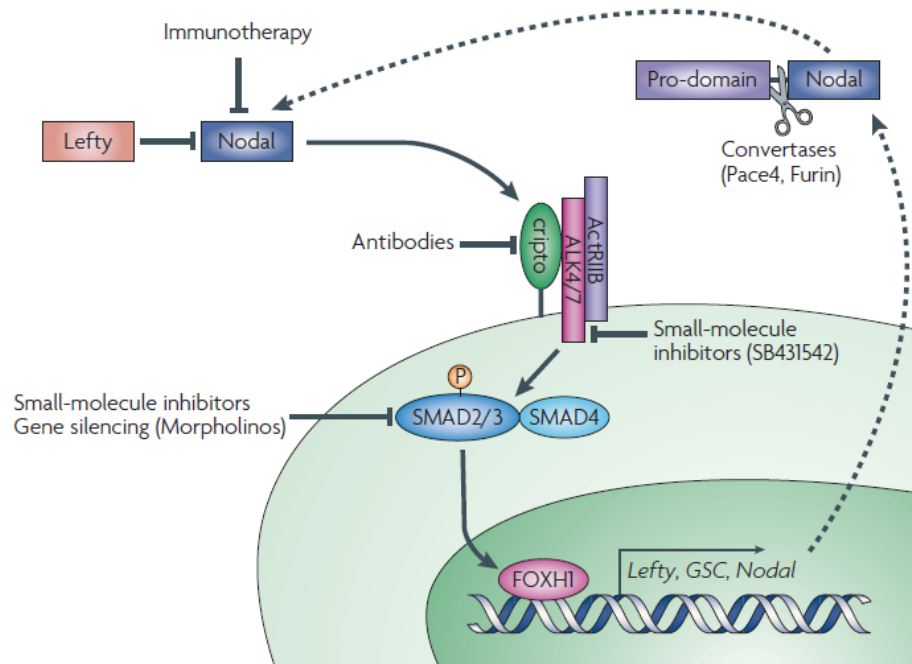


Fig. 17 La proteína Nodal propaga su señal uniéndose a complejos receptores heterodiméricos tipo I (activin-like-kinases (ALKs) 4 y 7) y tipo II ALK (ACTRIIB), resultando en la fosforilación y activación de ALK4/7 por ACTRIIB, seguido por ALK 4 y 7, que median la fosforilación de SMAD2 y posiblemente de SMAD3. Estos últimos fosforilados se unen a SMAD4 y se translocan al núcleo, donde regulan la expresión de genes a través de su asociación con factores de transcripción como FOXH1. La señalización Nodal es promovido por el factor de crecimiento epidermal - factor correceptor (EGF-CFC) cripto. Nodal promueve la expresión de genes como LEFTY1 Y LEFTY2 (Señales extracelulares inhibitorios de Nodal) y goosecoid, además, también regula su propia expresión a través de una retroalimentación positiva. Tomado de Hendrix y cols., 2007.

1.10. Regulación transcripcional por los micro RNAs.

Los microRNAs (miRNA) son pequeños RNAs no codificantes, conformado aproximadamente por 22 nucleótidos, se expresa en todos los organismos multicelulares y está ausente en organismos unicelulares. Estas moléculas de RNA se unen a lugares complementarios del 3'UTR de decenas dianas de RNA mensajeros (mRNA) para perturbar su expresión, degradándolos y /o inhibiendo su translación, de esta manera regulan procesos como proliferación y diferenciación celular, organogénesis y el mantenimiento de células progenitoras (Kloosterman y Plasterk, 2006; Kloosterman y cols., 2006; Yin y Poss, 2008; Shomron, 2010a; Shomron, 2010b).

La biogénesis del miRNA maduro se inicia a partir de la transcripción del miRNA primario (pri-miRNA) a través de la enzima RNA polimerasa II, este es procesado en el núcleo celular por la enzima RNasa III, Drosha, que forma el precursor del miRNA (pre-miRNA), el cual consta de entre 70 a 80 nucleótidos y le da la forma de “pinza”. Luego el pre-miRNA es trasladado del núcleo al citoplasma, a través de la exportina 5, donde es procesado por la enzima RNasa III, Dicer, en dos moléculas de miRNA de 22 nucleótidos aproximadamente, en forma de dúplex. Posteriormente las dos moléculas se separan, la hebra que será el futuro miRNA maduro (RNA guía) se une al RISC (del inglés RNA-induced silencing complex) a través del cual media la actividad de sus genes diana de dos modos: por inhibición translacional o degradación del mRNA diana (Wienholds and Plasterk, 2005). La otra hebra conocida como hebra pasajera o hebra estrella (miRNA*) es desestabilizada y removida de la célula (Dueck y Meister, 2010) (Fig. 18).

La mayoría de los genes de miRNA se localizan en los intrones de los genes huéspedes y en algunos de ellos, esta localización se mantiene conservada durante la evolución. También se ha localizado al miRNA en zonas genómicas relacionadas con cáncer, sugiriendo que el miRNA estaría implicado en la formación de tumores (Calin y cols., 2004a; Calin y cols., 2004b). Como cualquier otro tejido y células, el sistema nervioso y líneas celulares neuronales también expresan miRNAs, algunas de ellas son enriquecidas o únicas en el tejido y células neuronales. La cantidad de genes de miRNA en el sistema nervioso parece ser mayor que en otros órganos debido, posiblemente, a que el sistema nervioso contiene muchos tipos y subtipos de células (Zeng, 2009).

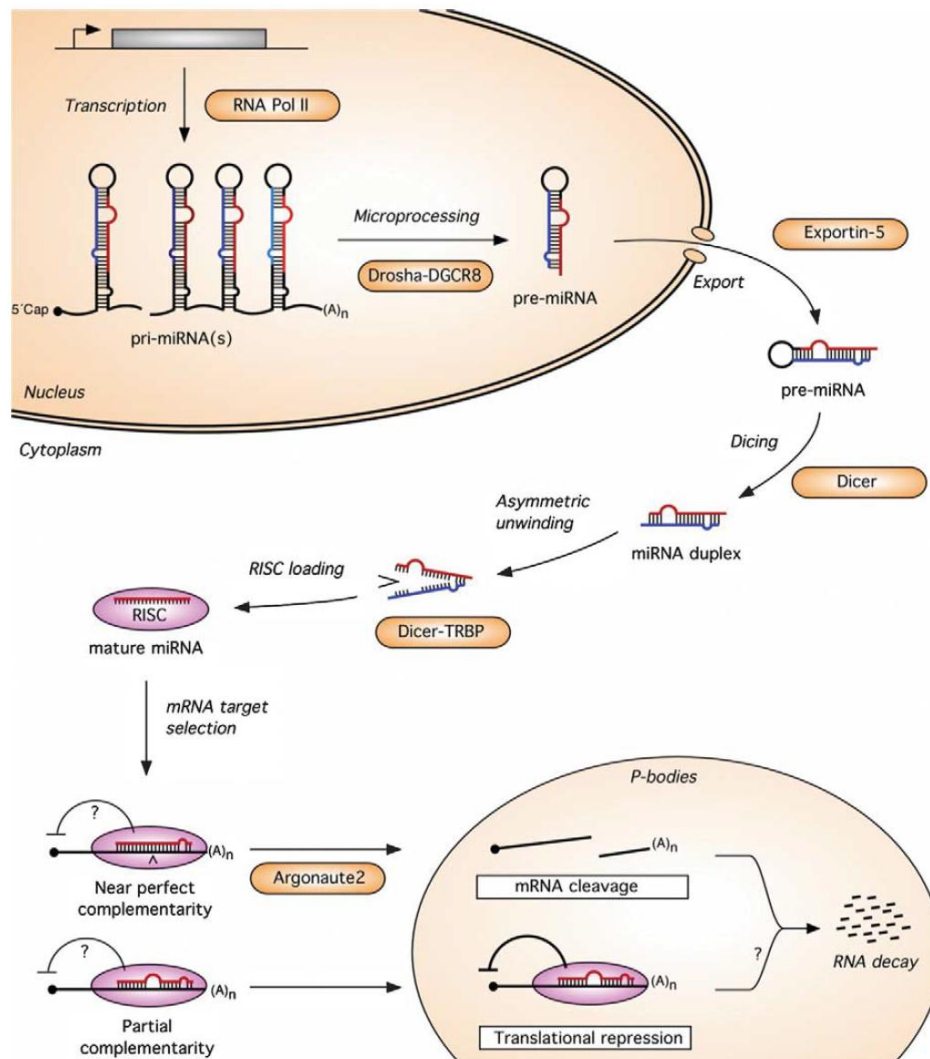


Fig. 18 Biogénesis del micro RNA, en el núcleo se forman primeramente los pri-miRNAs, que luego son procesados por Drosha y exportados al exterior, donde el DICR los procesa y se forma los pre-miRNA y posteriormente el miRNA maduro que luego se une al complejo RISC. Estos últimos en conjunto se unen a los mRNA e inhiben la traslación o degradan los mRNA. Esquema tomado de Wienholds y Plasterk, 2005).

El caso concreto del miR-133b, es que reprime la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de células madres embrionarias y en cultivos celulares del cerebro medio (Kim y cols., 2007), siendo el factor de transcripción Pitx3 un gen diana del miR-133b. Este factor de transcripción es importante en la activación de la expresión de genes en neuronas dopaminérgicas, pero cuando el miR-133b se une a su secuencia 3'UTR (Kim y cols., 2007), este factor se degrada por lo tanto de esta manera el miR-133b inhibe la diferenciación de la neuronas dopaminérgicas (Fig. 19).

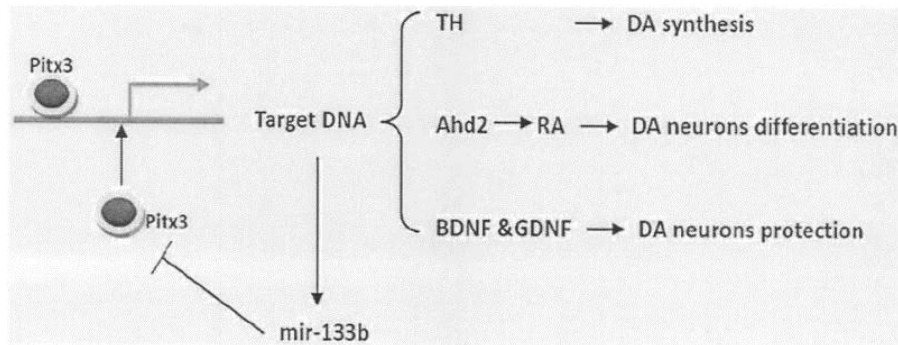


Fig. 19. El factor de transcripción Pitx3 es importante en la formación de las neuronas dopaminérgicas. Asimismo, es diana del miR-133b, el cual inhibiendo la translación o degradación de mRNA de Pitx3 inhibe la acción de Pitx3. Tomado de Li y cols., 2009.

1.11. Modelos animales empleados en la investigación de la biomedicina

En la investigación en el campo de la biomedicina los modelos animales se han utilizado ampliamente como consecuencia de la complejidad y problemas éticos que supone el estudio en el ser humano. Un buen modelo animal debe reproducir situaciones clínicas o fisiopatológicas que permitan estudiar un determinado fenómeno con fines de mejorar las alternativas en el tratamiento o mejorar nuestros conocimientos en determinadas áreas. Los modelos animales deben cumplir una serie de características que permitan extrapolar los resultados encontrados a situaciones clínicas, puedan ser cuantificables y sean fácilmente reproducibles. El modelo animal debe tener una correlación entre los aspectos comportamentales, bioquímicos, fisiológicos y estructurales, lo que en muchos casos implica estudiar en primer lugar el propio modelo experimental en sí mismo para su validación. Cualquier modelo animal que se emplee debe cumplir determinados requerimientos éticos, tales como la justificación de su uso, el empleo de procedimientos no lesivos e intentar utilizar un número mínimo de animales. Además de todo esto se debe considerar abordar estudios en organismos vertebrados que nos permitan en cierta manera poder extrapolar los

resultados en humanos. Los modelos clásicos empleados hasta la fecha, como rata, ratón, sapo o pollo, aportan información valiosa para mejorar nuestros conocimientos y ofrecer alternativas terapéuticas, sin embargo su estudio implica una serie de dificultades como son, su largo tiempo de desarrollo, necesidad de espacio para su cría y cuidado, en mamíferos se añaden las dificultades de su desarrollo intrauterino, y el pequeño número de camadas.

1.12. Pez cebra como herramienta de estudio

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez actinoptergio, del Superorden Teleostei, Orden Cypriniformes y Familia Cyprinidae. Este organismo mide entre 3 y 5 cm de largo en su edad adulta y con un característico patrón de bandas al que debe su nombre (Fig. 20), es originario de aguas dulces del sureste asiático (cuencas de los ríos Ganges y Brahmaputra) (Spence y cols., 2006). Por otro lado, además de ser un típico habitante de acuarios domésticos, el pez cebra se ha incorporado recientemente al repertorio de organismos modelo para el estudio del desarrollo, junto con el ratón

(*Mus musculus*), el pollo (*Gallus gallus*), el sapo *Xenopus laevis*, la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) y el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Este teleósteo ha sido utilizado como modelo



Fig. 20 Pez cebra adulto macho, que presenta el patrón característico de bandas.

para llevar a cabo los estudios de mutagénesis hasta la saturación porque reúne varias ventajas (Streisinger y cols., 1981) entre ellas, su pequeño tamaño hace viable mantener en un espacio razonable la cantidad suficiente de líneas necesarias para realizar los cruces y los mutantes resultantes; su corto tiempo de generación, alrededor de tres meses, determina que transcurra menos de un año

entre el proceso de mutagénesis y la obtención del mutante homocigoto; las puestas constan de cientos de huevos, lo que facilita el análisis genético. Además, otros modelos de vertebrados que también son adecuados para llevar a cabo estos estudios, presentan unos requerimientos mayores de espacio, mantenimiento y cría que encarecen los costes y los sitúan en desventaja frente al pez cebra (Dooley y Zon, 2000; Delvecchio y cols., 2011). Una de las características más destacables de los embriones es que éstos se desarrollan en huevos completamente transparentes, a las 24 horas tras la fertilización se pueden distinguir fácilmente estructuras como notocorda, cerebro, corazón, ojos, y a los cinco días ya se pueden observar la mayoría de los órganos internos (Fig. 21).

Los estudios de mutagénesis a gran escala en el pez cebra han sido llevados a cabo por dos grupos de investigadores en Tübingen y Boston (Haffter y cols., 1996; Driever y cols., 1996). Como resultado han obtenido una colección de más de 6000 organismos mutantes, caracterizando casi 2000 de ellos, que se han asignado a cerca de 500 genes. Estas mutaciones afectan a casi todos los aspectos del desarrollo embrionario del pez cebra. El pez cebra, utilizado en este trabajo, es un buen modelo experimental para estudiar los factores que regulan el desarrollo y la especificidad de neuronas catecolaminérgicas (Guo y cols., 1999a; Guo y cols., 1999b; Holzschuh y cols., 2001, Rink y Wulliman, 2002; Schweitzer y cols., 2011) e ideal para el estudio de numerosas enfermedades humanas y del análisis genético de los efectos biológicos de muchas drogas (Kimmel y cols., 1995; Ninkovic y Bally-Cuif, 2006; Rojas-Muñoz y cols., 2007; Webb y cols., 2009).



Fig. 21. A) Pez cebra adulto hembra, se distingue del macho por tener una mayor prominencia abdominal. B) Diferentes estadios de desarrollo embrionario del pez cebra en las cuales se puede apreciar que su desarrollo es transparente hasta las 72 hpf. Una hembra puede tener en un puesta 100 a 300 huevos, lo cual es una ventaja para la replicación de los experimentos y el análisis estadístico.

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; este screening químico podría emplearse como ensayo preclínico frente a tóxicos y, puesto que el pez cebra modifica su comportamiento tras la ingesta de alcohol o cocaína, el pez cebra podría ser utilizado como modelo para el estudio de la adicción (Dooley y Zon, 2000; Fishman, 2001). Así, en los últimos años, el pez cebra está siendo utilizado como organismo modelo para el descubrimiento de nuevas dianas para drogas, validación de estas nuevas dianas, estrategias en la búsqueda de nuevas drogas y estudios toxicológicos (Goldsmith, 2004). Además, 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). Varios autores ya han propuesto al pez cebra como un organismo modelo para el análisis de los efectos de diversas drogas como el alcohol (Gerlai y cols., 2000; Dlugos y Rabin, 2003; Dlugos y cols., 2011) y la cocaína (Darland y Dowling, 2001; López-Patiño y cols., 2008a; López-Patiño y cols., 2008b).

1.13. Nomenclatura de los genes y proteínas en humanos, rata-ratón y el pez cebra

Cada especie presenta un cierto tipo de nomenclatura para referirse a sus genes y proteínas, por ello para evitar confusión y uniformizar criterios en el trabajo de tesis doctoral presentamos un cuadro representativo de la reglas de nomenclatura para cada especie, como ejemplo se señala el gen y la proteína de la tirosina hidroxilasa (Tabla 4) y esto se puede extrapolar a todos los genes que describimos durante el desarrollo del trabajo.

Especies	Genes	Proteína	Base de Datos
Pez cebra	<i>th</i>	Th	ZFIN*
Rata-Ratón	<i>Th</i>	TH	MGI**
Humano	<i>TH</i>	TH	HGNC***

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

**Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>)

***HUGO Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org/>)

Tabla 4. Los genes del pez cebra se denotan en minúscula y cursiva, mientras que la proteína se denota la primera letra en mayúscula seguido de minúsculas y en redonda. En el caso de Rata-Ratón, los genes se dotan 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 del humano, los genes se denotan en mayúscula y en cursiva y la proteína en mayúscula y redonda

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis y Objetivos

La adicción a la cocaína puede considerarse como una enfermedad (Clay y cols., 2008) que sigue latente en nuestros días y no sólo es un problema para la persona afectada sino también para su entorno más cercano y para la sociedad. El empleo de la cocaína sigue incrementándose cada año y crea muchos problemas psicológicos y biológicos en quienes la consumen, pero además es más grave en las mujeres embarazadas ya que no sólo afecta a la mujer gestante, sino también al embrión o feto. Los efectos que tiene la cocaína se debe a que esta droga tiene un bajo peso molecular y puede atravesar la barrera placentaria (Falcon y cols., 2011; Spiehler y Reed 1985; Ursitti y cols., 2001). Se han llevado a cabo diversos estudios de investigación en animales e incluso humanos, para determinar las consecuencias que puede tener el consumo prenatal de la cocaína en los embriones, fetos y neonatos, todos estos esfuerzos nos han permitido comprender mejor las acciones de la cocaína, pero aún no se ha dilucidado el mecanismo de acción de la droga. Para ello empleando el modelo animal del pez cebra nos propusimos estudiar el efecto de la cocaína en el desarrollo embrionario. El pez cebra presenta la ventaja de que durante su desarrollo embrionario es transparente y podemos observar los efectos de los fármacos o drogas en tiempo real y hacer investigaciones en la expresión de ciertos genes. Asimismo, por su capacidad para incorporar moléculas disueltas en agua, puede emplearse para estudiar las interacciones entre el genoma y los externos como fármacos o drogas. Además, una hembra puede desovar entre 100 a 300 huevos lo que hace que tengamos muestras considerables para el tratamiento estadístico.

2.1. Hipótesis general

Teniendo en consideración los antecedentes expuestos en la introducción de esta tesis doctoral, nos planteamos la siguiente hipótesis “La cocaína afecta el desarrollo del sistema dopaminérgico, alterando la expresión de los factores de transcripción, así como de sus moduladores (miR-133b y proteína Nodal), en diferentes estadios de desarrollo embrionario del pez cebra”.

2.2. Objetivo general

Nuestro objetivo general es estudiar el efecto de la cocaína sobre la expresión de los factores de transcripción, así como de sus moduladores (miR-133b y proteína Nodal), relacionados al desarrollo del sistema dopaminérgico en diferentes estadios de desarrollo embrionario del pez cebra.

2.3. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los receptores dopaminérgicos, *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
2. Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de la tirosina hidroxilasa (*th*) y del transportador de dopamina (*dat*) en embriones, de 24 y 48 hpf, de pez cebra.
3. Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los factores de transcripción relacionados con el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y del gen relacionado a nodal *ndr2*, en embriones, de 24 y 48 hpf, de pez cebra.

- 3.1. Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los factores de transcripción *pitx3* y *nurr1*.
- 3.2. Estudiar el efecto de la cocaína en la expresión temporal y espacial de los factores de transcripción *lmx1b.1*, *lmx1b.2*.
- 3.3. Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal del factor de transcripción *otpa* y *otpb* así como de *ndr2*.
- 3.4. Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de *ndr2*.
4. Determinar los efectos del silenciamiento del miR-133b sobre la expresión del factor de transcripción *pitx3* y los receptores dopamiérgicos *drd2a* y *drd2b* en el pez cebra.
5. Determinar la expresión temporal y espacial del miR-133b y observar los efectos de la cocaína en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra.
6. Determinar los efectos de la cocaína sobre la distribución de la TH, en embriones, de 24 y 48 hpf, de pez cebra.
7. Inhibir la expresión de los factores de transcripción *lmx1b.1-lmx1b.2* y estudiar el efecto que esto produce en la expresión de *nurr1* y la *th* en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra expuestos a cocaína.
8. Inhibir la expresión de los factores de transcripción *otpa-otpb* y estudiar el efecto que esto produce en la expresión de la *th* en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra expuestos a cocaína.

.

***MATERIAL Y
MÉTODOS***

3. Material y métodos

3.1. Mantenimiento y cría de embriones

Utilizamos peces cebra adultos de la estirpe AB, que inicialmente fueron procedentes de la Universidad de Oregón, Estados Unidos (The Zebrafish International Resource Center), luego fueron criados y reproducidos en nuestro laboratorio para su posterior uso. La estirpe AB es la más utilizada en la mayoría de laboratorios que trabajan con el pez cebra, por estar esta cepa libre de mutaciones letales. Los peces adultos fueron mantenidos en peceras de 25 L diseñadas por Zebrafish Biolabs, Madrid, en las instalaciones del Instituto de Neurociencias de Castilla y León-INCYL (Universidad de Salamanca) (Fig. 22). El fotoperiodo en el mantenimiento de los peces fue de 12h:12h de luz-oscuridad. Las larvas, alevines y los juveniles se mantuvieron en peceras de menor tamaño (6 L) con una bomba de aire y un calentador (25-26°C). Los peces se alimentaron tres veces al día: una con comida seca de escamas para peces de acuario (JBL Flakes Gala) y dos veces con alimento vivo (*Artemia franciscana*). La calidad del agua se mantuvo por evaluaciones periódicas de pH (valor óptimo: 6,5), nitritos, nitratos, amonio y cloro (valor óptimo cercano a 0 g/L). Los embriones fueron obtenidos de la cría natural en parideras de una hembra y un macho de pez cebra, las parideras fueron condicionadas con canicas para producir un mayor reflejo de la luz y potenciar la liberación de huevos de la hembra (Rocha y cols., 2002) (Fig. 23). Los embriones fertilizados, fueron seleccionados mediante un microscopio estereoscópico (Leica Z2000, Nussloch, Alemania), luego se pasaron 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 MgSO₄ en agua destilada; Sigma, Madrid, España), y mantenidos en una incubadora a 28,5 ° C (incubadora Memmert) (Fig. 24 A y B).



Fig. 22. Instalaciones de las peceras con peces cebra adultos de la cepa AB, en nuestro laboratorio. Los embriones obtenidos a partir de una hembra y un macho fueron empleados para los experimentos de este trabajo de investigación. Los peces están distribuidos según el sexo y fecha de nacimiento.



Fig. 23. Parideras empleadas para las puestas de huevos. Se escoge una hembra y un macho, los cuales se colocan dentro de las parideras la noche anterior. Al día siguiente, después de 12 horas de oscuridad la incidencia de la primera luz (al encenderse las luces de las instalaciones de los acuarios) estimula la puesta de huevos en las hembras. Las canicas que se aprecian reflejan la incidencia de la luz en mayor grado y esto ayuda a estimular sexualmente a las hembras.

Las etapas de desarrollo de los embriones se determinaron como las horas posteriores a la fecundación o fertilización (hpf).

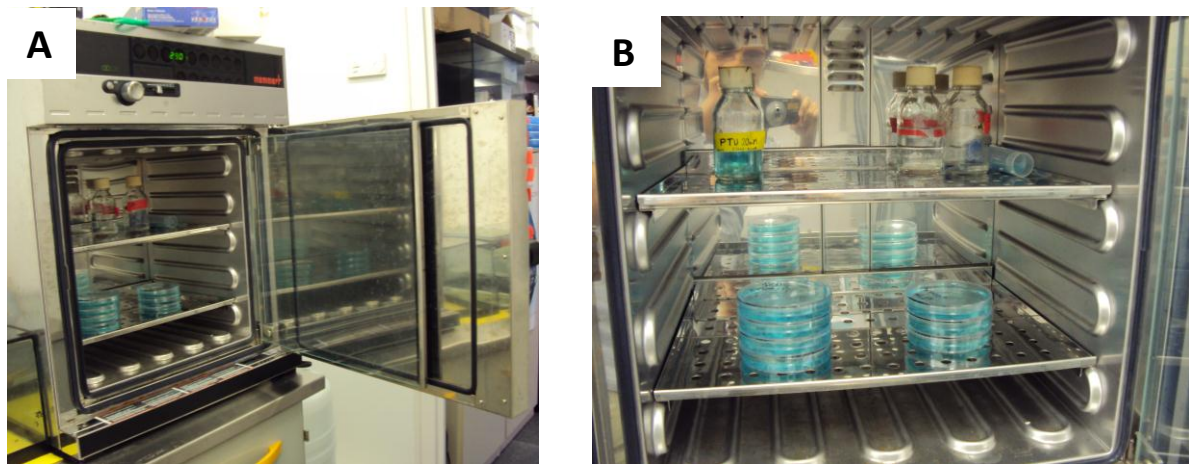


Fig. 24. A) Una vez que se recogen y seleccionan los embriones fertilizados, estos se mantienen en una incubadora (Memmert) a una temperatura de $28,5^{\circ}\text{C}$, hasta el estadio de desarrollo apropiado para realizar los experimentos. B) Se aprecia las placas Petri conteniendo los embriones de pez cebra en medio E3

Todos los procedimientos y protocolos experimentales realizados en la presente investigación estuvieron de acuerdo con las directrices aprobadas en la *European Communities Council Directiva* del 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 el uso de animales de laboratorio con las adaptaciones y promulgada por los EE.UU. Instituto Nacional de Salud (INH), así como según lo suscrito en la Declaración de Helsinki.

3.2. Exposición de los embriones de peces cebra a clorhidrato de cocaína

Las muestras se dividieron en dos grupos uno control (sin exposición a cocaína) y el grupo expuesto a cocaína, para lo cual empleamos placas multipocillos, en las tres primeras filas pusimos los embriones del grupo control y en las tres últimas los embriones expuestos a cocaína (Fig. 25). Con el objetivo de observar si la cocaína tiene efectos en la expresión de diversos genes relacionados

con el sistema dopaminérgico, sin producir malformaciones importantes, ni la muerte de los embriones, expusimos clorhidrato de cocaína a las 5hpf (transición midblástula) cuando el periodo crítico de desarrollo ha finalizado, a una concentración de 1,5 μM (concentración óptima determinada en ensayos piloto, de entre 5 μM y 0,5 μM) que fueron empleados también en otras investigaciones (López Patiño et al., 2008). 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 fueron recolectados en cinco estadios (8, 16, 24, 48 y 72 hpf) para observar la expresión de los receptores dopaminérgicos. Para el resto de genes por estudiar decidimos tomar solo dos estadios importantes en el desarrollo embrionario, a las 24hpf en el cual el sistema nervioso central ya se está desarrollando y a las 48 hpf cuando el proceso de organogénesis se está dando. Para cada estadio de trabajo se recolectaron entre 250 a 300 embriones.



Fig. 25. Exposición de clorhidrato de cocaína a los embriones de pez cebra en el estadio de 5 hpf en cada pocillo se pusieron aproximadamente 80-100 embriones, por lo tanto por cada grupo (control y cocaína) hubo en total aproximadamente 250 embriones por grupo.

3.3. La extracción de RNA total de embriones de pez cebra

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, 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 pistilos y por pipeteo. Tras incubar el preparado durante 5 minutos 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 x g durante 15 minutos 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 x g durante 10 minutos 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 x g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, 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 minutos para favorecer la disolución del mismo.

3.4. Tratamiento de RNA total con DNasa I

El RNA obtenido de las muestras, de los grupos control y cocaína, en todos los casos fueron tratados con DNasa I (Roche Científico, Madrid, España) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Aproximadamente 10-15 µg de RNA total en un volumen de 20.5 µl libre de RNasas, se trató con 1 µl de DNasa

I 10 U/ μ l (10×10^3 units) y 2.5 μ l de buffer de DNasa I 10X (400 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 60 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, pH 7.9). Esta reacción se incubó a 37°C durante 15 minutos. La DNasa I requiere de cationes divalentes para su máxima actividad (lo cual es activado por iones de magnesio y estimulado por los iones de calcio). Luego con el fin de disminuir la actividad de la endonucleasa se añadió 1 μ l 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 minutos a 75°C en el termociclador.

3.5. Cuantificación de las muestras de RNA

La concentración del RNA, obtenido de las muestras del grupo control y cocaína, se determina utilizando la tecnología NanoDrop (NanoDrop 2000C espectrofotómetro, Thermo Scientific), espectrofotometría a 260 nm. Para la cuantificación del RNA se toma 1 μ l de cada muestra, se repite por triplicado y el promedio obtenido de estas cuantificaciones se toma como valor de trabajo para continuar con los experimentos posteriores. En todas las mediciones realizadas se comprueba que la relación A260/280 se encuentre cerca de 2 (correspondiente a muestras puras de RNA). Asimismo, tuvimos en cuenta la relación 260/230, que nos permite determinar la cantidad de contaminación orgánica presente en nuestras muestras.

3.6. Obtención de cDNA

Para la obtención del cDNA (DNA copia) se utiliza el kit ImProm-IITM Reverse Transcripción System (Promega) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente se desnaturaliza por calor una mezcla de 2 μ g de RNA total y 0.5 μ g del oligonucleótido oligo-dT a 70 °C durante 5 min (el volumen de

RNA y oligonucleótido dT debe alcanzar como máximo 5 μ l), tras lo cual se enfría rápidamente en hielo. Este paso evita las posibles estructuras secundarias que puedan aparecer en los RNAs. Posteriormente a esta reacción se añade una mezcla preparada previamente que contenía 1 μ l de transcriptasa inversa ImProm-IITM, 4 μ l de buffer 5X ImProm-IITM, MgCl₂ 5 mM, una mezcla de dNTP (desoxinucleósidos trifosfato) 0.67 mM, 20U del inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNasin® y agua libre de RNAsas (ddH₂O tratada con DEPC) hasta un volumen final de 15 μ l. La reacción se somete durante 5 min. a 25 °C, lo que permite que el cebador anille con el RNA molde; posteriormente se incuba a 42 °C durante 1 h, para que la retrotranscriptasa sintetice el cDNA. Finalmente la enzima se inactiva incubando 15 min. a 70 °C las mezclas de la reacción.

Para comprobar que la síntesis de cDNA se ha realizado con éxito, se utilizaron controles positivos de la técnica, es decir, genes que se expresan de forma constitutiva y nos permitan 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 utiliza la amplificación del factor de elongación 1 alfa (EF1 α), b-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 el RNA de interés.

3.7. Síntesis de cDNA de microRNAs

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

3.8. Tratamiento de cDNA con RNasa A

Las muestras de cDNA obtenidas fueron tratadas con RNasa A (20 ng / L para 15-20 ug 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 acabo a esta misma

velocidad). Luego se añade 750ul del tampón PE y se centrifuga dos veces (descartando el volumen filtrado entre centrifugada), con el objeto de eliminar restos del tampón PE. Finalmente, se añade entre 30-35ul de agua libre de nucleasas. La concentración del cDNA se determina utilizando la tecnología 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 comprueba que la relación A260/280 se encuentre cerca de 1.8 y la relación 260/230 (para determinar contaminación orgánica presente).

3.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa se realizó utilizando dos 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 (buffer de la polimerasa pH 8.5, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 400 µM, Taq DNA polimerasa 50 U/ml), 100 ng de DNA y 0.1-1 µM de cada oligonucleótido. La reacción se lleva a cabo en un volumen final de 25 o 50 µl. Este kit se utiliza 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).

Los oligonucleótidos fueron suministrados por Invitrogen de forma liofilizada siendo reconstituidos con agua estéril libre de RNAasas (Promega). Primero se obtuvo un stock a una concentración 100 µM y posteriormente se hicieron alícuotas de trabajo de 10 µM 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 lleva a cabo en los termocicladores 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 minutos (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 segundos (s) para permitir la desnaturalización de las hebras de DNA, 55-60 °C durante 30s para permitir el anillamiento de los oligonucleótidos a las cadenas molde y 72 °C durante otros 30s 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; 55-60 °C*, 30 s; 72 °C, 30 s; 72 °C, 10 min. Los cebadores u oligonucleótidos utilizados durante el presente trabajo de la tesis doctoral, así como las temperaturas de anillamiento de cada cebador se detallan en la tabla 5. El diseño de oligos se realizó empleando el PCR primer Stats, parte del programa bioinformático *Sequence Manipulation Suite* (SMS) (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>). Uno de los oligos *forward* y *reverse* se diseñaron en la secuencia interexónica para asegurarnos que reconociera una secuencia específica del mRNA de interés y además realizamos un BLAST (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index) para verificar que reconociera una sólo secuencia y evitar los posibles múltiples anillamientos que pueden originar una amplificación inespecífica.

Gen	Secuencia F*	Secuencia RC*	Ta(°C)
<i>ef1a</i>	GTACTTCTCAGGCTGACTGTG	ACGATCAGCTGTTTCACTCC	55
<i>Rbpl13a</i>	TGGAGGACTGTAAGAGGTATGCTT	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG	55
<i>B-actin</i>	ACCACGGCCGAAAGAGAA	ATACCCAGGAAGGAAGGCTG	55
<i>drd1</i>	ACGCTGTCCATCCTTATCTC	TGTCCGATTAAGGCTGGAG	60
<i>drd2a</i>	TGGTACTCCGAAAAGACG	ATCGGGATGGGTGCATTTT	59
<i>drd2b</i>	AAATAACACAGCTACACGGGAT	GAACCACGTAAATCTGCACG	60
<i>drd3</i>	ATCAGTATCGACAGGTATACAGC	CAAACAGTAGAGGGCAGG	56
<i>dat</i>	AGACATCTGGGAAGGTGGTG	ACCTGAGCATCATAAGGCG	60
<i>th1</i>	TTGAAGAGAAGTGCAGAGGAT	GGATCACCCAGGATTTACTGA	57
<i>nurr1</i>	ACAACCTAAAGGGTCGTCGAG	ACTACACCAGATTCCAAGCCA	57
<i>pitx3</i>	GACAACAGTGACACAGAGAAGT	GAGAAACCGTTATCCCGACA	57
<i>lmx1b.1</i>	GATGAAGAAGTTGGCGCGGAGA	CCGTTCTCCAGTGCAACCATT	61
<i>lmx1b.2</i>	CAGACCTCTCCGACTCCGACAAA	TGCACGGTTTGGACGAGACCTC	64
<i>otpa</i>	GGAATCACGCGTGCAGGTT	CGTTCGCGTGGAAAGAGCA	59
<i>otpb</i>	TTGGATACTCGCCTCGGGAT	TTGGCGTTGACCTGCTGC	59
<i>ndr2</i>	AATGTGCTCAACAATGACAACC	GGCAAAGGCCAGAGACT	57
<i>miR-133b</i>	TTTGGTCCCCTCAACCAGCTA	Oligo Universal **	57
<i>3'UTR Pitx3</i>	CGGTATGAAAGCGATGCGTCTA	AGACAAAGCAGGCTACACCAGGA	57

* Secuencia F y RC significan *Forward* y *Reverse Complementary* (en terminología anglosajona)

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

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados en la presente investigación para realizar los experimentos de PCR y PCR cuantitativa (qPCR). Fueron suministrados por la casa comercial ISOGEN. Ta: Temperatura de anillamiento.

3.10. PCR a Tiempo real (qPCR)

Para estudiar la expresión temporal de los genes 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 a la PCR básica o tradicional 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 procede a realizar la amplificación de los genes a estudiar por PCR standard (descrito en párrafos anteriores), para ello fue necesario obtener el producto por PCR para luego purificarlos por columnas (Qiagen). Se amplificaron y purificaron los amplicones de los receptores dopaminérgicos (*drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3*), factores de transcripción (*nurr1*, *pitx3*, *lmx1b.1*, *lmx1b.2*, *otpa* y *otpb*), *ndr2*, *th*, *dat*, miR-133b y del gen de referencia *ef1 α* que hemos utilizado 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) y se somete el producto final de la reacción a electroforesis 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 μ 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 de QUIAGEN). Posteriormente, se cuantificó la concentración de cada producto, por triplicado y tomándose como valor el promedio de las lecturas, de los DNA obtenidas por PCR. Hacemos 10 diluciones 1/10 desde 1×10^{-1} ng/ml hasta 1×10^{-10} ng/ml. De los cuáles utilizamos 4 diluciones (1×10^{-2} ng/ml, 1×10^{-3} ng/ml, 1×10^{-4} ng/ml y 1×10^{-5} 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 1×10^{-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, el SYBR-Green, que emite fluorescencia cuando se une a DNA de doble cadena (Fig. 26). 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, MgCl₂ y agua, todo en una concentración 2X, de manera que a cada reacción se añaden 10 µl de SYBR-Green Power Master Mix®, 1 µl de cDNA de concentración de 50 ng/µl, 1 µl de oligonucleótido forward, 1 µl de oligonucleótido reverse y 7 µl de agua libre de nucleasas. El programa que se empleó en el termociclador fue el siguiente: 50° C 2 minutos, 95° C 10 minutos y 36 ciclos de 95° C 15 segundos y 55° C 1 minuto. Todas las qPCR fueron realizadas por triplicado para cada muestra, y consideramos un mínimo de tres muestras y un máximo de 6 (cuando necesitábamos estar seguro de la tendencia de la expresión

de un gen por acción de la cocaína). Los experimentos de qPCR se realizaron empleando equipo de PCR a tiempo real, modelo 7300 Real Time PCR System, (Applied Biosystem®).

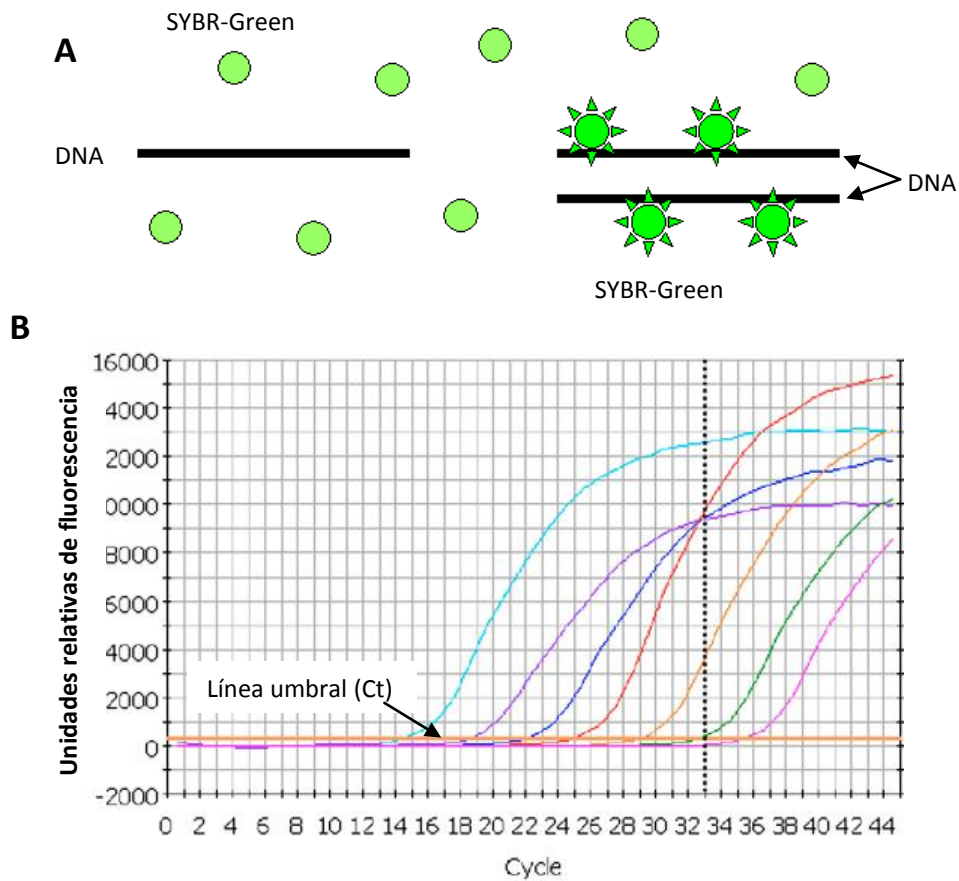


Fig. 26. A) El SYBR-Green es empleado en los experimentos de PCR a tiempo real para monitorizar la síntesis de DNA. El SYBR-Green tiene la capacidad de unirse a la molécula de DNA de doble cadena y no a la cadena simple. B) Se aprecia la síntesis de DNA de diferentes muestras, cuando se alcanza un gran cantidad de DNA sintetizado, el SYBR-Green unido a las cadenas de doble cadena produce una fluorescencia el cual puede ser detectado por el equipo de PCR a tiempo real y se aprecian en las diferentes curvas de expresión logarítmica de colores. La línea naranja representa el umbral a partir del cual se detecta la fluorescencia emitida durante la amplificación. El ciclo en el cual la reacción cruza dicho umbral (Ct) está relacionado con la cantidad inicial de DNA.

3.11 Análisis de la expresión génica por qPCR

El paquete informático (software) que hemos utilizado para analizar los resultados establece una línea umbral a partir de la cual la cantidad de producto amplificado es suficiente 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 Ct. El valor Ct 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:

$$\begin{array}{c}
 \boxed{\begin{array}{c} \text{N}^\circ \text{ de pares de base} \\ \text{del amplicón} \end{array}} \times \boxed{\begin{array}{c} \sim 330 \text{ Daltons (D)} \\ \text{Peso molecular en Daltons} \end{array}} \times \boxed{\frac{2 \text{ nucleótidos}}{\text{Par de bases}}} = \boxed{\frac{\text{Xg}}{\text{mol}}} \\
 \\
 \boxed{\frac{\text{X}}{\text{n}^\circ \text{ Avogadro (} 6.023\text{e}23\text{)}}} = \boxed{\frac{\text{Yg}}{\text{molécula}}} \\
 \\
 \boxed{\frac{\text{ng}/\mu\text{l}}{\text{Y} \cdot 10^{-9}}} = \boxed{\frac{\text{Z moléculas}}{\mu\text{l}} \text{ cDNA}}
 \end{array}$$

La fórmula se explica de la siguiente manera:

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 del amplicón / 6.023×10^{23} = Y g / amplicón molécula.
3. Concentración de la dilución / Y g / amplicón molécula = Z moléculas / l.

3.12. Hibridación *in situ* (ISH) en embriones enteros

Los embriones de peces cebra de las 24 y 48 hpf se decorionan, para luego ser 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. Cuando se continúa 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 (10µg/ml) a temperatura ambiente (TA) durante 2 minutos (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 minutos cuatro veces en 1x PBT. Después de 2 horas de prehibridación, las ribosondas del factor de transcripción *Imx1b.1* y *Imx1b.2* se hibridaron durante toda la noche a 65°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 horas 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, MgCl₂ 1M, NaCl 4M y el 20% de Tween-20) durante 3 horas y, finalmente, la hibridación se revela con NBT / BCIP (Roche). La hibridación *in situ* del miR-133b (Exiqon) se realizó según el protocolo del fabricante (miRCURY LNA™ sondas de detección microRNA para hibridación *in*

situ, Exiqon). Las ribosondas de Lmx1b.1 y Lmx1b.2 que empleamos en el presente trabajo fueron gentilmente proporcionadas por el Dr. Daniel S. Kessler, del Departamento de Biología Celular y Desarrollo de la Universidad de Pennsylvania, Escuela de Medicina.

3.13 Inmunohistoquímica (IHC)

Embriones de 24 y 48 hpf se fijaron en 4% PFA (Sigma) en tampón fosfato salino (PBS) durante la noche a 4°C y se almacenaron en metanol (Sigma) a -20 °C. Luego para realizar los experimentos los embriones se sacan a temperatura ambiente (TA) por 10 min. Se rehidratan 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 utiliza la proteinasa K (10µg/ml) a TA durante 20 min. (24 hpf) y 40 min. (48 hpf). Se detiene la digestión de la proteinasa K con lavados de PBST y seguidamente se postfija 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 TA. Para la inmunodetección, los embriones se incuban durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal de TH hecho en conejo (AB152; 1:500; Millipore) (Fig. 23). A continuación, se lavan los embriones en PBS y se incuban durante 1 hora a TA en PBST y BSA al 1% (10x) con el anticuerpo secundario anti-conejo IgG hecho en cabra, acoplado a AlexaFluor-488 (verde) (1:500; Invitrogen, Barcelona, España). Para marcar el núcleo empleamos DAPI (1:10000).

3.14. Clonación de la región 3'UTR de Pitx3

Para realizar la microinyección del 3'UTR del factor de transcripción Pitx3 en embriones de pez, fue necesario primero clonarlo, utilizando para ello oligonucleótidos que anillen en la secuencia de Pitx3 de pez cebrá publicada en la base de datos Ensembl (Fig. 27), con la finalidad de evitar que el miRNA-133b se una a la región 3'UTR del Pitx3 endógeno e inhiba su traducción y de esta forma se anule la actividad del miR-133b.

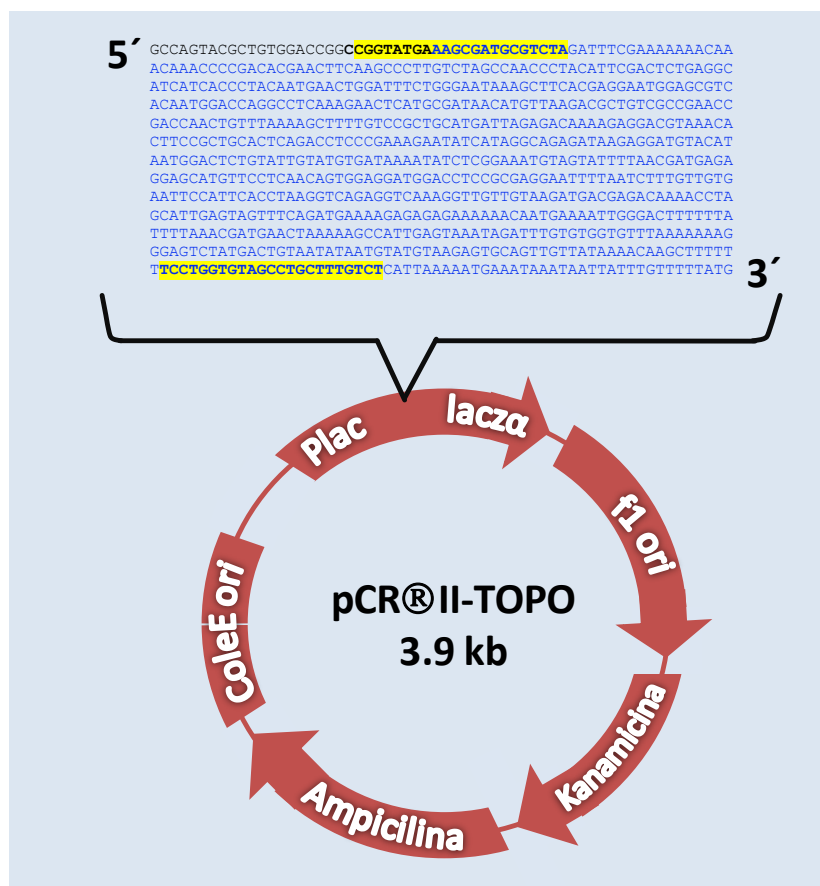


Fig. 27 La secuencia de 3'UTR de Pitx3 (amplicón de 723 nucleótidos) se insertó en el plásmido pCR®II-TOPO. El 3'UTR-Pitx3 es considerado como diana del miR-133b. La zona de inserción del 3'UTR-Pitx3 se realizó en la región de clonación múltiple (del inglés, Multiple Cloning Site). Puesto que el plásmido pCR®II-TOPO es abierto presenta en sus extremos una T (timina) que se une a la A (adenina) terminal que añade la Taq polimerasa del producto de PCR. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la secuencia 3'UTR-Pitx3 se muestran subrayados de amarillo. El oligo *forward* se diseñó entre el final del marco de lectura abierto (secuencia de color negro) y el principio de la región 3'UTR de Pitx3.

La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para el 3'UTR Pitx3 fueron: *forward*: CGGTATGAAAGCGATGCGTCTA y *reverse*: TCCTGGTGTAGCCTGCTTTGTCT (tabla 5). Primero se amplifica mediante PCR básica la región 3'UTR de Pitx3 utilizando 200 ng de cDNA y el Kit PCR Master Mix de Promega (12,5 µl de Master Mix, 8,5 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de oligonucleótidos 10 pmol/µl y 2 µl de cDNA 100 ng/µl). Posteriormente, el producto de PCR es sometido a electroforesis y purificado, para de esta manera proceder a su ligación en el vector de clonación pCR®II, empleando 50 ng del vector (2ul), 1 µl del Buffer de ligación (10X), 1 ul de T4-ligasa DNA , 5 ul del producto purificado en un volumen final de 10 µl. La reacción se incubó a 14 °C durante toda la noche. Para obtener una mayor cantidad de plásmido con la región 3'UTR, se transforma 5 µl de esta construcción en 30 µl de células supercompetentes TOP 10F', según el siguiente protocolo: 30 minutos en hielo, 45 segundos a 42 °C, 5 minutos en hielo, 1 hora en agitación a 37 °C y por último se siembran en una placa TYE con 50ul de ampicilina, 50 ul X-Gal (5-bromo-4- cloro-3-indolil-D-galactopiranosido) e IPTG (isopropil-1-D-tiogalactopiranosido), y se dejan crecer toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se seleccionan las colonias, se siembran en medio líquido 2XTY suplementado con ampicilina, se dejan crecer toda la noche a 37 °C en agitación y se procede a la purificación del plásmido empleando el sistema Rapid DNA Plasmid Miniprep Kit (Gene Dan). Así nos aseguraremos de obtener como mínimo concentraciones de 2 µg/µl de plásmido con la construcción requerida, lo que facilita la eficiencia en la inyección. 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 y también fueron secuenciadas en el servicio

central de secuenciación de la Universidad de Salamanca dotado de un secuenciador automático ABI Prism® (Applied Biosystems).

3.15. Microinyección de morfolinós y de DNA

Los morfolinós son oligonucleótidos químicamente modificados que pueden unirse y bloquear el proceso de traslación de mRNA ,tanto *in vitro*, como *in vivo* (Summerton y Weller, 1997; Qin y cols., 2000), de esta manera silencia la expresión del gen (knockdown) y por tanto la función de la proteína. Empleamos morfolinós provistos por Gene Tools. La inyección de morfolinós se ha realizado según la metodología desarrollada por Nasevicius y Ekker (2000). Para lo cual se emplea un sistema de microinyección y micromanipulación diseñado especialmente para la inyección de embriones de pez cebra, acoplado a un estereoscopio (Zeiss Discovery V8) y a una cámara de alta resolución que permita la realización de vídeos y fotos. (Fig. 28).

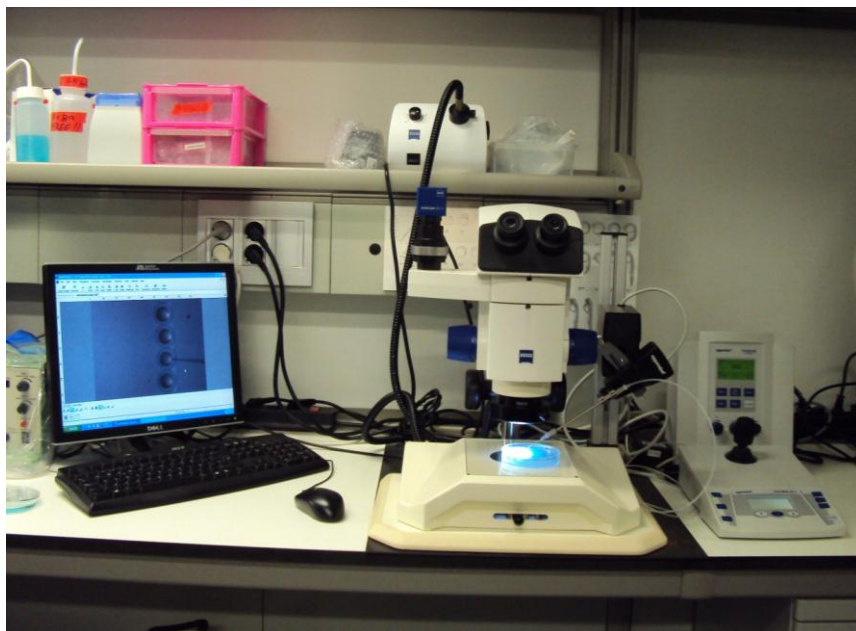


Fig. 28 Sistema de microinyección y micromanipulación (Eppendorf) conectado a un ordenador, en el que se aprecia los embriones y un microcapilar sobre un embrión. El sistema de microinyección está acoplado a un estereoscopio Zeiss Discovey V8 (Leica).

Primero se determina la concentración ideal para inyectar los morfolinós, para ello se inyectaron distintas concentraciones para comprobar cuáles eran letales y cuáles producían un mínimo efecto, se analizó la supervivencia embrionaria y posibles malformaciones que den lugar a resultados erróneos. De las diferentes concentraciones inyectadas empleamos la mayor concentración y con mortalidad mínima. Luego se calibran los parámetros de presión y el tiempo del pulso adecuado al volumen a inyectarse, calculando que en cada pulso se inyectan 3 nl de solución en el embrión. La microinyección de los morfolinós se realiza en el vitelo de embriones de pez cebra en estadio de 1 célula de desarrollo. Tanto los embriones microinyectados como los no microinyectados se mantienen en las mismas condiciones: 28,5°C y en medio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄ en agua destilada). Para la preparación de los microcapilares, estos fueron realizados en nuestro laboratorio utilizando el sistema del Puller (Fig. 29) el cual consiste en colocar los capilares de vidrio dentro de una resistencia de metal que la ir calentándose progresivamente hasta 69,8°C, produce la elongación y posterior separación en dos del capilar de vidrio.



Fig. 29. Los microcapilares que empleamos para la microinyección de los morfolinós y DNA fueron realizados empleando el Puller (Narishige). A la izquierda se muestra los capilares de cristal, al centro se aprecia el Puller en funcionamiento y a la temperatura de 68,9°C la resistencia alcanza el punto en que corta en dos el capilar de vidrio gracias a la ayuda de la fuerza de la gravedad. A la derecha se ve como el capilar de vidrio queda dividido en dos y cada uno presenta un extremo muy alargado y estrecho que tiene la forma de una microaguja.

La secuencia de los morfolinós Lmx1b.1 y Lmx1b.2 (tabla 6) fueron tomados del estudio realizado por O'Hara y cols. (O'Hara y cols., 2005) donde determinan la importancia de ambos ortólogos de Lmx1b en el desarrollo del región mecenéfalo-metencéfalo. Ambos factores fueron microinyectados a la vez, lo cual lo abreviamos como Lmx1b.1-2MO, para evitar la traducción de la proteína Lmx1b.1 y Lmx1b.2 a la vez y ver los efectos de cocaína sobre sus genes diana *th* y *nurr1*. Igualmente para los morfolinós Otpa y Otpb, se microinyectaron al mismo tiempo y lo abreviamos como Otpa-bMO. Las secuencias de los morfolinós fueron tomadas del estudio realizado en pez cebra por Ryu y cols. (Ryu y cols., 2007). Los grupos microinyectados por los respectivos morfolinós se dividieron en dos, el primer grupo de solo microinyectados (Lmx1b.1-2MO y Otpa-bMO) y el segundo grupo al cual expusimos a clorhidrato de cocaína cuando alcanzaron las 5hpf y los denominamos como Lmx1b.1-2MO cocaína y Otpa-bMO cocaína respectivamente. También presentamos un grupo control con embriones sin microinyector (Control) y un grupo control morfolino (MO control) al cual se le microinyectó medio E3. El objetivo del grupo MO control fue para controlar, que los efectos de cambio de expresión de los genes que estudiamos eran debido a la acción de los morfolinós y no por el hecho del acto de microinyectar. La microinyección del DNA (3'UTR Pitx3) se realizó empleando el mismo procedimiento que el de los morfolinós con la salvedad que se microinyectó en la célula del embrión y a una concentración de 250ng/ul, la secuencia de los oligos empleados se observan en la tabla 5.

Morfolinos	Secuencia nucleotídica	Concentración	Referencia
Otpa	ATCAGACTGCACCGCACTCACCTGC	1uM	Ryu y cols., 2007
Otpb	CGCTCCAGGGCGAAATGCTTTTCCA	1uM	Ryu y cols., 2007
Lmx1b.1	CTTCGATTTTTATACCGTCCAACAT	1uM	O'Hara y cols., 2005
Lmx1b.2	CCTCAATTTTGATTCCGTCCAGCAT	1uM	O'Hara y cols., 2005

Tabla 6. Secuencia de los morfolinos empleados en el presente trabajo de investigación, se muestra además la concentración empleada y las referencias en la que fueron empleadas para su estudio en el pez cebra.

3.16. Análisis de las imágenes

Las imágenes obtenidas por técnicas de la *ISH* e *IHC* se han documentado con un estereoscopio Leica de 6X y 12X. Todas las imágenes fueron procesadas con Photoshop CS4 software (Adobe System Inc.) siguiendo los lineamientos establecidos por la prensa de la Universidad Rockefeller.

3.17. Análisis estadístico

Los resultados de la qPCR se representan como media \pm EEM (error estándar de la media). Antes de realizar los test de significancia, realizamos el test de normalidad (Shapiro-Kolmogorov) y al ver que nuestro datos obtenidos tenían una distribución normal, empleamos pruebas paramétricas. Al analizar sólo dos grupos, 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 el post-test Tuckey. 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. Windows7, San Diego, CA, EE.UU.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Introducción

El sistema dopaminérgico juega un rol importante en la regulación de la coordinación motora, sistema cognitivo, estado anímico, comportamiento asociado a la recompensa, regulación endocrina (Wise, 2004) y algunos procesos patológicos como la enfermedad de Parkinson (Burton y Calne, 1984; Cranwell-Bruce, 2010) y esquizofrenia (Stip, 2006; Garris y cols., 1997). Asimismo, el sistema dopaminérgico está muy relacionado con los procesos de adicción y recompensa que produce la cocaína (Prakash y Das, 1993; Ronnekleiv y Naylor, 1995; Chao y Nestler, 2004).

En el presente trabajo, estudiamos el efecto de la cocaína sobre el sistema dopaminérgico analizando los receptores dopaminérgicos, los factores de transcripción relacionados en la formación de las neuronas dopaminérgicas y el miR-133b que regula la actividad de uno de los factores de transcripción, durante el desarrollo embrionario del pez cebra. La importancia que tiene este estudio se basa en que los efectos que produce la cocaína en los embriones de pez cebra simulan en cierta manera lo que está sucediendo cuando una madre embarazada consume cocaína y qué efectos tendría la droga sobre el embrión o el feto. Puesto que el desarrollo del pez cebra se realiza en el exterior nos permite monitorizar a tiempo real los efectos que produce la cocaína. Por lo tanto, el pez cebra representa un buen modelo para evaluar fármacos o drogas que se empleen durante el embarazo y posiblemente los resultados obtenidos pueden extrapolarse a los mamíferos.

Objetivos

Los resultados obtenidos en este trabajo están organizados de acuerdo a los objetivos planteados:

Objetivo 1: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los receptores dopaminérgicos, *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Objetivo 2: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de la tirosina hidroxilasa (*th*) y del transportador de dopamina (*dat*) en embriones, de 24 y 48 hpf, de pez cebra.

Objetivo 3: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los factores de transcripción relacionados con el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y del gen relacionado a nodal *ndr2*, en embriones, de 24 y 48 hpf, de pez cebra.

Objetivo 3.1: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los factores de transcripción *pitx3* y *nurr1*.

Objetivo 3.2: Estudiar el efecto de la cocaína en la expresión temporal y espacial de los factores de transcripción *Imx1b.1*, *Imx1b.2*.

Objetivo 3.3: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal del factor de transcripción *otpa* y *otpb*.

Objetivo 3.4: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de *ndr2*.

Objetivo 4: Determinar los efectos del silenciamiento del miR-133b sobre la expresión del factor de transcripción *pitx3* y los receptores dopamiérgicos *drd2a* y *drd2b* en el pez cebra.

Objetivo 5: Determinar la expresión temporal y espacial del miR-133b y observar los efectos de la cocaína en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra.

Objetivo 6: Determinar los efectos de la cocaína sobre la distribución de la TH, en embriones, de 24 y 48 hpf, de pez cebra.

Objetivo 7: Inhibir la expresión de los factores de transcripción *Imx1b.1-Imx1b.2* y estudiar el efecto que esto produce en la expresión de *nurr1* y la *th* en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra expuestos a cocaína.

Objetivo 8: Inhibir la expresión de los factores de transcripción *otpa-otpb* y estudiar el efecto que esto produce en la expresión de la *th* en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra expuestos a cocaína.

Objetivo 1. Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los receptores dopaminérgicos, *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

4.1. Expresión de receptores dopaminérgicos durante el desarrollo embrionario del pez cebra.

Con el objeto de analizar la expresión génica de los receptores dopaminérgicos: *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* durante el desarrollo embrionario del pez cebra, hemos utilizado la técnica de qPCR como se describe en la parte de materiales y métodos. Estudiamos el efecto de la cocaína en los estadios claves de la embriogénesis del pez cebra, 8 hpf (gastrulación), 16 hpf (formación de neurómeros, segmentación), 24 hpf (formación de los cinco lóbulos del SNC), 48 hpf (organogénesis de órganos primarios están concluyendo) y 72 hpf (estadio temprano del periodo de larva) (Kimmel y cols., 1995). En estos estadios, los embriones se expusieron a clorhidrato de cocaína y evaluamos su efecto sobre la expresión de los receptores dopaminérgicos, estos resultados se compararon con el grupo control (embriones no expuestos a cocaína). Se utilizó como gen de referencia *ef1 α* , por ser un gen estable que se expresa sin muchas variaciones tras la exposición de fármacos, drogas o agentes externos (Tang y cols., 2007; McCurley y Gallard, 2008; Lin y cols., 2009) y en nuestro caso muestra menores variaciones tras la exposición a cocaína con respecto a otros genes de referencia, como la β -actina y la proteína ribosomal (Rbp13), que se han empleado para estos fines. La expresión de *ef1 α* , en los estadios (8, 16, 24, 48 y 72 hpf) estudiados está entre 1,5 - 2 millones de copias de cDNA (Fig. 30 y Tabla en anexo 1), que es lo establecido para los genes de referencia que están presentes en todas la células del organismo (Casadei y cols., 2011). Una vez que determinamos que *ef1 α* no

grupo control. Una vez que determinamos que *ef1 α* no presenta variaciones estadísticamente significativas por efecto de la cocaína, estudiamos la expresión génica de los receptores dopaminérgicos *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* durante el desarrollo embrionario del pez cebra, en los estadios antes descritos y los resultados obtenidos fueron normalizados en relación a *ef1 α* en todos los casos.

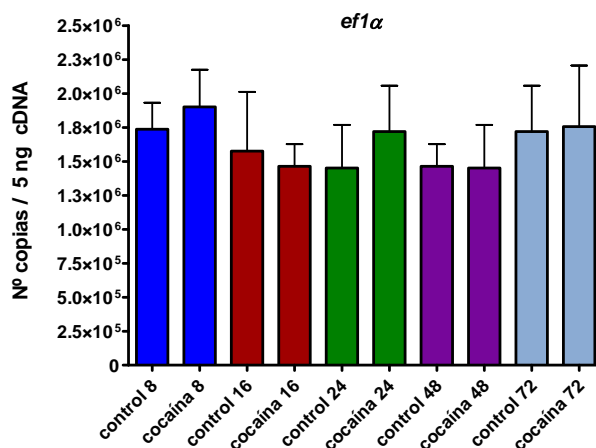


Fig. 30. Representación gráfica de la cuantificación absoluta de *ef1 α* del pez cebra en desarrollo expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína y el grupo control. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *ef1 α* \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno de ellos se realizó por triplicado. Prueba de T-Student de dos colas para muestras independientes.

El receptor *drd1* muestra un aumento de su expresión en los estadios de 8, 16, 48 hpf y una disminución a las 72 hpf en los embriones expuestos a cocaína, presentando una mayor expresión basal a las 72 hpf, seguido por las 24 y 48 hpf (Fig. 31 y Tabla en anexo 2). En el caso de la expresión del receptor dopaminérgico *drd2a* se observa un aumento progresivo de su expresión basal conforme avanza el desarrollo embrionario, alcanzando el máximo pico a las 72 hpf semejante a la expresión de *drd1*. La exposición de los embriones de pez cebra a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína produce una disminución a las 8 y 72 hpf (que es estadísticamente significativo), mientras que a las 24 y 48 hpf la cocaína induce un aumento de la expresión del receptor *drd2a* (Fig. 31B), siendo estos cambios también estadísticamente significativos. En el caso del receptor *drd2b* (Fig. 31C), podemos observar que a diferencia del receptor *drd2a* la exposición a cocaína produjo una disminución de su expresión a las 24 y 48 hpf y un aumento a las 72

hpf, siendo estos cambios estadísticamente significativos. La expresión basal de *drd2b* a las 24, 48 y 72 hpf es la mayor con respecto al resto de estadios estudiados, sugiriendo una participación relevante de este receptor durante el desarrollo. Por otro lado la expresión del receptor *drd3* (Fig. 31D) se afecta, por la exposición de la cocaína, a partir de las 48hpf donde muestra un incremento significativo, mientras que a las 72hpf se observa una disminución de su expresión. El número de copias de cDNA de los receptores dopaminérgicos se muestra en la tabla del anexo 2.

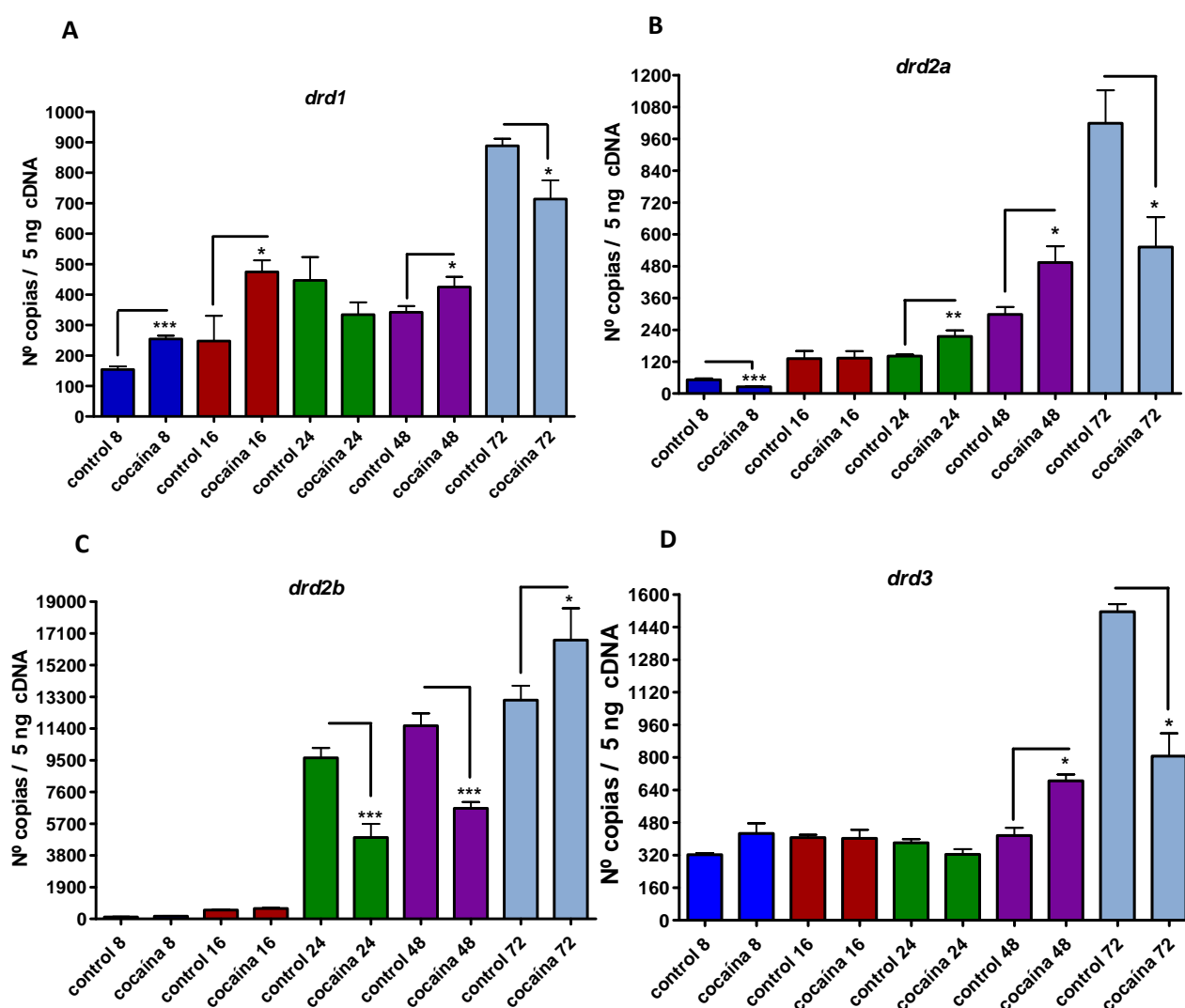


Figura 31. Expresión temporal de los receptores dopaminérgicos: *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* en embriones de las 8, 16, 24, 48 y 72 hpf de pez cebra. En todos los casos estudiamos embriones del grupo control y expuestos a 1.5μM de clorhidrato de cocaína. A) Expresión del receptor dopaminérgico *drd1*. B) Expresión del receptor *drd2a*. C) Expresión del receptor *drd2b*. D) Expresión del receptor *drd3*. Cada barra representa el promedio de número de copias de cDNA ± Error Standard de la Media (EEM). Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo estudiado. Por cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno de ellos se realizó por triplicado. Prueba *t-Student* de dos colas para muestras independientes. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Los receptores dopaminérgicos del pez cebra *Drd1*, *Drd2a*, *Drd2b*, *Drd2l*, *Drd3*, *Drd4a*, *Drd4b*, *Drd4rs* (Li y cols., 2007; Boehmler y cols., 2004; Boehmler y cols., 2007) (Tabla 1) tienen una alta homología a los receptores dopaminérgicos de mamíferos (48-71%) (Tabla 2). En los mamíferos se han identificado 5 tipos de receptores dopaminérgicos que están divididos en dos familias farmacológicas denominadas como D1 y D2, estos receptores son miembros de la familia de receptores acoplados a la proteína G, con siete dominios transmembrana (Probst y cols., 1992). Los receptores de la familia D1, presentan dos subtipos D1 y D5 acoplados a la proteínas $G\alpha s/ G\alpha olf$ y estimulan la formación de cAMP como principal segundo mensajero de transducción de señales intracelulares. Los subtipos pertenecientes a la familia D2 son D2, D3 y D4, los cuales están unidos a las proteínas $G\alpha i$ y $G\alpha o$ e inhiben la formación de cAMP (Missale y cols., 1998; 1993, Wise, 2004). Al realizar la filogenia de los receptores dopaminérgicos del pez cebra junto con los de los mamíferos, estos receptores se alinean en las dos grandes familias de receptores dopaminérgicos y en los subtipos específicos (Fig. 32 y 33). Asimismo, se delimitan claramente de los receptores de los mamíferos, indicando que las diferencias farmacológicas podrían deberse al desarrollo evolutivo de los receptores dopaminérgicos y confirmando así que pez cebra es un buen modelo para el estudio del sistema dopaminérgico fisiológica o fisiopatológicamente. La historia evolutiva de los árboles filogenéticos se dedujo por el método de Neighbor Joining (NJ) (Fig. 32) y Maximum Likelihood (ML) (Fig. 33), para corroborar que la alineación de los receptores es debido a la secuencia de sus aminoácidos y no por un artefacto del método empleado. Los métodos utilizados muestran una alineación similar de los receptores del pez cebra con la de los mamíferos (Fig. 32 y 33). A diferencia de los mamíferos, el pez cebra no presenta un ortólogo del receptor dopaminérgico D5.

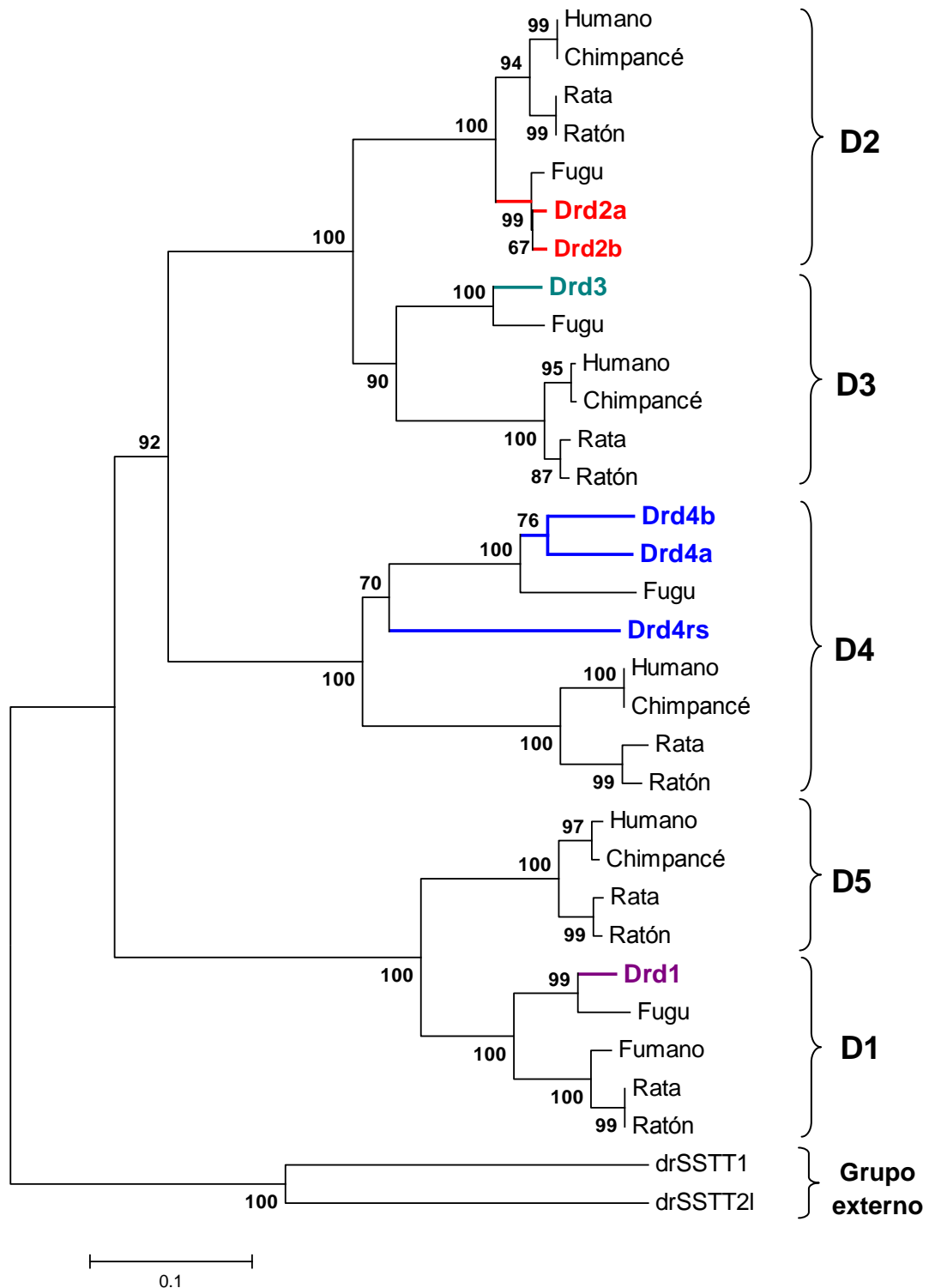


Fig. 32 Análisis filogenético de los receptores dopaminérgicos en diferentes especies basado en el método de NJ (Saitou y Nei, 1987). El árbol filogenético se enraizó con los receptores de somatostatina 1 y 2 (drSSTT1 y drSSTT2). El porcentaje de replicaciones que se muestran a partir de los taxones estudiados se muestran al lado izquierdo de las ramas e indican la robustez de estas (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas fueron calculados por la p-distancia (escala mostrada en la parte inferior) (Nei y Kumar, 2000). El análisis evolutivo se llevó a cabo empleando el software MEGA5 (Tamura y cols., 2011).

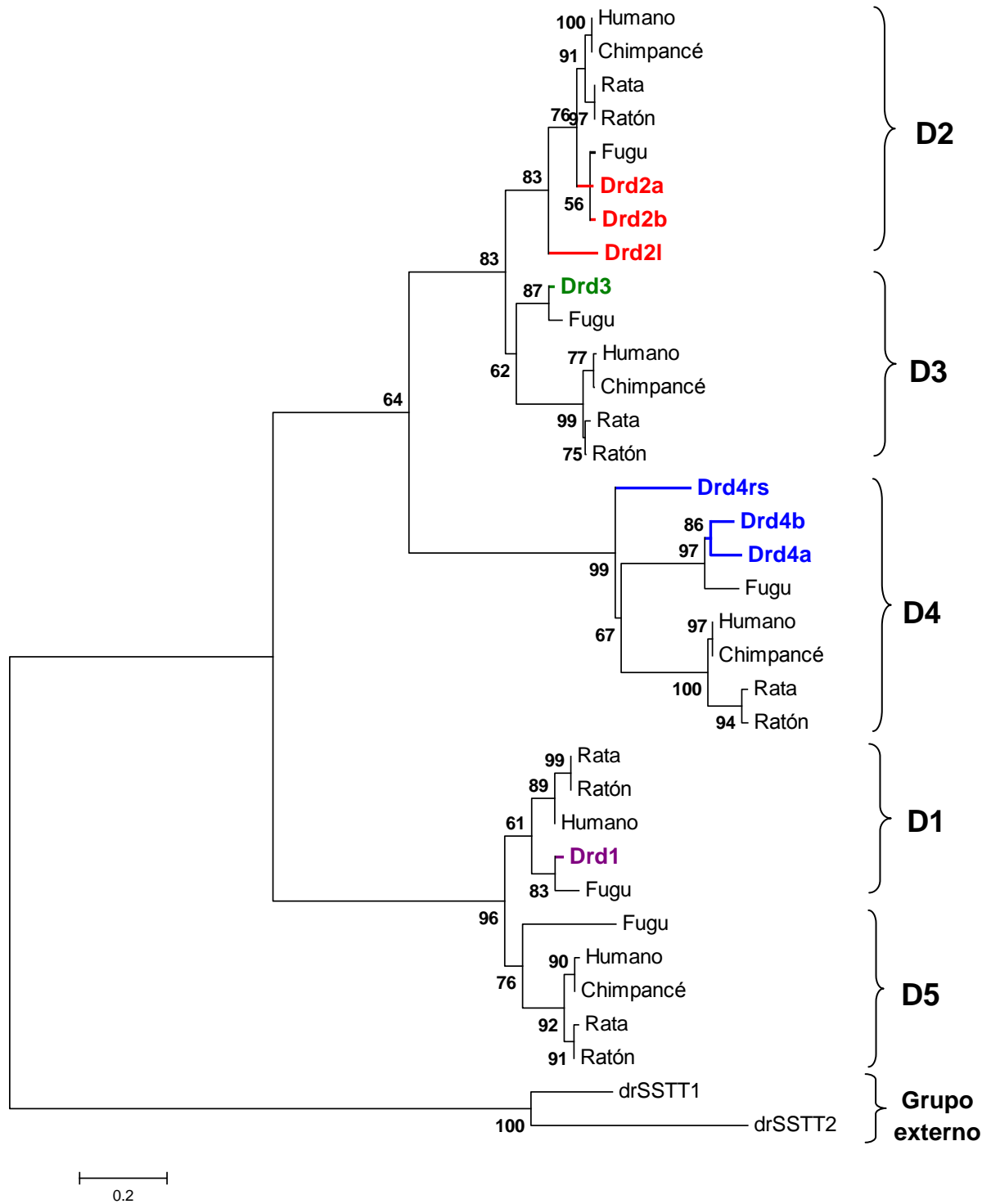


Fig. 33 Análisis filogenético de los receptores dopaminérgicos de diferentes vertebrados utilizando el método Maximum Likelihood (ML) o Máxima verosimilitud, basado en el modelo de la matriz JTT (Jones y cols., 1992). Este análisis nos muestra la reconstrucción más probable que es representativa de la filogenia del grupo. El consenso de la robustez del árbol fue inferido a partir de 1000 replicaciones (Felsenstein, 1985) y se muestra a la izquierda y por debajo de las ramas. El análisis evolutivo se llevó a cabo empleando el software MEGA5 (Tamura y cols., 2011).

Objetivo 2: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de la tirosina hidroxilasa (*th*) y del transportador de dopamina (*dat*) en embriones, de 24 y 48 hpf, de pez cebra.

4.2. Análisis del efecto de la cocaína sobre la expresión de la tirosina hidroxilasa (*th*) y del transportador de dopamina (*dat*)

La TH es la enzima que se encarga de sintetizar la dopamina en las neuronas dopaminérgicas y el DAT es una proteína importante para la recaptación de dopamina del espacio sináptico. El bloqueo de DAT por la cocaína produce un incremento de la dopamina en el espacio extracelular, con la consiguiente alteración de las señales dopaminérgicas. Asimismo, la exposición crónica de cocaína puede inducir cambios de plasticidad sináptica y esto inducir la adicción.

La expresión basal de los mRNA de la *th* y *dat* y el efecto de la cocaína sobre éstos se determinó en los estadios de las 24 y 48 hpf. Enfocamos nuestro estudio en estos estadios por ser dos etapas muy significativas durante el desarrollo del pez cebra. Al igual que en el estudio de los niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos, empleamos como gen de referencia la expresión de *ef1 α* , que presenta pocas variaciones en su expresión tras la exposición de los embriones a clorhidrato de cocaína a las 5 hpf y su posterior estudio a las 24 y 48 hpf. En ningún estadio de desarrollo embrionario (24 y 48 hpf) del pez cebra observamos cambios notorios en la expresión de *ef1 α* , entre el grupo control y el grupo expuestos a cocaína (Fig. 34). El número de copias de cDNA de *ef1 α* es muy alto, en torno a 5,7 millones de copias de cDNA a las 24 hpf y 6,9 millones a las 48 hpf (Tabla en anexo 3). Estos niveles altos de la expresión de *ef1 α* son de esperar en el caso de los genes de referencia que son ubicuos.

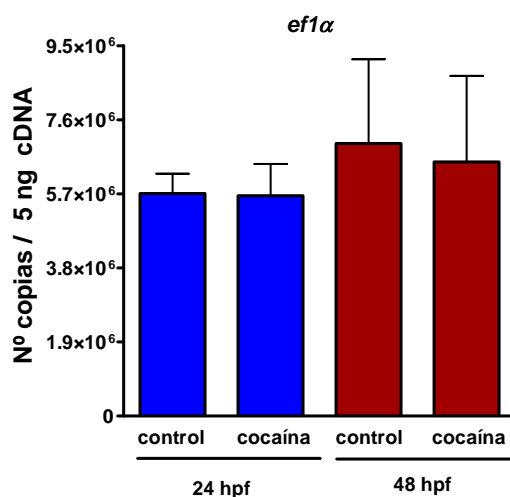


Fig. 34. Representación gráfica de la cuantificación absoluta del *ef1α* en embriones de pez cebra de 24 y 48 hpf, grupo control y expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *nurr1* \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba de *t-Student* de dos colas para muestras independientes.

4. 2.1. Análisis de la expresión de la *th* por efecto de la cocaína

Los embriones expuestos a clorhidrato de cocaína muestran un incremento y una disminución de la *th* a las 24 y 48 hpf, respectivamente (Fig. 35A y Tabla en anexo 4). El incremento de la *th* a las 24 hpf en el grupo cocaína es de casi el doble en relación al grupo control, mientras que a las 48 hpf la disminución es aproximadamente el triple. La expresión basal de *th* a las 48 hpf es mayor con respecto a las 24 hpf, mostrando que la Th podría estar participando de manera activa en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas cuando el embrión ha finalizado la organogénesis primaria, mientras que a las 24 hpf la Th quizá tenga una menor relevancia. La disminución de la *th* a las 48 hpf por efecto de la cocaína nos sugirió, que posiblemente la cocaína esté potenciando una disminución de la *th* en los estadios más tardíos. Por ello, al no saber cuándo se produce el pico máximo de expresión de la *th* en condiciones normales, decidimos determinar el

pico máximo de expresión de la *th* en los estadios de las 42, 44, 46 y 48 hpf (Fig. 35A y Tabla en anexo 4). Nuestras observaciones, muestran que el máximo pico de expresión lo presenta el estadio de las 44 hpf (930 copias de cDNA) y que a partir de este estadio comienza a disminuir la expresión de la *th*. Esto indica que la cocaína podría estar potenciando la disminución de la *th* en el estadio de las 48 hpf (de 755 a 237 copias de cDNA). En todos los estadios estudiados (42, 44, 46 y 48 hpf) (Fig. 35B y Tabla en anexo 4) la cocaína disminuye los niveles de expresión de la *th*, siendo la disminución estadísticamente significativa en casi todos los estadios, con excepción de las 42 hpf (Fig. 35 y Tabla en anexo 4).

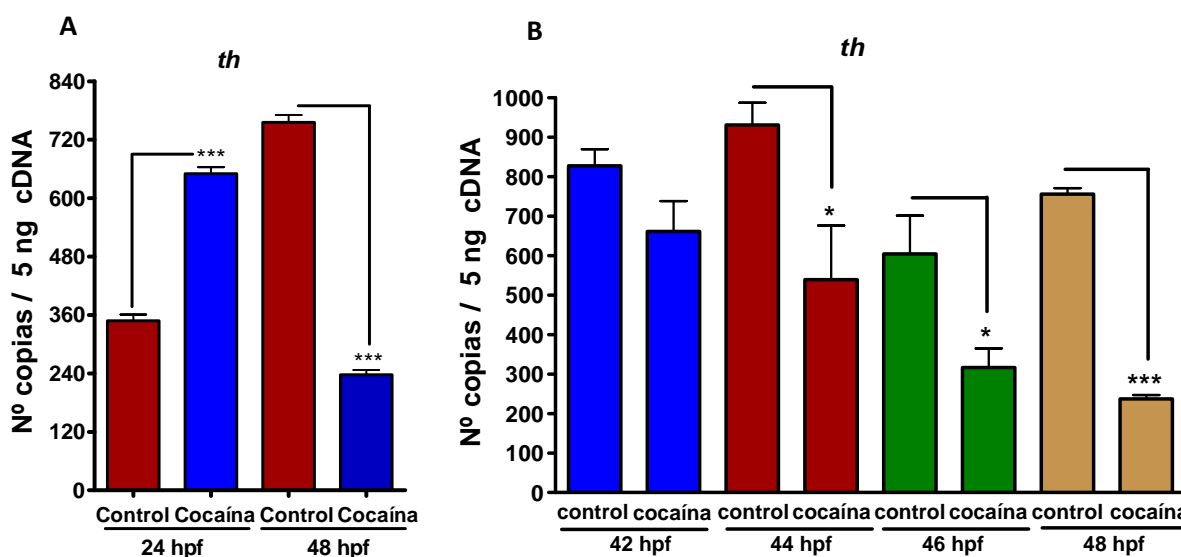


Fig.35 Cuantificación absoluta de la *th* en embriones de pez cebra expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína y el grupo control. A) Expresión de la *th* en estadios de 24 y 48 hpf. B) Expresión de la *th* en los estadios de 42, 44, 46 y 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de la *th* \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba de *t-student* de dos colas para muestras independientes. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

4.2.2. Análisis de la expresión del *dat* por efecto de la cocaína.

En el estadio de las 24 hpf, observamos que el transportador de dopamina presenta unos niveles de expresión de mRNA menor que a las 48 hpf y de manera similar que la *th* los embriones de pez cebra expuestos a cocaína mostraron un incremento y disminución del *dat* a las 24 y 48 hpf, respectivamente, siendo en ambos casos los cambios de expresión estadísticamente significativos (Fig.36 A y tabla en anexo 5). La disminución del *dat* a las 48 hpf por efecto de la cocaína nos sugirió, de manera semejante que para la *th*, que el *dat* pudiese haber alcanzado un pico de expresión en estadios anteriores a las 48 hpf y que el efecto de la cocaína podría ser por una mayor inducción de la disminución del *dat* fisiológicamente. Por ello, con el fin de determinar si el pico máximo de expresión del *dat* en grupos control y expuestos a cocaína se daba cerca de las 48hpf, decidimos estudiar la expresión del *dat* en los estadios de las 42, 44, 46 y 48 hpf (Fig. 36 B y Tabla en anexo 5).

Nuestros resultados muestran que el *dat* se expresa de manera casi similar, durante los estadios de 42 y 48 hpf, siendo estos los picos más altos, mientras que a las 44 y 46 hpf se observa una menor expresión (con respecto a las 42 y 48 hpf), siendo el estadio de las 44 horas el que presenta una menor expresión basal con respecto a todos. El clorhidrato de cocaína, en los estadios estudiados de 42, 44, 46 y 48 hpf induce una disminución de la expresión del *dat*, que es estadísticamente significativo. Esto demuestra que la cocaína induce un aumento del *dat* en estadios tempranos y una disminución en estadios tardíos en embriones de pez cebra.

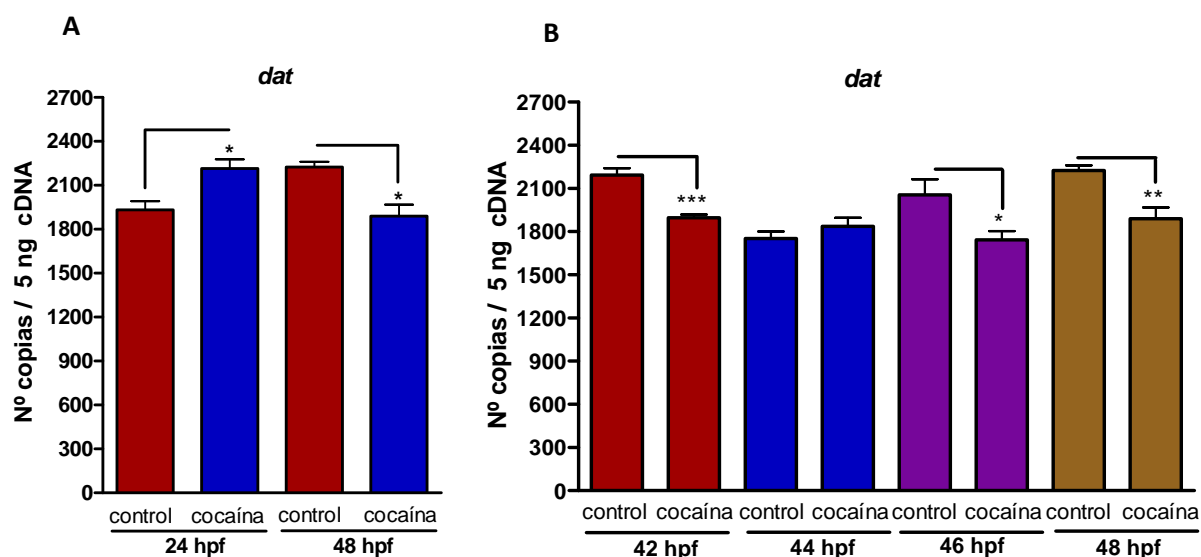


Fig. 36 Representación gráfica de la cuantificación absoluta del *dat* en embriones de pez cebra. A) Influencia de la cocaína en la expresión del *dat* en embriones de 24 y 48 hpf grupo control y expuestos a cocaína B) Expresión del *dat* en los estadios de 42, 44, 46 y 48 hpf en embriones expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína y el grupo control. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de RNA del *dat* \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba *t-Student* de dos colas para muestras independientes. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Objetivo 3. Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los factores de transcripción relacionados con el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas y del gen relacionado a nodal *ndr2*, en embriones, de 24 y 48 hpf, de pez cebra.

4.3. Análisis de la expresión de *nurr1*, *pitx3*, *lmx1b.1*, *lmx1b.2*, *otpa*, *otpb* y *ndr2* por efecto de la cocaína

A medida que fuimos desarrollando este trabajo de investigación encontramos que la cocaína produce alteraciones en la expresión de genes específicos de las neuronas dopaminérgicas como los receptores dopaminérgicos, la *th* y el *dat* en estadios embrionarios relevantes en la formación del SNC y la organogénesis. Por ello, decidimos investigar lo que ocurría con los factores de transcripción que se relacionan con la adquisición del fenotipo dopaminérgico: *Nurr1*, *Pitx3*, *Otp* y

Lmx1b (Ryu y cols., 2007; Sonntag y cols., 2004; Burbach, 2003; Nunez y cols., 2003). Además, investigamos la expresión de *ndr2* (activador de la señalización Nodal), uno de los responsable de la formación de neuronas dopaminérgicas en estadios tempranos de desarrollo en el pez cebra (Del Giacco y cols., 2006).

Objetivo 3.1: *Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de los factores de transcripción *pitx3* y *nurr1*.*

4.3.1. Análisis de la expresión de los factores de transcripción *nurr1* y *pitx3* tras la exposición de clorhidrato de cocaína

El factor de transcripción Nurr1 es requerido para desarrollo y el mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas mesencéfalias (mDA) (Saucedo-Cárdenas y cols., 1998; Zetterstromön y cols., 1997), para la expresión de la TH, la formación del transportador vesicular monoaminérgico 2 (VMAT2) y el transportador de dopamina (DAT) (Wallen y cols., 2001; Smits y cols., 2003). Por otro lado, el factor de transcripción Pitx3 es requerido para la expresión de las neuronas dopaminérgicas en la parte compacta de la sustancia negra (SNpc) y en el VTA (Hwang y cols., 2003; Maxwell y cols, 2005), interviene también en el desarrollo y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Nunes y cols., 2003; Van den Munckhof y cols., 2003)

Dada la importancia de Nurr1 y Pitx3, estudiamos la expresión del mRNA de estos factores de transcripción a las 24 y 48 hpf, tras la exposición de cocaína a los embriones de pez cebra a las 5 hpf. Nuestros resultados muestran que la cocaína induce un aumento de la expresión de *nurr1* a las 24 hpf (de 686 a 973 copias de cDNA), mientras que en el estadio más tardío de las 48 hpf disminuye su expresión (de 3587 a 1982 copias de cDNA) (Fig. 37 A y Tabla en anexo 6), siendo estos cambios en ambos casos estadísticamente significativos. En relación a *pitx3*, la

cocaína produce un incremento y una disminución de su expresión a las 24 y 48 hpf, respectivamente. A las 24 hpf *pitx3* incrementa de 1763 a 2022 copias de cDNA y a las 48 hpf disminuye de 6418 a 3360 copias de cDNA (Fig. 37 B y Tabla en anexo 6). Por otro lado, *pitx3* tiene una mayor expresión basal a las 24 y 48 hpf con respecto a la expresión de *nurr1*, indicando que *pitx3* puede ser clave en los estadios de desarrollo embrionario de las 24 y 48 hpf del pez cebra.

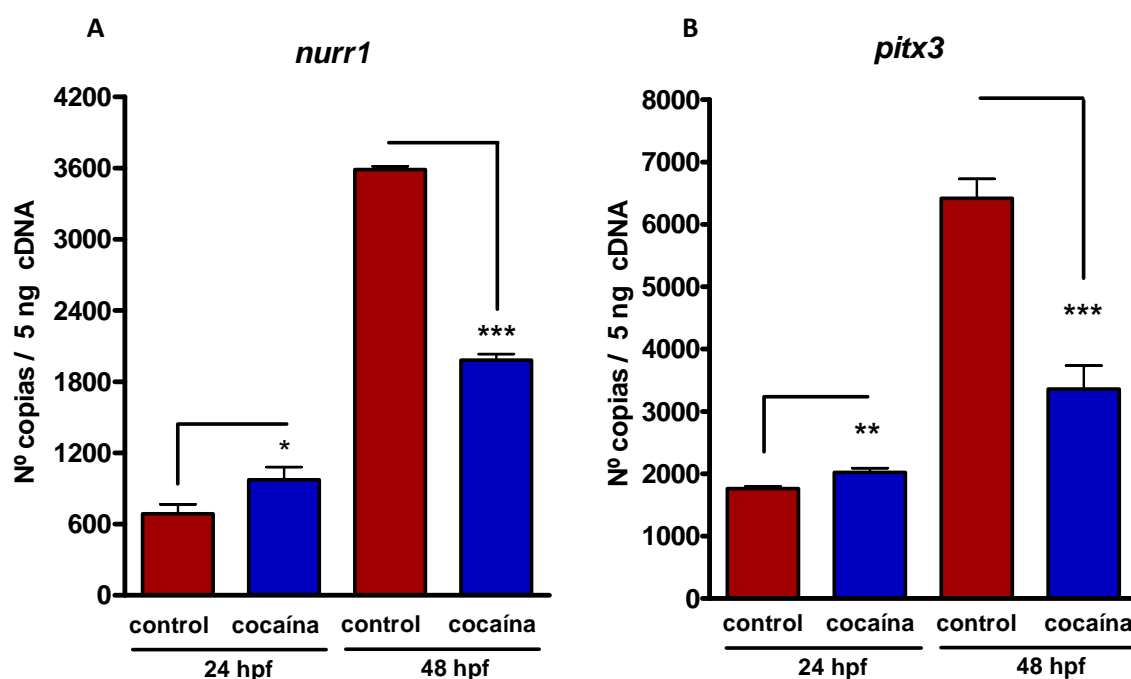


Fig. 37. Cuantificación absoluta de cDNA de *nurr1* (A) y de *pitx3* (B) de embriones de peces cebra a las 24 y 48 hpf. Los embriones fueron estudiados en los grupos expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína y el grupo control. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *nurr1* y *pitx3* en cada estadio \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba t-Student de dos colas para muestras independientes. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Objetivo 3.2: Estudiar el efecto de la cocaína en la expresión temporal y espacial de los factores de transcripción *lmx1b.1*, *lmx1b.2*

4.3.2. Análisis de la expresión temporal de los factores de transcripción *lmx1b.1* y *lmx1b.2* por efecto de la cocaína

El factor de transcripción *Lmx1b* presenta un rol importante en el desarrollo del SNC. Su expresión previa a la aparición de células positivas a *Nurr1* y *Pixt3* sugieren que *Lmx1b* pueda actuar como un activador de estos genes y estar asociado con la preparación espacial para el origen y diferenciación del sistema dopaminérgico mesencefálico (Smidt y cols., 2000). En el pez cebra existen dos ortólogos de *Lmx1b* los cuáles se denominan *Lmx1b.1* y *Lmx1b.2*, ambos son necesarios para la mantención del límite mesencéfalo rombencéfalo (MHB) en el pez cebra (O'Hara y cols., 2005). Por la importancia de este factor en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas nos propusimos estudiar el efecto de la cocaína en la expresión de *lmx1b.1* y *lmx1b.2* a las 24 y 48 hpf (Fig. 38).

Nuestros resultados muestran que la cocaína indujo cambios en la expresión de los factores de transcripción *lmx1b.1* y *lmx1b.2*, ambos factores presentan un incremento de sus niveles de expresión en los grupos expuestos a cocaína con respecto al grupo control. A las 24hpf, *lmx1b.1* incrementa su expresión de 2290 a 3178 copias de cDNA (Fig. 38 A y Tabla en anexo 7) y *lmx1b.2* de 1343 a 1835 copias de cDNA (Fig. 38 B y Tabla en anexo 7). Estos cambios de expresión a las 24 hpf son estadísticamente significativos. A las 48 hpf, ambos factores *lmx1b.1* y *lmx1b.2* muestran un incremento en su expresión en los grupos expuestos a cocaína, no obstante solamente el incremento de *lmx1b.2* (de 1760 a 2483 copias de cDNA) es estadísticamente significativo (Fig. 38 B y Tabla en anexo 7). Llama la atención de que la expresión basal de *lmx1b.1* tanto a las 24 y 48 hpf con respecto

a *Imx1b.2* es de casi el doble, indicando que este factor de transcripción, *Imx1b.1*, que se expresa en mayor cuantía, frente a su parálogo, presente una mayor actividad durante los estadios de desarrollo del pez cebra. Asimismo, el que *Imx1b.2* se exprese en menor cantidad sugiere que este factor de transcripción tenga una acción diferente o que complemente la actividad de *Imx1b.1*.

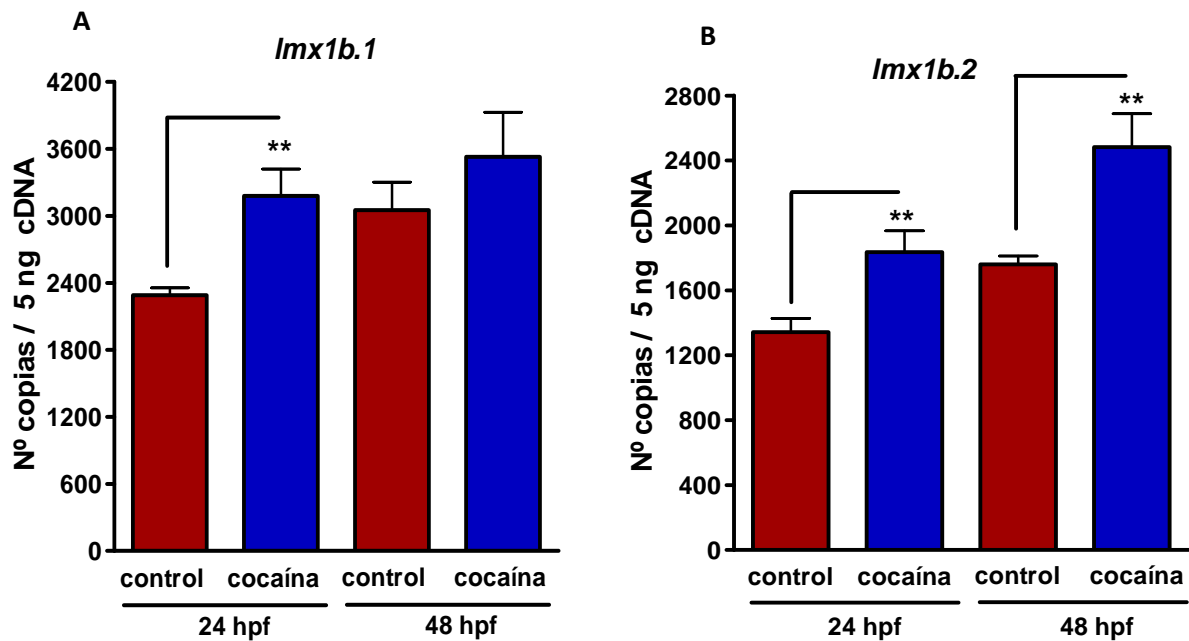


Fig. 38 Representación gráfica de la cuantificación absoluta de cDNA de los factores de transcripción *Imx1b.1* (A) y *Imx1b.2* (B) en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra. Los niveles de expresión de *Imx1b.1* y *Imx1b.2* en embriones expuestos a 1.5 µM de clorhidrato de cocaína se comparó con el grupo control respectivo. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *Imx1b.1* y *Imx1b.2* ± EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno de ellos se desarrolló por triplicado. Prueba de t-Student de dos colas para muestras independientes. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

4.3.3. Distribución del factor de transcripción *lmx1b.1* y *lmx1b.2* en embriones de 24 y 48 hpf expuestos a cocaína.

En la preparación espacial para el origen y diferenciación del sistema dopaminérgico mesencefálico el factor de transcripción Lmx1b es clave (Smidt y cols., 2000) y puesto que el pez cebra presenta un duplicado de Lmx1b (*Lmx1b.1* y *Lmx1b.2*) (O'Hara y cols., 2005), nos propusimos, además cuantificar su expresión por qPCR absoluta (Fig. 38 A y B y Tabla en anexo 7), estudiar el efecto del clorhidrato de cocaína sobre el patrón de distribución espacial de *lmx1b.1* y *lmx1b.2* tanto a las 24 como a las 48 hpf.

Factor de transcripción *lmx1b.1*

En una vista lateral del embrión *in toto*, en el estadio de las 24hpf de desarrollo, observamos que *lmx1b.1* tiene una distribución localizada en el SNC y más difusamente en la periferia, como los somitos (Fig. 39 A). En una vista más ampliada del encéfalo, se aprecia que *lmx1b.1* se encuentra puntualmente distribuido en el diencéfalo ventral, límite entre el mesencéfalo rombencéfalo (MHB) y en la vesícula óptica (Fig. 39 C). Las vistas dorsales del embrión entero (Fig. 39 E), así como del encéfalo (Fig. 39 G) muestran que *lmx1b.1* se distribuye en el diencéfalo y en los somitos. Los embriones expuestos a 1,5uM de clorhidrato de cocaína muestran una mayor expresión de *lmx1b.1* a nivel de diencéfalo ventral, MHB y en el área de la vesícula óptica (Fig. 37 B, D, F, H). Por otro lado, la cocaína indujo una disminución de la expresión de *lmx1b.1* a nivel de los somitos (Fig. 39 B y D).

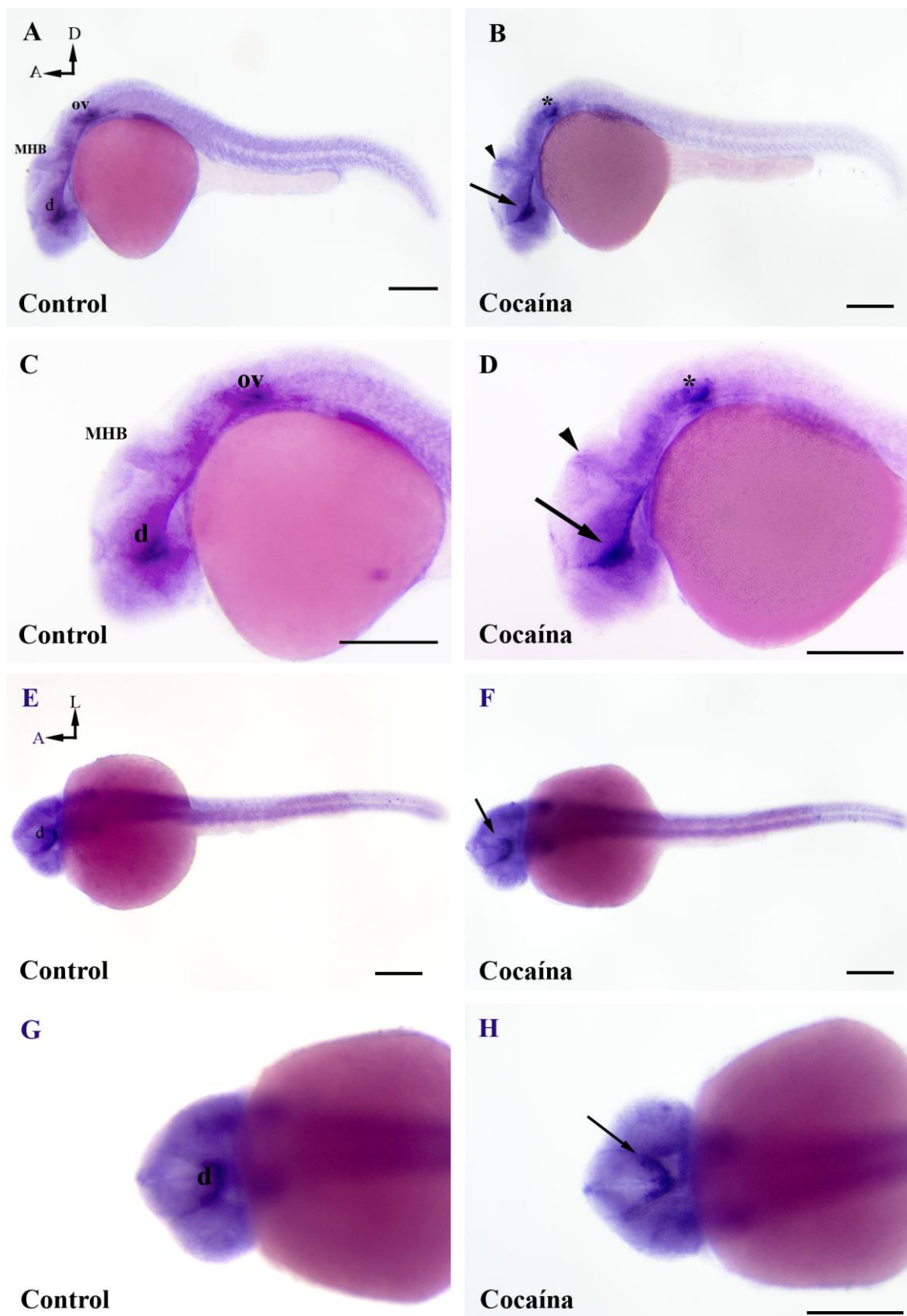


Fig. 39. Distribución del factor de transcripción *Imx1b.1* en embriones *in toto* de 24 hpf por ISH. A, B, C, D vista lateral. E, F, G, H: vista dorsal. A y C) Expresión de *Imx1b.1* en embriones del grupo control. B y D) Expresión de *Imx1b.1* en embriones expuestos a cocaína. En las figuras B y D la flecha y cabeza de flecha indican el aumento de expresión de *Imx1b.1* en diencéfalo y MHB, respectivamente. En las figuras F y H, la flecha indica incremento de *Imx1b* en el diencéfalo. MHB: límite mesencéfalo rombencéfalo (cabeza de flecha), ov: vesícula ótica (asterisco), vd: diencéfalo ventral (flecha). A: anterior; D: dorsal; L: lateral. Escala de 300 μ m. A, B, E y F: 6X; C, D, G y H: 10X.

Cuando ha finalizado el periodo de la organogénesis primaria, 48hpf, observamos que *Imx1b.1* se expresa en las mismas regiones que a las 24hpf, en el diencéfalo ventral, MHB, la vesícula ótica (Fig. 40 A y C). La distribución que presenta *Imx1b.1*, a diferencia de las 24 hpf, es que está mucho más focalizada en el SNC y con ningún marcaje en la periferia. Una vista dorsal también muestra la presencia *Imx1b.1* en el diencéfalo ventral, MHB y vesícula ótica (Fig. 40 E). Los embriones expuestos a clorhidrato de cocaína muestran un incremento en la expresión de *Imx1b.1* en el diencéfalo ventral, MHB, la vesícula ótica (Fig. 40 B y D). La vista dorsal de los embriones expuestos a cocaína muestra de manera más detallada el cambio en el patrón de expresión de *Imx1b.1* en el diencéfalo ventral, MHB y la vesícula ótica. A diferencia del estadio de las 24 hpf, a las 48 hpf no observamos expresión de *Imx1b.1* en los somitos. (Fig. 40 B, D y F).

Este incremento de *Imx1b.1* a las 24 y 48 hpf en las zonas descritas en los párrafos anteriores por *ISH*, tiene correlación con los resultados de la qPCR, en la que describimos un aumento de la expresión de *Imx1b.1* por efecto de la cocaína (Fig. 38 A y Tabla en anexo 7).

Esta expresión de *Imx1b.1* durante las 24 y 48 hpf indica que estos factores de transcripción son muy importantes en el mantenimiento y función de las neuronas dopaminérgicas, formación del músculo esquelético y tendrían un rol clave durante el desarrollo del SNC de los embriones de pez cebra. Asimismo, la expresión espacial de *Imx1b.1* es diferente a las 24 y 48 hpf.

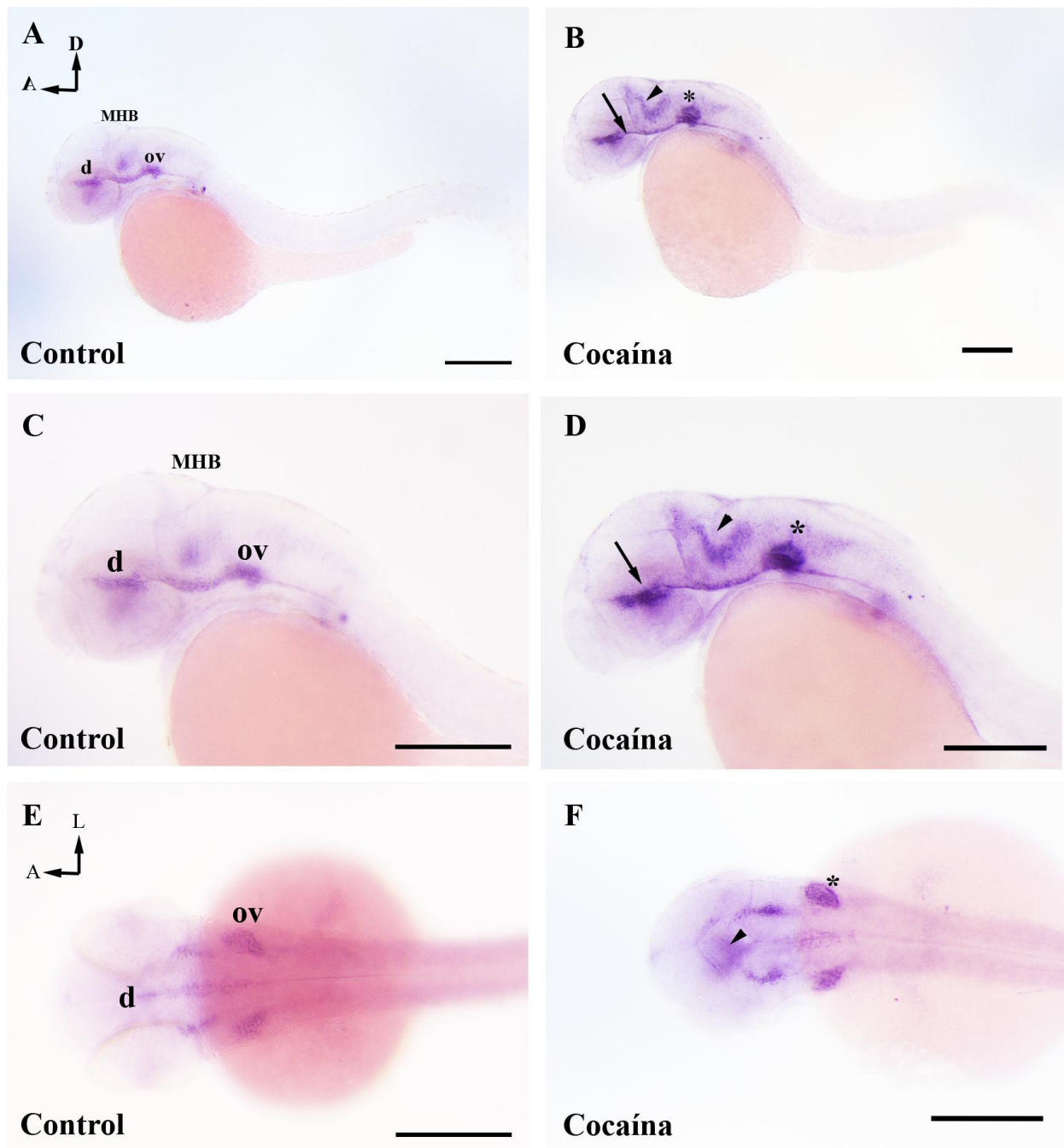


Figura 40. Distribución de *Imx1b.1* a las 48 hpf. En la vista lateral del grupo control (A y C) *Imx1b.1* se expresa localizadamente en el diencéfalo, MHB y vesícula ótica. La vista dorsal muestra también la expresión de *Imx1b.1* en diencéfalo, MHB y la vesícula ótica (E). Los embriones expuestos a cocaína muestran un incremento en la expresión de *Imx1b.1* en el diencéfalo (flecha), MHB (cabeza de flecha) y vesícula ótica (asterisco) según las vistas laterales (B y D). Una vista dorso ventral muestra de manera más clara el incremento de *Imx1b.1* en el diencéfalo, MHB y la vesícula ótica (41 F) con respecto al grupo control (E). d: diencéfalo (flecha), MHB: límite mesencéfalo y rombencéfalo (cabeza de flecha) ov: vesícula ótica (asterisco). A: anterior; D: dorsal; L: lateral. Escala de 300 μ m. A y B: 6X; C, D, E y F: 10X.

Factor de transcripción *lmx1b.2*

El factor de transcripción *Lmx1b.2*, también tiene un rol importante en la formación y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas (O'Hara y cols., 2005) al igual que *Lmx1b.1*. Por la técnica de la *ISH*, observamos que *lmx1b.2* se distribuye a las 24 hpf muy puntualmente a nivel del diencéfalo ventral, MHB y rombencéfalo (Fig. 41 A y C). Una vista dorsal nos ayuda a observar la expresión, desde otra perspectiva, de *lmx1b.2* en el diencéfalo ventral principalmente (Fig. 41 E y G). Los embriones expuestos a clorhidrato de cocaína presentan una mayor expresión de *lmx1b.2* a nivel de MHB y diencéfalo (Fig. 41 B y D) con respecto a los embriones del grupo control (Fig. 41 A y B), este aumento de expresión es mucho más notorio sobre todo a nivel de MHB (Fig. 41 D). El grupo de embriones expuestos a cocaína según las vistas dorsales (al igual que las vistas laterales) muestran un ligero incremento en la expresión de *lmx1b.2* en el diencéfalo (Fig. 41 F y H) con respecto al grupo control (Fig. 41 E y G).

Estos cambios en la expresión espacial de *lmx1b.2* por medio de la técnica de la *ISH* corroboran nuestros resultados hallados por qPCR, en la que la exposición de los embriones de pez cebra a clorhidrato de cocaína induce un aumento en los niveles de expresión de *lmx1b.2* con respecto al grupo control Fig. 38 B y Tabla en anexo 7).

Por otro lado, la expresión de *lmx1b.1* y *lmx1b.2* a las 24 hpf muestran que estos factores se expresan de manera similar en los mismos lugares, salvo excepciones puntuales, lo que indica que estos factores de transcripción puedan tener acciones complementarias durante la formación de las neuronas dopaminérgicas, el desarrollo del SNC y embrionario del pez cebra.

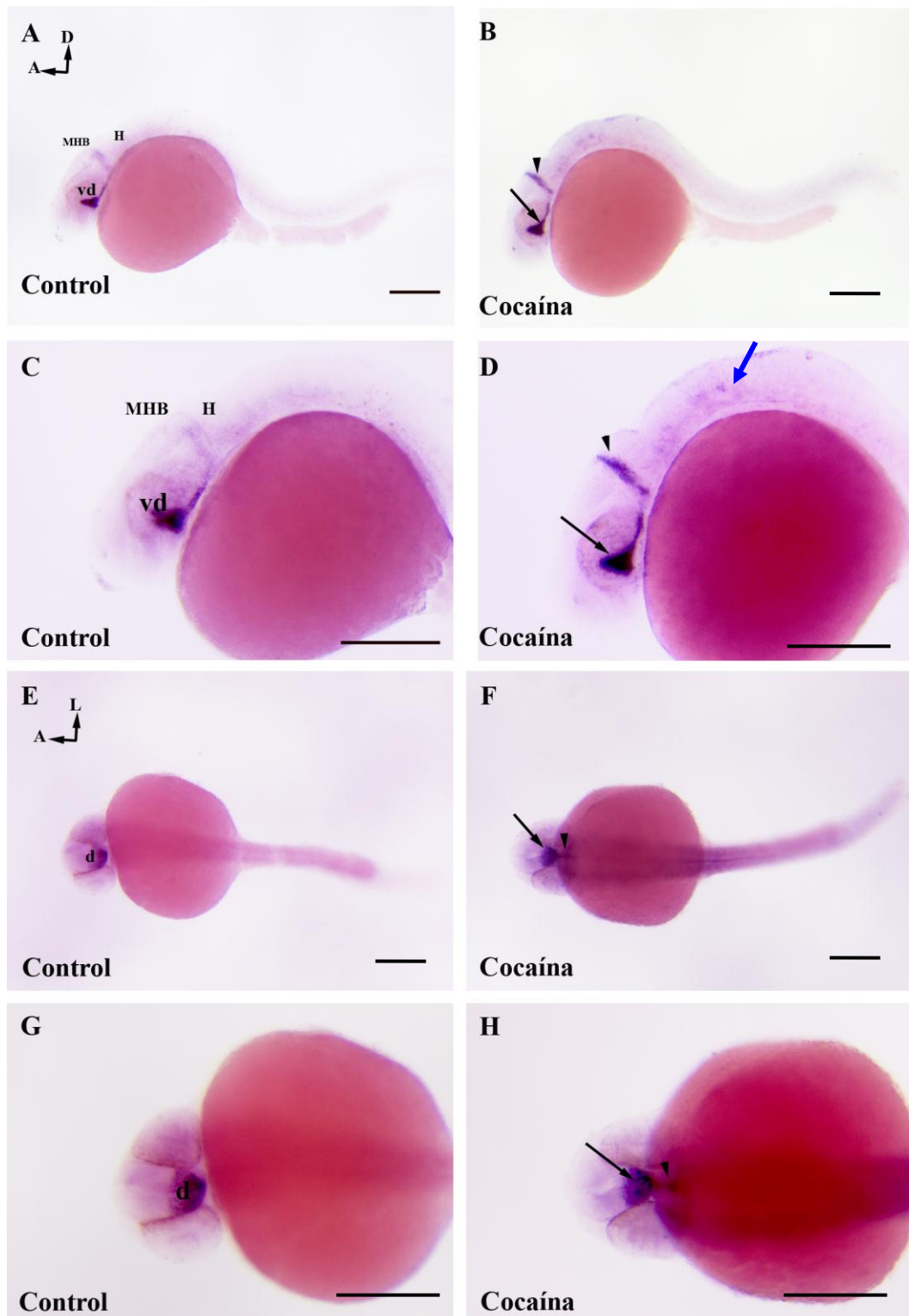


Figura 41. Distribución del factor de transcripción *Imx1b.2* en embriones de 24 hpf. Grupo control (A, C, E y G) y expuestos a cocaína (B, D, F y H). Los embriones expuestos a cocaína muestran un incremento de la expresión de *Imx1b.2* en el diencéfalo (flecha negra) y el MHB (cabeza de flecha) (B y D) con respecto al grupo control (A y C). Asimismo, en los embriones expuestos a cocaína *Imx1b.2* muestra su expresión en la vesícula óptica (flecha azul) (D), cuando en los embriones del grupo control no se expresa (C). En la vista dorsal la cocaína induce un aumento de *Imx1b.2* en el diencéfalo (flecha dorsal) (H) con respecto al grupo control (G). d: diencéfalo; H: rombencéfalo, MHB: límite mesencéfalo y rombencéfalo (cabeza de flecha), ov: vesícula óptica (asterisco), vd: diencéfalo ventral (flecha). Escala de 300 μ m. A: anterior; D: dorsal; L: lateral. A, B, E y F: 6X; C, D, G y H: 10X.

Con respecto a la expresión de *Imx1b.2* a las 48 hpf, las vistas laterales muestran que este factor de transcripción tiene una distribución en el diencéfalo, MHB y rombencéfalo que corresponden a las mismas regiones en las que se expresaba a las 24 hpf). A las 48 hpf, la expresión de *Imx1b.2* en el MHB es muy tenue (Fig. 42 A), así como también en diencéfalo. Algo peculiar en este estadio es que hay una expresión en el fascículo longitudinal medio y rombencéfalo de *Imx1b.2* (Fig. 42 A). En una vista lateral más ampliada es muy evidente la expresión más focalizada de *Imx1b.2* en diencéfalo y MHB (Fig. 42 C) con respecto a las 24 hpf (Fig. 41C). Por otro lado, se muestra una expresión de *Imx1b.2* en rombencéfalo a las 48 hpf (Fig. 42 C), que no se aprecia a las 24 hpf (Fig. 41 C). Una vista dorsal muestra que *Imx1b.2* se expresa en el diencéfalo, HMB y el rombencéfalo (Fig. 42 E). La exposición de los embriones de pez cebra a clorhidrato de cocaína, muestra un incremento en la expresión de *Imx1b.2* en diencéfalo (flecha), MHB (cabeza de flecha) y rombencéfalo (asterisco) (Fig. 42 B y D). Es muy notorio el gran incremento de *Imx1b.2*, por acción de la cocaína, en las zonas descritas con respecto a los embriones del grupo control (Fig. 42 A y C), siendo lo más resaltante la gran expresión de *Imx1b.2* en el rombencéfalo (Fig. 42 A y C (asterisco). La vista dorsal nos ofrece un mejor detalle de como varia el patrón de expresión de *Imx1b.2*, mientras en los embriones control hay poca expresión de *Imx1b.2* en la línea media del rombencéfalo (Fig. 42 E), los embriones expuestos a cocaína presentan una mayor distribución en la línea media del rombencéfalo (Fig. 42 F, este aumento se muestra con un asterisco). Este cambio notorio de *Imx1b.2* en el rombencéfalo puede tener muchas implicancias en la función de las neuronas catecolaminérgicas y el desarrollo adecuado del SNC del pez cebra. Al igual que a las 24 hpf, este incremento de *Imx1b.2* por *ISH* a las 48 hpf, coincide con los resultados encontrados por qPCR, en la cual la cocaína

induce una mayor expresión de *Imx1b.2* con respecto al grupo control Fig. 38 B y anexo 7).

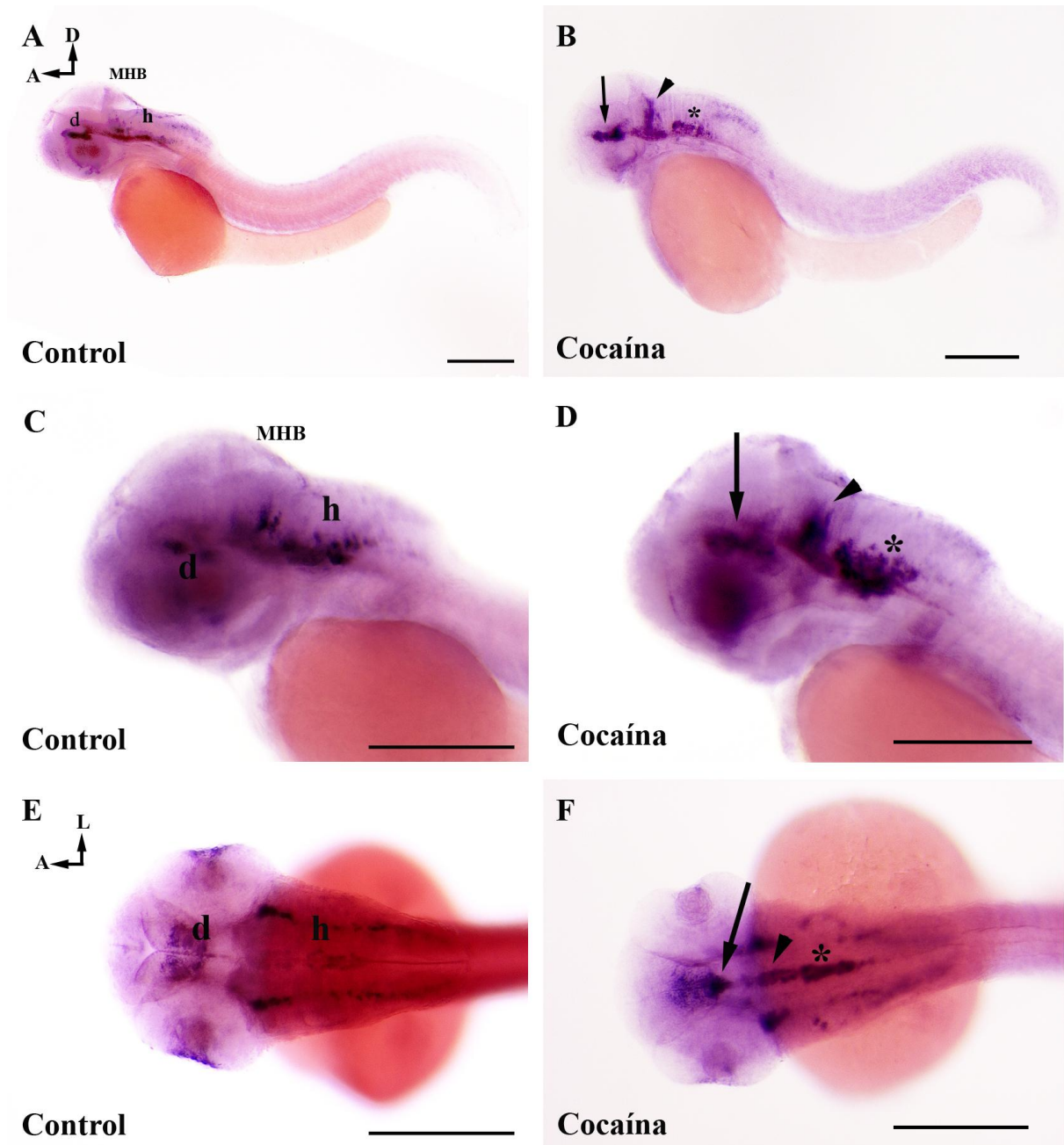


Figura 42. Distribución de *Imx1b.2* a las 48 hpf. Vista lateral (A, B, C y D) y vista dorsal (E y F). Los embriones del grupo control muestran una expresión de *Imx1b.2* en diencéfalo, MHB y rombencéfalo (A, C y E), mientras que en los embriones expuestos a clorhidrato de cocaína se observa un incremento en diencéfalo (flecha), MHB (cabeza de flecha) y en el rombencéfalo (asterisco) (B, D y F). El cambio de patrón de expresión de *Imx1b.2* por acción de la cocaína en diencéfalo (flecha), rombencéfalo (cabeza de flecha) y MHB (asterisco) se puede apreciar muy claramente en una vista dorsal (F) d: diencéfalo (flecha), MHB: límite mesencéfalo y rombencéfalo (cabeza de flecha), H: rombencéfalo. A: anterior; D: dorsal; L: lateral. Escala de 300um. A y B: 6X; C, D, E y F: 10X.

Objetivo 3.3: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal del factor de transcripción *otpa* y *otpb*.

4.3.4. Análisis de la expresión de los factores de transcripción *otpa* y *otpb* tras la exposición de cocaína

La proteína Ortopedia (Otp) es un factor de transcripción que tiene un rol importante en la proliferación, supervivencia, así como en la migración y diferenciación celular para el establecimiento del hipotálamo neuroendocrino (Acampora y cols., 1999), siendo esencial también para el desarrollo de subgrupos específicos de neuronas dopaminérgicas en el diencefalo (Ryu y cols., 2007).

En el pez cebra se han descrito dos ortólogos del gen *otp* de mamíferos: estos se denominan *otpa* y *otpb*, ambos son requeridos coordinadamente para el desarrollo de la mayor parte de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas (Ryu y col., 2007).

En el presente trabajo, por la importancia que presenta este factor de transcripción (Otp) en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas, hemos tomado en cuenta ambos duplicados *Otpa* y *Otpb*. Tras la exposición de los embriones de pez cebra (a las 5 hpf) con clorhidrato de cocaína, estos fueron posteriormente recolectados a las 24 y 48 hpf para la obtención de mRNA y posterior síntesis de cDNA. Nuestros resultados por qPCR muestran que *otpb* muestra una mayor expresión basal de mRNA a las 24 y 48 hpf con respecto a *otpa* (Fig. 43 A y B). La expresión basal de los niveles de expresión de *otpb* es de casi el doble que *otpa* y a las 48 hpf *otpb* alcanza una expresión que llega a ser inclusive 3 veces más a la de *otpa*. Tras la exposición de clorhidrato de cocaína apreciamos que a las 24 hpf la cocaína induce una disminución de ambos factores de transcripción (*otpa* y *otpb*), con respecto al grupo control (Fig. 43 A y B). Sin

embargo, a las 48 hpf la cocaína muestra una acción diferente en cuanto a la expresión de *otpa* y *otpb*. Por una parte incrementa la expresión de *otpa* y por otro lado disminuye la expresión de *otpb*, estos cambios de expresión observados en ambos casos fueron estadísticamente significativos (Fig. 43 A y B y tabla en anexo 8). Esta alteración en la expresión de *otpa* y *otpb* muestra que la cocaína afecta de manera diferente en cada estadio de desarrollo embrionario del pez cebra. El número de copias de cDNA \pm EEM de *otpa* y *otpb* se puede apreciar en la Tabla del anexo 8.

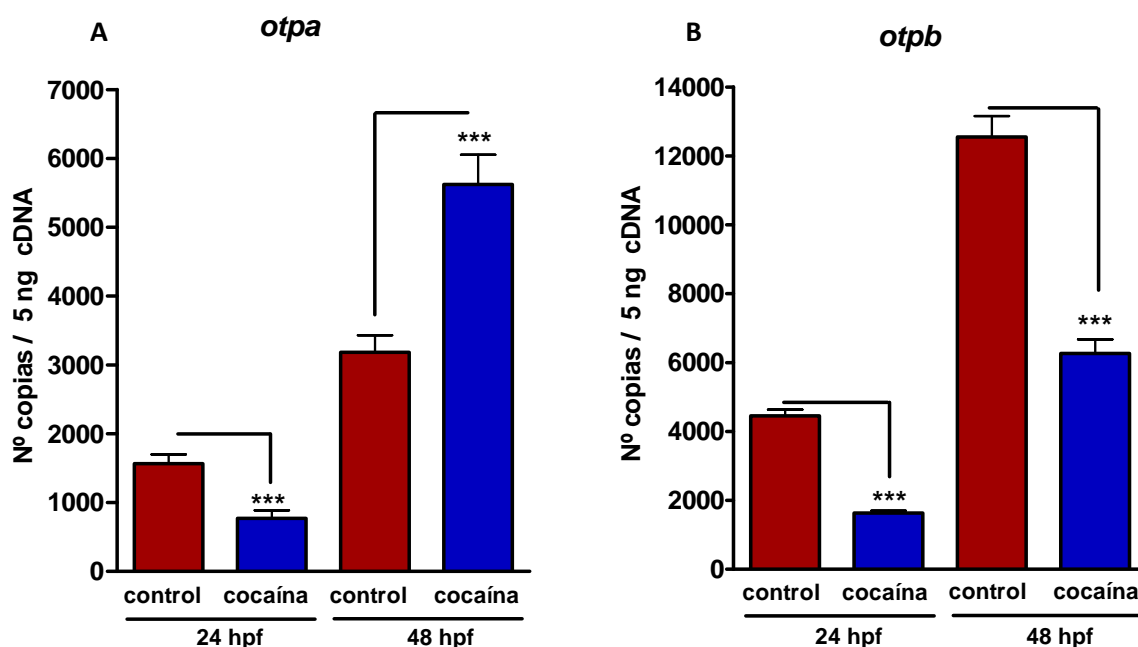


Fig. 43. Cuantificación absoluta del *otpa* (A) y *otpb* (B) en los peces cebra en desarrollo expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína comparados con el grupo control. Doscientos embriones han sido usados para la extracción de RNA y sintetizar el cDNA de los estadios 24 y 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de RNA de *otpa* en cada estadio \pm EEM (error estándar de la media). Para cada estadio se realizaron tres experimentos; * $P \leq 0.05$ (Prueba *T-Student* de dos colas para muestras independientes). *: $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Objetivo 3.4: Determinar el efecto que produce la cocaína en la expresión temporal de *ndr2*.

4.3.5. Análisis de la expresión de *ndr2* tras la exposición de cocaína

La carencia del gen de la proteína Nodal, *ndr2*, (miembro de la familia TGF β), tiene como consecuencia una ausencia completa del cerebro anterior, una severa disminución de las células de la placa de basal del tubo neural, conllevando a una malformación de los derivados del cerebro anterior, fusión de los ojos, eje del cuerpo curvado, y fallo en la extensión axonal dentro de la médula espinal (Tongiorgi, 1999; Aquilina-Beck y cols., 2007). Asimismo, la señalización nodal está implicada en la especificación de grupos dopaminérgicos (Rebagliati y cols., 1998) y diferenciación de los grupos catecolaminérgicos del diencéfalo ventral. Siendo la señalización nodal muy importante en la formación y desarrollo del sistema dopaminérgico, nos propusimos estudiar la expresión de *ndr2*. Tras exponer los embriones de pez cebra a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína a las 5 hpf, analizamos los cambios en la expresión de *ndr2* en los estadios de las 24 y 48 hpf.

Nuestros resultados muestran que hay mayores niveles de expresión basal de *ndr2* a las 24 hpf con respecto a las 48 hpf (Fig. 44 y Tabla en anexo 9). La exposición de los embriones de pez cebra a clorhidrato de cocaína induce una disminución en los niveles de expresión de *ndr2* a las 24 hpf, así como también a las 48 hpf, pero en este último estadio la disminución es menor que a las 24 hpf. En ambos casos, a las 24 y 48 hpf, la disminución de *ndr2* es estadísticamente significativa, $p \leq 0.001$ $p \leq 0.01$, respectivamente. Es interesante resaltar que los niveles basales de expresión del mRNA de *ndr2* es uno de los más bajos en relación a los factores de transcripción estudiados anteriormente: *nurr1* y *pitx3* (Fig. 37 A y B), *otpa* y *optb* (Fig. 38 A y B), *Imx1b.1* y *Imx1b.2* (Fig. 43 A y B).

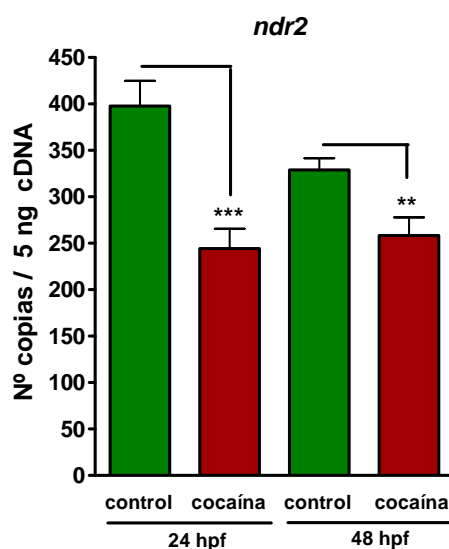


Fig. 44. Representación gráfica de la cuantificación absoluta del *ndr2* en el pez cebra a las 24 y 48 en desarrollo expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína y el grupo control, a las 24 y 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *ndr2* \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba de *t-Student* de dos colas para muestras independientes. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Objetivo 4: Determinar los efectos del silenciamiento del miR-133b sobre la expresión del factor de transcripción *pitx3* y los receptores *drd2a* y *drd2b* en embriones de 24 hpf del pez cebra.

4.4. Efectos del silenciamiento del miR-133b sobre la expresión *drd2a* y *drd2b* y del factor de transcripción *pitx3*

El miR-133b actúa como un regulador negativo del factor de transcripción Pitx3, concretamente en su región 3'UTR (Kim y cols., 2007). Este factor activa la transcripción de genes necesarios para la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas, como la formación de *th* y los receptores dopaminérgicos. Por ello, con el propósito de provocar el silenciamiento del miR-133b, microinyectamos 750 pg de DNA de la secuencia 3'UTR-Pitx3 (en el estadio de una célula del pez cebra). La concentración de 750 pg fue determinada luego de microinyectar diferentes

concentraciones de la secuencia 3'UTR-Pitx3, 1000 pg, 750 pg 500 pg y 250 pg. La microinyección de 1000 pg de 3'UTR-Pitx3 produjo más del 50% de muertes de los embriones y diversas malformaciones, mientras las concentraciones de 750 pg, 500 pg y de 250 pg produjeron una menor letalidad y malformaciones de los embriones, razón por la cual empleamos la concentración de 750 pg de 3'UTR-Pitx3, que fue concentración mínima que produce menor letalidad y un mínimo de malformaciones en los embriones. Luego de microinyectar 750 pg de 3'UTR-Pitx3 en embriones de una célula, a las 5 hpf los embriones fueron expuestos a clorhidrato de cocaína y cuando los embriones alcanzaron las 24 hpf de desarrollo embrionario evaluamos la expresión génica de los receptores dopaminérgicos *drd2a* y *drd2b* y del factor de transcripción *pitx3*.

En todos los casos, la expresión de mRNA de *pitx3*, *drd2a* y *drd2b* fueron normalizados con respecto a la expresión de *ef1 α* , el cual tomamos como gen de referencia (Fig. 45A y Tabla en anexo 10) por presentar una mínima variación en su expresión en los embriones control (sin microinyección de 3'UTR-Pitx3) y microinyectados con la secuencia de DNA de 3'UTR-Pitx3. Observamos que la microinyección de 750 pg de la secuencia 3'UTR-Pitx3 produce un aumento significativo del factor de transcripción *pitx3*, casi el doble con respecto al grupo control (Fig. 45B y Tabla en anexo 10), así como un aumento del receptor *drd2a* (de 146 a 215 copias de cDNA) (Fig. 45C y tabla en anexo 10) y disminución de *drd2b* de casi el doble (Fig. 45D y Tabla en anexo 10). El número de copias de cDNA de *pitx3*, *drd2a* y *drd2b* tras la microinyección de 750 pg de la secuencia 3'UTR-Pitx3 se aprecia en la Tabla en anexo 10. Al microinyectar el diana del mi-133b (el 3'UTR-Pitx3) el exceso de diana interactúa con el miR-133b y de esta manera deja libre el al mRNA de Pitx3 endógeno, produciéndose de esta manera

más Pitx3 que de manera fisiológica. Estos resultados pueden ayudar a explicar el porqué del incremento de *drd2a* a las 24 hpf (Fig. 45C y Tabla en anexo 10), puesto que al haber más *pitx3*, este induce mayor expresión de TH, DAT (Sánchez-Simón y cols., 2010) y receptores dopaminérgicos. En el caso de *drd2b*, observamos una disminución de su expresión, lo que puede indicar que el factor de transcripción Pitx3 lo regule negativamente en el estadio de las 24 hpf.

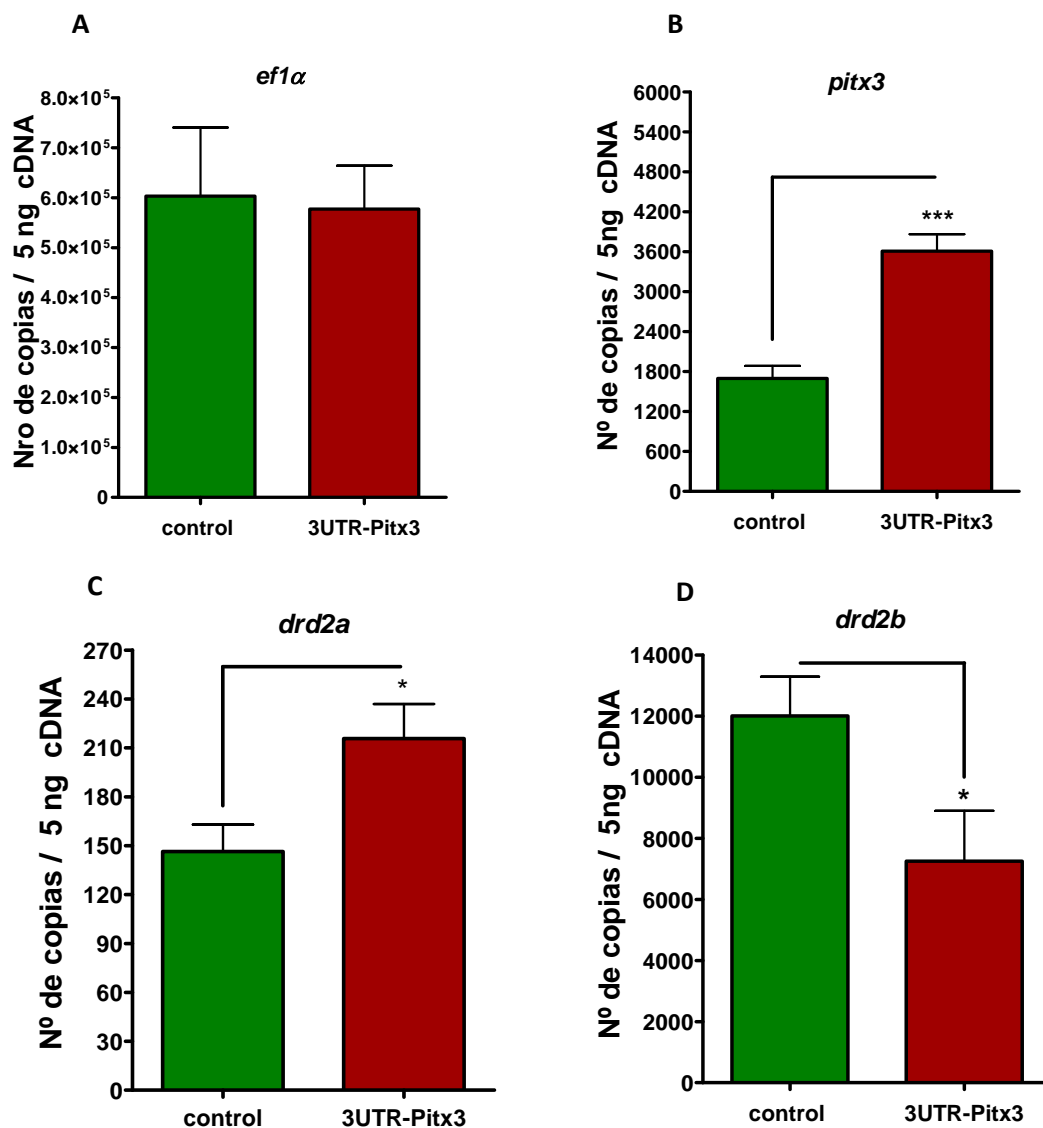


Fig. 45. Representación gráfica de la cuantificación absoluta de *ef1α*, *pitx3*, *drd2a* y *drd2b* en embriones de pez cebra de 24 hpf microinyectados en el estadio de una célula con 750 pg de la secuencia de 3'UTR Pitx3. La expresión de cada gen estudiado se comparó con su respectivo grupo control en cada caso. A) *ef1α*, B) *pitx3*, C) *drd2a* y D) *drd2b*. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de los genes estudiados \pm EEM. Para cada grupo se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba de t-Student de dos colas para muestras independientes. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Objetivo 5: Determinar la expresión temporal y espacial del miR-133b y observar los efectos de la cocaína en embriones de 24 y 48 hpf del pez cebra.

4.5. Análisis de la expresión temporal y espacial del miR-133b

4.5.1. Análisis de la expresión temporal del miR-133b

Los resultados previos muestran que la cocaína produce cambios de la expresión génica de factores de transcripción relacionados con el sistema dopaminérgico (*nurr1*, *pitx3*, *otpa*, *otpb*, *lmx1b.1* y *lmx1b.2*), así como de los receptores dopaminérgicos (*drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3*), *dat* y *th*. Los miRNAs, por lo general, son reguladores endógenos negativos de la expresión de los mRNA de muchos genes. El miR-133b en concreto reprime la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de células madres embrionarias y en cultivos celulares del cerebro medio (Kim y cols., 2007). El factor de transcripción Pitx3 participa de forma activa en la expresión de diversos genes relacionados en la formación de las neuronas dopaminérgicas. El miR-133b tiene como gen diana la región 3'UTR del factor de transcripción Pitx3 y lo regula negativamente, de ahí su rol en el desarrollo del sistema dopaminérgico. Por esta razón nos interesamos por conocer la influencia de la cocaína sobre la expresión del miR-133b en los estadios de 24 y 48 hpf y si estos cambios del miR-133b pudieran tener influencia en los factores derivados del factor de transcripción Pitx3.

Nuestras observaciones indican que la expresión basal del miR-133b es mayor a las 48 hpf (51780 copias de cDNA) con respecto a las 24 hpf (115900 copias de cDNA) (Fig. 45 y Tabla en anexo 11). La exposición de los embriones de pez cebra a clorhidrato de cocaína promueve una disminución de la expresión del miR-133b a las 24 y también a las 48hpf, siendo en este último estadio mucho más

dramática la disminución. Esta disminución en ambos estadios es estadísticamente significativa.

Es notorio el alto nivel de expresión que muestra este miRNA con respecto a los otros factores de transcripción, *dat*, *th* y receptores dopaminérgicos estudiados, en el cuál los niveles de expresión de cDNA esta fluctuando entre cientos a miles de copias, no superando en ningún caso las 150000 copias. Esta expresión cuantiosa del miR-133b le otorga un rol relevante, durante el desarrollo embrionario del pez cebra y en la regulación del factor de transcripción Pitx3. Y el hecho de que la cocaína afecte la expresión del miR-133b, indica que de esta manera indirecta la cocaína pueda afectar al factor de transcripción Pitx3.

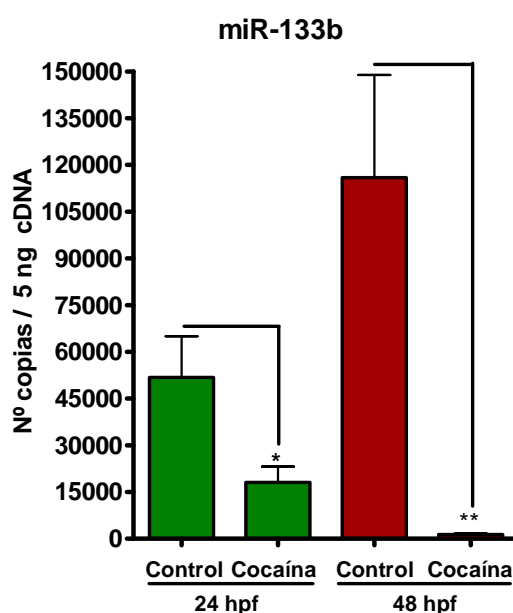


Fig. 46. Representación gráfica de la cuantificación absoluta del miR133b en los estadios de las 24 y 48 hpf de desarrollo embrionario del pez cebra. La expresión de miR-133b se estudió en embriones expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína y comparados con su respectivo grupo control a las 24 y 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de RNA de miR133b \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Prueba de *t-student* de dos colas para muestras independientes. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

4.5.2. Distribución del miR-133b en embriones de 24 y 48 hpf expuestos a cocaína.

El pequeño tamaño del micro RNA hace complicado detectar su distribución espacial con la técnica de la *ISH*, por lo cual aprovechando la existencia de nuevas ribosondas de solo 23 pb que hibridan con los miRNAs, decidimos realizar las *ISH* del miR-133b y determinar por primera vez la expresión espacial de este miRNA en el pez cebra, además de evaluar el efecto de la cocaína en su expresión. La sonda del miR-133b por, miRCURY LNA™ microRNA Detection Probes for *in situ* hybridization, tiene en su estructura un anillo LNA, el cual mejora la unión con su diana y amplifica detección de la señal del miR-133b. Además la sonda para el miR-133b está marcada doblemente con digoxigenina, en los extremos 5' y 3', lo que le brinda a la sonda ser más sensitiva a la detección. Las características de esta ribosondas para miRNA se especifican en el capítulo de materiales y métodos.

Nuestras observaciones muestran que el miR-133b presenta una distribución espacial principalmente en los somitos en embriones de 24 hpf (Fig. 47 A , C y E). La expresión del miRNA, en todo el SNC, es muy tenue en el estadio de las 24 hpf. La exposición de cocaína muestra que el patrón de expresión del miR-133b no produce cambios notorios a la observación en la vista lateral y dorsal, además se sigue expresando en las mismas zonas descritas anteriormente (Fig. 47 B, D y F). Debemos recordar que la *ISH* es más una técnica cualitativa que cuantitativa y es muy difícil en estos casos poder definir si hay un aumento o disminución en la expresión del miR-133b. Sin embargo, por los experimentos que realizamos por la técnica de la qPCR encontramos que la cocaína disminuye la expresión del miR-133b a las 24 hpf (Fig. 46 y anexo 11). La expresión del miR-133b en los somitos que posteriormente darán origen al músculo esquelético, indica que este miRNA

tenga un rol clave en el desarrollo y función de los músculos y que la cocaína podría interferir con estos procesos durante el desarrollo. Es muy interesante como estos miRNAs, moléculas muy pequeñas tienen un papel en los procesos de desarrollo y función de muchos procesos biológicos de gran relevancia.

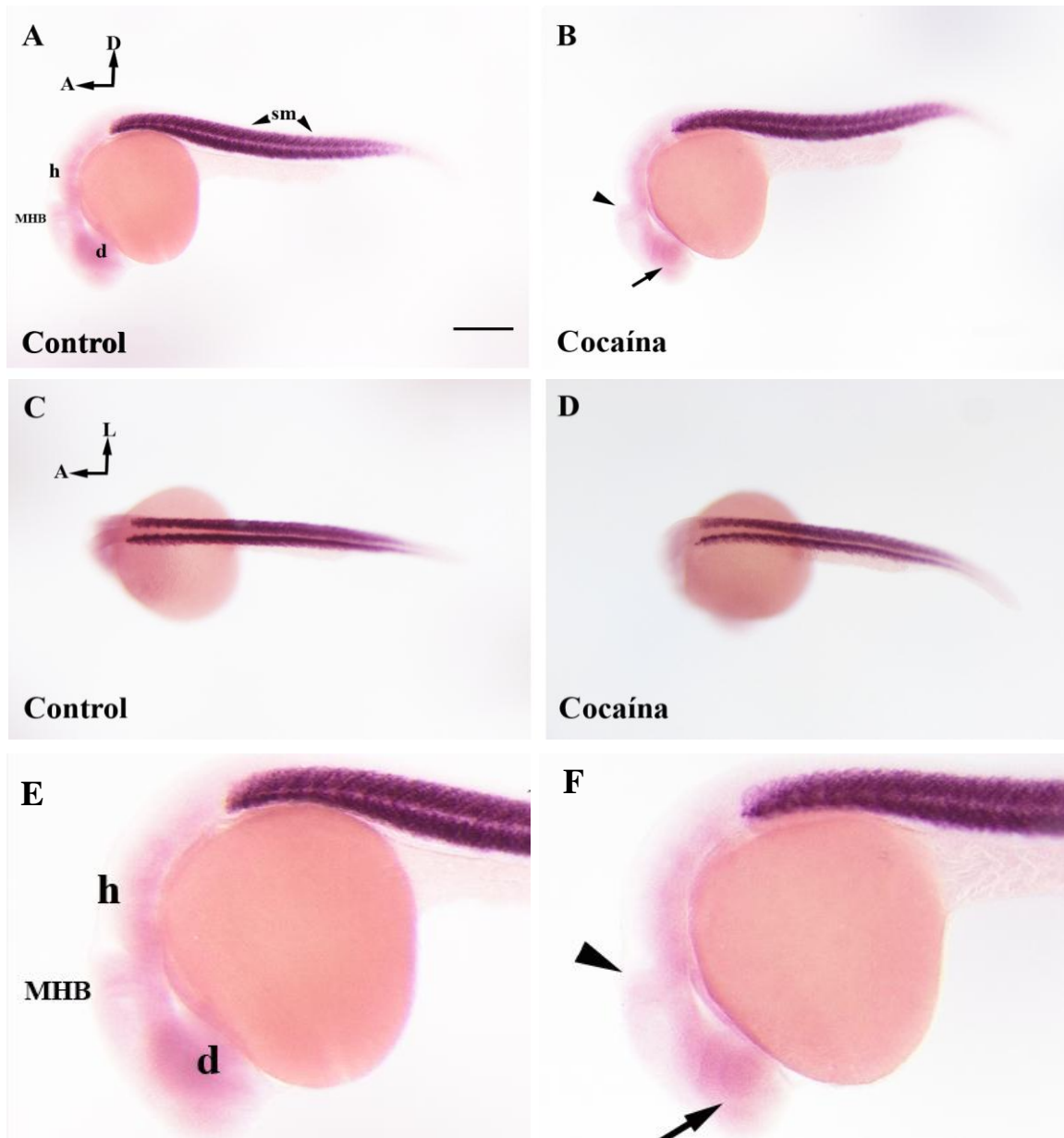


Fig. 47 Distribución del miR-133b en embriones de 24 hpf. La expresión del miR-133b en embriones del grupo control se aprecia notoriamente en los somitos y con una tenue expresión en diencéfalo, MHB y rombencéfalo (A y E). Los embriones expuestos a cocaína muestran una disminución del miR-133b en diencéfalo (flecha) y MHB (cabeza de flecha) con respecto embriones del grupo control (A y E). Es muy difícil poder afirmar si hubo cambios en la expresión del miR-133b en los somitos por acción de la cocaína según las figuras que mostramos grupo cocaína (B, D y F) y grupo control. (A, C y E), para determinar estos cambios nos apoyamos en los resultados de qPCR. sm: somitos ; d: diencéfalo (flecha), MHB: límite mesencéfalo y rombencéfalo (cabeza de flecha); A: anterior; D: dorsal; L: lateral. Escala de 300um. A, B, C y D: 6X; E y F: 10X.

Durante la finalización de la organogénesis primaria, cuando se han formado la mayoría de los órganos del embrión del pez cebra (48 hpf) la expresión del miR-133b se expresa, a diferencia de las 24 hpf, en mayor grado en el SNC en el mesencéfalo (m) diencéfalo (d) y rombencéfalo (h) rombencéfalo y además en el músculo esquelético (SM) donde presenta un marcaje muy intenso (Fig. 48 A y C). Esta distribución le otorga al miR-133b un rol en el desarrollo y función del SNC y el músculo esquelético. La vista dorsal muestra una mejor visión de la distribución del miR-133b en el diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo y se puede observar también en las aletas laterales del embrión y en el músculo esquelético (Fig. 47 E). Los embriones expuestos a cocaína indujo una disminución notoria del miR-133b en el SNC, en la zonas del mesencéfalo (flecha negra) (Fig. 48 B), diencéfalo (flecha roja) (Fig. 48 F) y rombencéfalo (cabeza de fecha) (Fig. 48 D), siendo más difícil poder afirmar algún cambio a nivel del músculo esquelético. Una vista dorsal confirma, también, la disminución de la expresión del miR-133b en el mesencéfalo, diencéfalo, y rombencéfalo (Fig. 48 F). La disminución de la expresión del miR-133b coincide con los resultados de nuestros experimentos realizados por qPCR, en el que encontramos una disminución también del miR-133b a las 48 hpf (Fig. 46 y anexo 11). Es de destacar que el miR-133b al expresarse en el músculo esquelético de las aletas laterales del embrión, tenga un rol relevante en la natación del pez cebra y sorprende una vez más cómo moléculas muy pequeñas puedan tener acciones muy importantes como es la supervivencia de los embriones, puesto que un desarrollo normal de las aletas garantiza que el embrión y su posterior fase larvaria del pez cebra puedan desplazarse libremente en busca de comida o evitando estímulos nocivos, pero si los músculos de la aleta están alterados por alguna afectación del miR-133b, es de suponer que el embrión fenecerá. La mayor expresión basal de miR-133b a las 48 hpf con respecto a las 24

hpf se podría explicar por la gran expresión de este miRNA en los somitos esencialmente y en el SNC en embriones de 48 hpf (Fig. 48 A, C y E) con respecto a los embriones de 24 hpf (Fig. 47 A, C y E) por la técnica de la *ISH*.

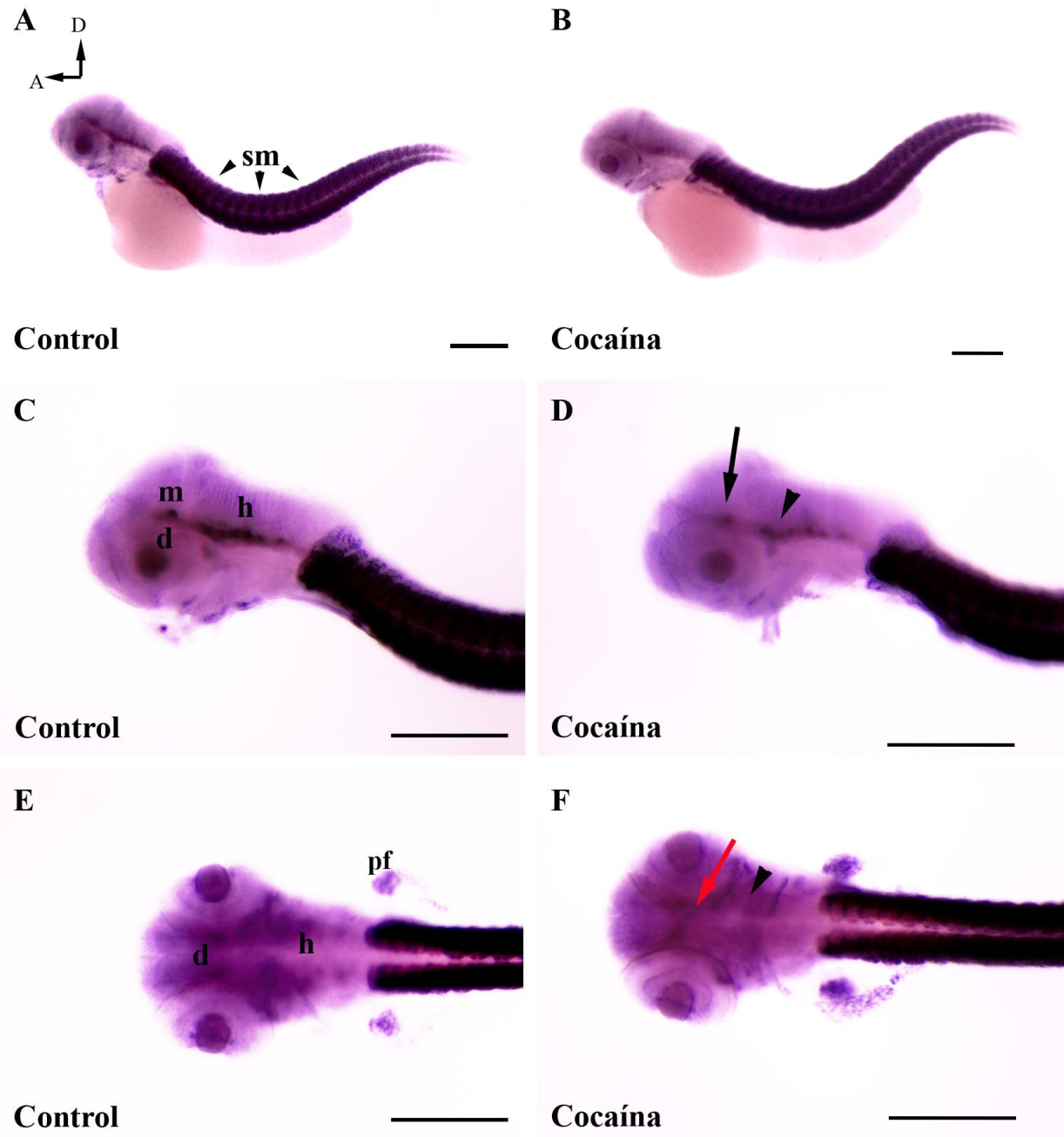


Fig. 48 Distribución del miR-133b en embriones de 48 hpf. La expresión del miR-133b en embriones del grupo control se aprecia notoriamente en el músculo esquelético (SM) y además en el SNC, mesencéfalo (m) diencéfalo, (d) y rombencéfalo (h) (A, C y E). Los embriones expuestos a cocaína muestran una disminución del miR-133b en mesencéfalo (flecha negra), diencéfalo (flecha roja) rombencéfalo (cabeza de flecha) (B, D y F) con respecto a los embriones del grupo control. Así como en los embriones de las 24 hpf, es muy difícil afirmar si hubo cambios en la expresión del miR-133b en los somitos por efectos de la cocaína en relación al grupo control. Los efectos de la cocaína en los cambios de expresión del miR-133b se pueden apreciar más objetivamente por qPCR. SM: músculo esquelético; d: diencéfalo; m: mesencéfalo; h: rombencéfalo; pf: aletas laterales A: anterior; D: dorsal; L: lateral. Escala de 300um. . A, B, C y D: 6X; E y F: 10X.

Objetivo 6: Determinar los efectos de la cocaína sobre la distribución de la TH en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra.

4.6. Estudio de la variación de TH en embriones expuestos a cocaína.

La TH es uno de los marcadores específicos de las neuronas catecolaminérgicas. Mientras que la TH y el DAT son los marcadores específicos de las neuronas dopaminérgicas y nos permiten distinguirlas de las neuronas noradrenérgicas y adrenérgicas. En el pez cebra no se han descrito neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo, pero sí en el diencefalo y hay investigaciones que señalan que estas neuronas del diencefalo suplan el rol de las del mesencéfalo. Puesto que en el diencefalo sólo se expresan las neuronas dopaminérgicas (de entre todas las neuronas catecolaminérgicas), empleamos el anticuerpo contra la TH (anti-rabbit) con la cual el marcaje positivo en diencefalo corresponde a neuronas dopaminérgicas.

En una vista ventral, a las 24 hpf observamos que la TH está presente en el diencefalo (Fig. 49 A), una ampliación de la vista anterior según el recuadro amarillo con líneas discontinuas (Fig. 49 A.1) permite distinguir el marcaje de las neuronas dopaminérgicas. La exposición de los embriones de pez cebra a cocaína produjo un incremento de la TH en el diencefalo (Fig. 49 B y 49 B.1). A las 48 hpf se aprecia un mayor número de células positivas a la TH en el diencefalo a diferencia de las 24 hpf (Fig. 50 A y 50 A.1). Los embriones expuestos a clorhidrato de cocaína muestran una disminución de la TH en el diencefalo, indicando una disminución de las neuronas dopaminérgicas. Nuestras observaciones indican que la cocaína induce cambios de manera diferente en la TH a las 24 y 48 hpf. Estos resultados por *IHC* coinciden con nuestras observaciones encontradas de la expresión de mRNA de la *th* por qPCR (Fig. 35 y Tabla en anexo 4).

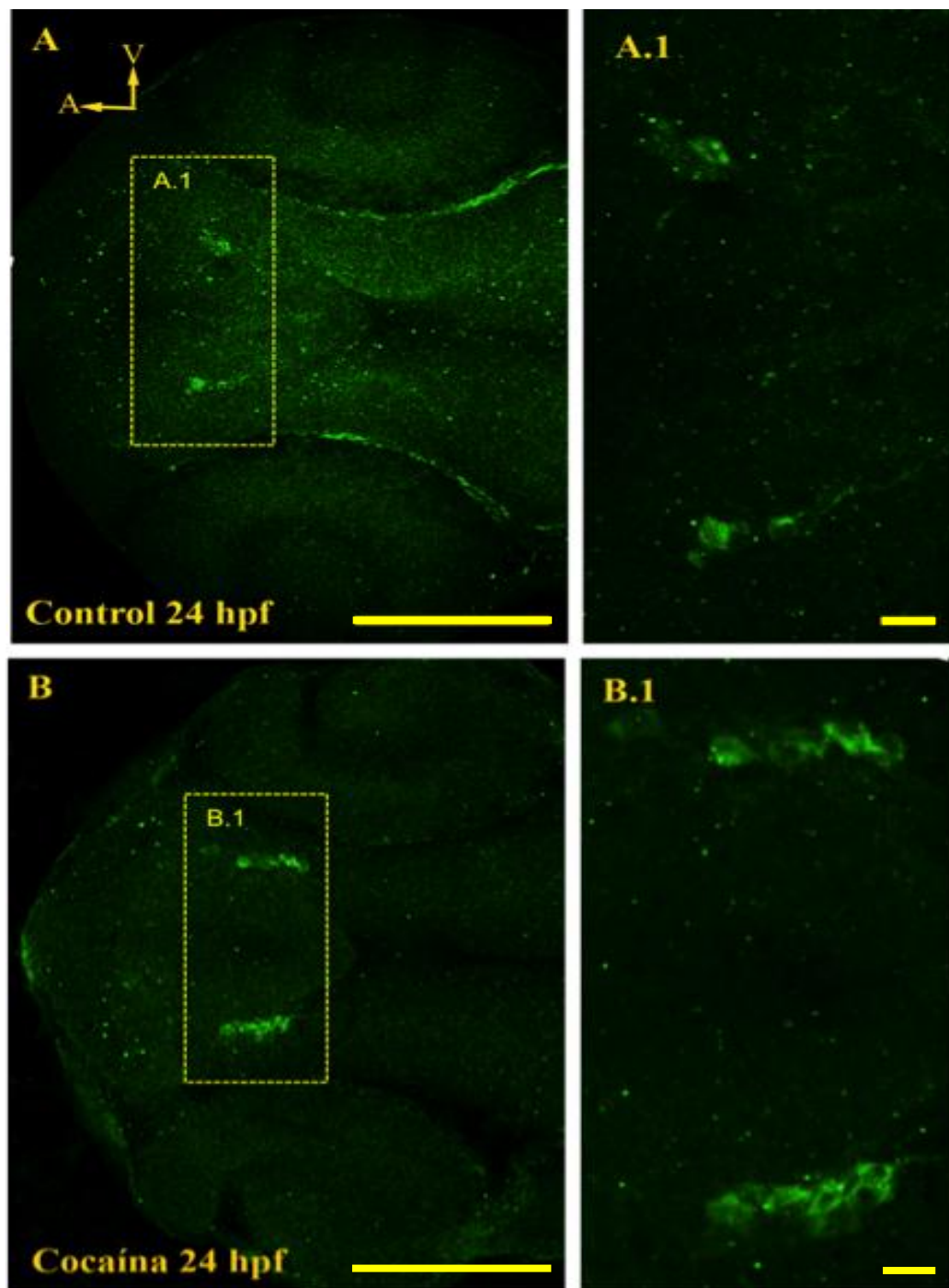


Fig. 49. Distribución de las neuronas dopaminérgicas TH positivas en embriones enteros (*in toto*) de pez cebra de 24 por *IHC* por microscopía confocal. Vista dorso ventral de: A) embriones del grupo control a las 24 hpf y B) Embriones de 24hpf expuesto a clorhidrato de cocaína. A.1 y B.1) grupo de neuronas dopaminérgicas (TH positivas) en diencéfalo. La cocaína induce un aumento de las neuronas dopaminérgicas TH positivas. Barra de escalas para A y B=100 μ m, A.1y B.1=25 μ m.

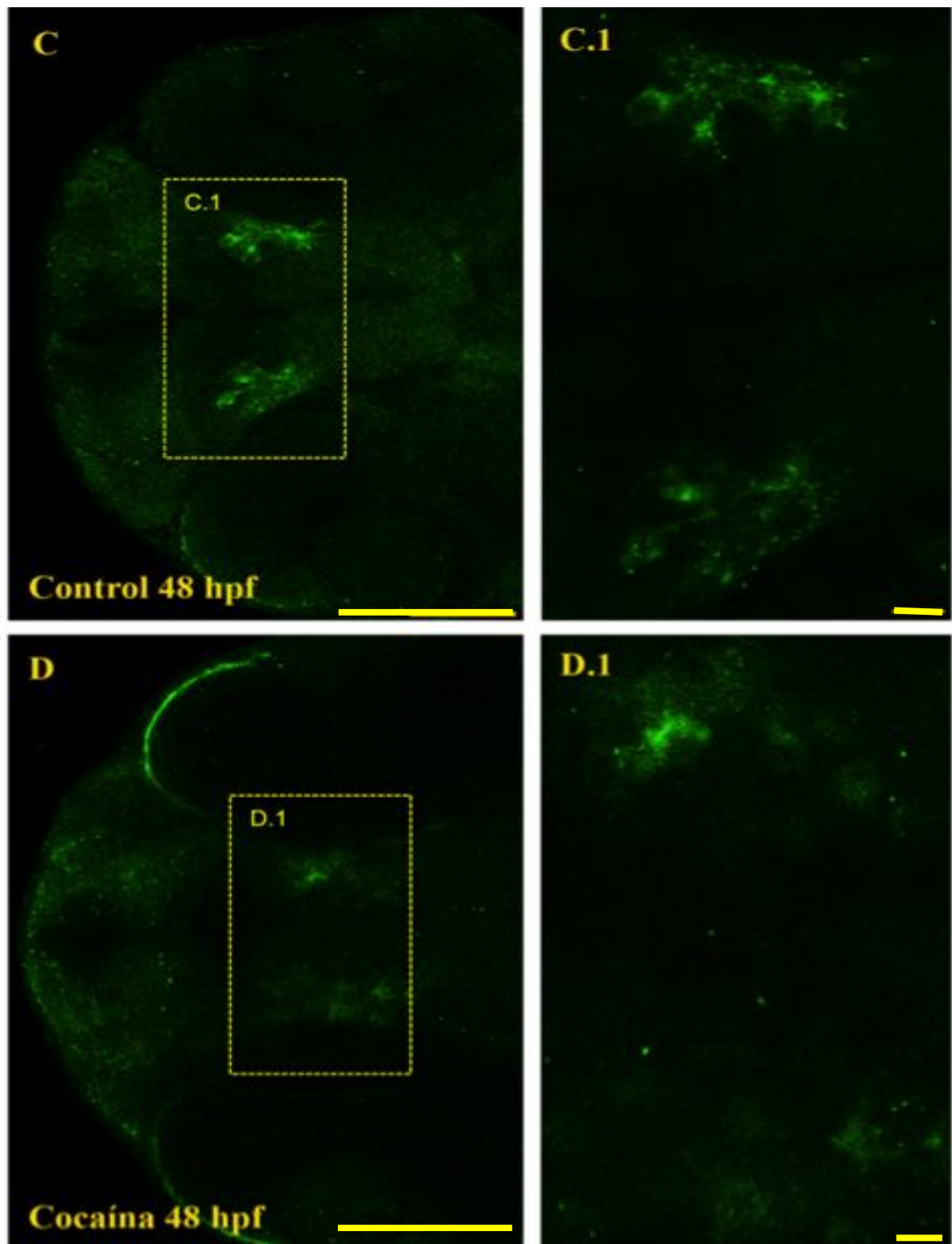


Fig. 50 Distribución de las neuronas dopaminérgicas TH positivas en diencefalo a las 48hpf, las fotografías fueron tomadas de las preparaciones de *IHC* de embriones enteros (*in toto*). Vista dorso ventral de C) embriones del grupo control de 48hpf y D) embriones de 48 hpf expuestos a clorhidrato de cocaína. C.1 y D.1) Neuronas dopaminérgicas diencefálicas TH positivas. Barra de escalas para C y D=100μm, C.1 y D.1=25μm.

Objetivo 7: Inhibir la expresión de los factores de transcripción *Lmx1b.1-Lmx1b.2* y estudiar el efecto que esto produce en la expresión de *nurr1* y la *th* en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra expuestos a cocaína.

4.7. Expresión de la *th* en embriones *knockdown* de *Lmx1b.1* y *Lmx1b.2*

La actividad de la enzima tirosina hidroxilasa es imprescindible para la formación de la dopamina y para el adecuado desarrollo y funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas. En mamíferos, se requiere la acción de ciertos factores de transcripción como *Nurr1*, *Pitx3*, *Lmx1b* y *Otp*. En el pez cebra se ha determinado la importancia, sobre todo, de *Lmx1b* y *Otp* para el desarrollo normal de las neuronas dopaminérgicas. Con el objetivo de corroborar la importancia de los factores de transcripción *Lmx1b* y *Otp* en el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas decidimos realizar el silenciamiento de estos factores de transcripción y ver cómo influye en la expresión de la *th* a las 24 y 48 hpf, y además ver el efecto que presenta la cocaína tras el silenciamiento por acción de los morfolidos contra *lmx1b.1* y *lmx1b.2*.

4.7.1 Inhibición de los factores de transcripción *Lmx1b.1* y *Lmx1b.2* por la microinyección de morfolidos

Los embriones microinyectados con los morfolidos *lmx1b.1* y *lmx1b.2* tuvieron un retraso en su desarrollo temporal de aproximadamente una hora con respecto al grupo control. Los embriones de las 24 hpf a los cuales se les indujo el silenciamiento de *Lmx1b.1* y *Lmx1b.2* a la vez (*Lmx1b.1-2MO*) en el estadio de una célula (como se explica en el capítulo de materiales y métodos) muestran una disminución significativa en los niveles de expresión de *th* con respecto al grupo

control (siendo estadísticamente significativa la disminución). La exposición de clorhidrato de cocaína al grupo de embriones Lmx1b.1-2MO (Lmx1b.1-2MO cocaína) produce, una recuperación de los niveles de expresión de la *th*, que por la microinyección de los morfolidos Lmx1b1-2MO mostraron una disminución de la *th* a las 24 hpf (Fig. 51 A).

La recuperación de los niveles de expresión de la *th* en el grupo Lmx1b.1-2MO cocaína llega a ser incluso similar a los niveles de expresión del grupo control y es estadísticamente significativo con respecto al grupo Lmx1b.1-2MO. En el estadio de las 48 hpf (Fig. 51 B) el grupo Lmx1b.1-2MO muestra una disminución de la *th* en mayor grado que a las 24 hpf, la exposición de cocaína a este grupo, revierte en cierta manera la disminución de *th*. No obstante, el efecto de la cocaína en la recuperación de los niveles de expresión de la *th* es de menor intensidad a lo que ocurre a las 24 hpf y no se llega a la expresión basal de la *th*. Al emplear los morfolidos, microinyectamos a un grupo de embriones medio E3, que se denominó MO control, además del grupo control al que no se microinyecta nada. Como se puede apreciar la expresión de mRNA de la *th* comparada con respecto al grupo control muestra pocas variaciones y en ningún caso fue estadísticamente significativo (Fig.51 A y B).

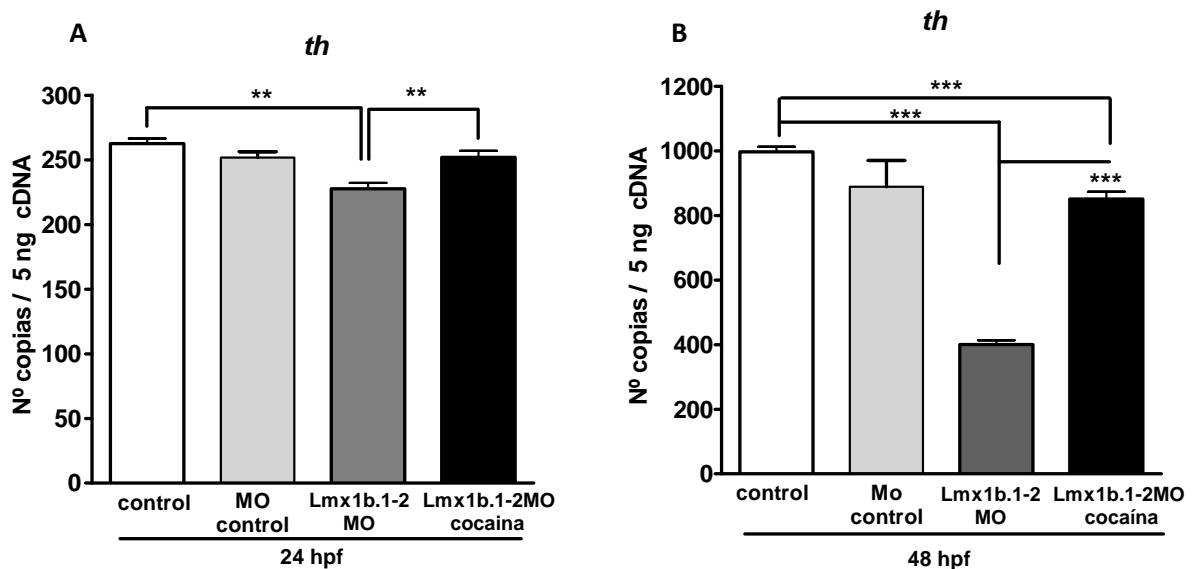


Fig. 51. Expresión de la *th* a las 24 y 48 hpf, en el grupo control (no microinyectados), grupo MO control, grupo Lmx1b.1-2MO y el grupo Lmx1b.1-2MO expuesto a cocaína (Lmx1b.1-2MO cocaína). A) Expresión de la *th* a las 24 hpf. B) Expresión de la *th* a las 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *th* \pm EEM. Para cada grupo se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Análisis de ANOVA y post-test de Tukey). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

4.8. Expresión del gen *nurr1* en embriones *knockdown* de Lmx1b.1-2

Para determinar la implicancia del factor Lmx1b en la expresión del factor de transcripción, *Nurr1*, microinyectamos los morfolinós de Lmx1b.1-2 en el estadio de una célula, y observamos la expresión de *nurr1*. Asimismo, a otro grupo de embriones *knockdown* Lmx1b.1-2 se les expuso a clorhidrato de cocaína y analizamos el efecto que tendría la cocaína en este grupo (Lmx1b.1-2 MO cocaína). Nuestros resultados muestran que la expresión de *nurr1* entre el grupo control y MO control no muestran variaciones en la expresión marcadas de *nurr1*, tanto a las 24 y 48 hpf. En el caso de los embriones *knockdown* de Lmx1b.1-2 MO muestran una dramática disminución en la expresión de *nurr1* tanto a las 24 y 48 hpf (en ambos casos la disminución es estadísticamente significativa). La exposición de cocaína a las 5 hpf al grupo Lmx1b.1-2MO muestra una disminución significativa de *nurr1* con respecto al grupo control y un aumento no significativo

con Lmx1b.1-2 MO, a las 24 y 48 hpf (Fig. 52 A y B). *nurr1* presenta una expresión 15 veces mayor a las 48 hpf en relación a las 24 hpf.

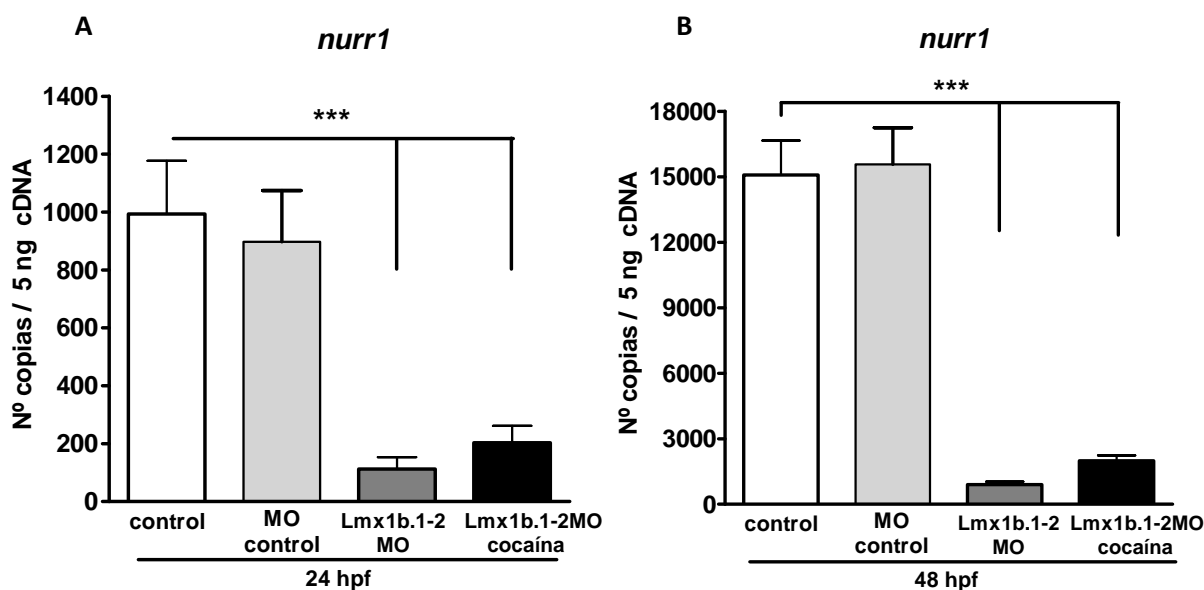


Fig. 52. Expresión de *nurr1* a las 24 y 48 hpf, en el grupo control (no microinyectados), grupo MO control, grupo Lmx1b.1-2MO y el grupo Lmx1b.1-2MO expuesto a cocaína (Lmx1b.1-2MO cocaína). A) Expresión de la *nurr1* a las 24 hpf. B) Expresión de la *nurr1* a las 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *th* \pm EEM. Para cada grupo se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Análisis de ANOVA y post-test de Tukey). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

Objetivo 8: Inhibir la expresión de los factores de transcripción *Otpa*- *Otpb* y estudiar el efecto que esto produce en la expresión de la tirosina hidroxilasa en embriones de 24 y 48 hpf de pez cebra expuestos a cocaína.

4.9. Inhibición de los factores de transcripción *Otpa* y *Otpb*

Otp es otro de los factores de transcripción clave en la formación del sistema dopaminérgico diencefálico, en el caso del pez cebra este presenta un duplicado de este gen, denominados *Otpa* y *Otpb*. Con el propósito de conocer la acción de la cocaína sobre embriones *knockdown* de *Otpa* y *Otpb* (por microinyección de ambos morfolinós a la vez en el estadio de uno a cuatro células), estos embriones

knockdown de *Otpa* y *Otpb* fueron expuestos a las 5 hpf a clorhidrato de cocaína y posteriormente a las 24 y 48 hpf se analizó los efectos de la cocaína sobre la expresión de la *th*. Al igual que el *knockdown* de *Lmx1b.1-2*MO, los embriones *knockdown* de *Otpa* y *Otpb* tuvieron un retraso en su desarrollo de una hora aproximadamente con respecto al grupo control. Nuestras observaciones durante los estadios de las 24 y 48 hpf (Fig. 53 A y B) muestran que los embriones microinyectados con los morfolinós de *Otpa* y *Otpb* (*Otpa-b*MO) disminuyen significativamente la expresión de la *th* con respecto al grupo control (sin morfolino) y MO control, siendo esta disminución estadísticamente significativa en ambos casos.

La disminución de la *th* es mucho mayor a las 48 hpf que a las 24 hpf en el grupo *Otpa-b*MO. A las 24 y las 48 hpf el grupo expuesto a cocaína (*Otpa-b*MO cocaína) muestra un ligero aumento (estadísticamente no significativo) con respecto a *Otpa-b*MO (Fig 53 A y B). De manera similar que los embriones *knockdown* de *Lmx1b.1-2*, en los embriones *knockdown* *Otpa-b* tuvimos un grupo MO control, que no muestra variaciones en la expresión de la *th* entre grupo control y microinyectado (medio E3). Esto indica que la disminución de la *th* se debe a la acción de los morfolinós más que a la acción de la microinyección que pueda estar afectando la expresión de genes y el desarrollo embrionario.

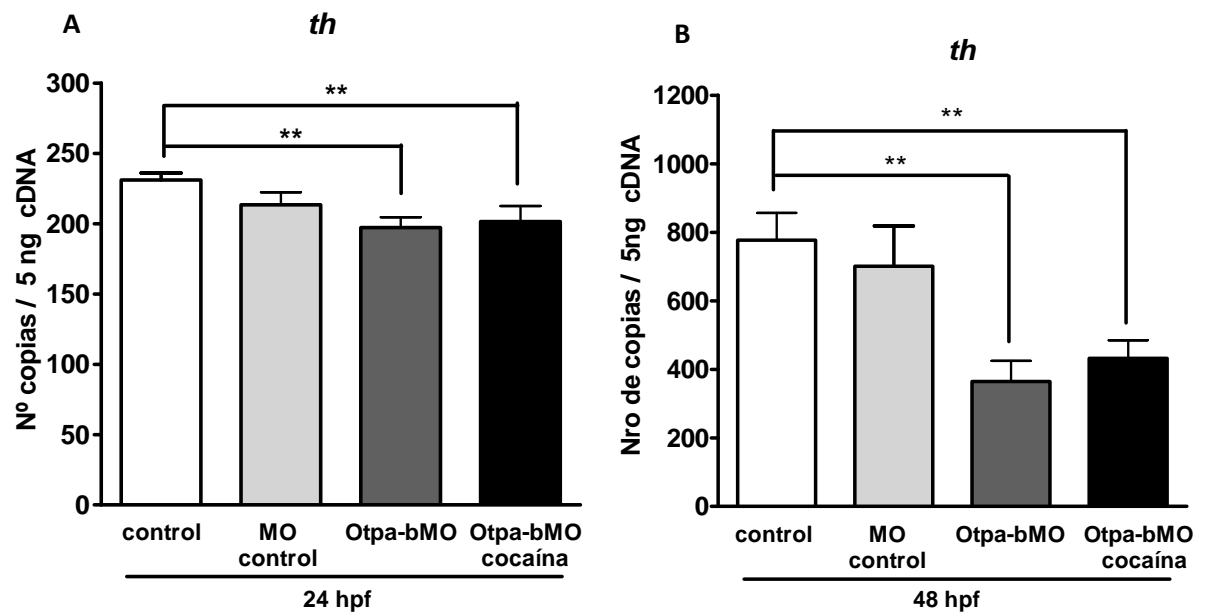


Fig. 53. Expresión de la *th* a las 24 y 48 hpf, en el grupo control (no microinyectados), grupo MO control, grupo Otpa-bMO y el grupo Otpa-bMO expuesto a cocaína (Otpa-bMO cocaína). A) Expresión de la *th* a las 24 hpf. B) Expresión de la *th* a las 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones se han empleado para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA por cada grupo. Cada barra representa el número de copias de cDNA de *th* \pm EEM. Para cada grupo se realizaron tres experimentos y cada uno por triplicado. Análisis de ANOVA y post-test de Tukey). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$.

DISCUSIÓN

5. Discusión

Siguiendo la organización planteada en la sección de resultados hemos dividido la sección de discusión en los siguientes apartados:

5.1. Expresión de los receptores dopaminérgicos: *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* y la implicación de la cocaína durante el desarrollo embrionario del pez cebra

5.2. Efectos de la cocaína en la expresión de *th* y *dat*

5.3. Estudio de la variación de la TH en embriones expuestos a cocaína

5.4. Análisis de la expresión de *nurr1*, *pitx3*, *lmx1b.1*, *lmx1b.2*, *otpa*, *otpb* por efecto de la cocaína.

5.5. Efecto de la cocaína en la distribución espacial del factor de transcripción *lmx1b.1* y *lmx1b.2* en embriones de 24 y 48 hpf expuesto a cocaína

5.6. Silenciamiento del factor de transcripción *Lmx1b* y *Otp*.

5.7. Efectos de la cocaína en la expresión de *ndr2*

5.8. Efectos de la cocaína en la expresión del miR-133b

5.9. Efecto de la cocaína en la distribución espacial del miR-133b en embriones de 24 y 48 hpf

5.10 Silenciamiento del miRNA 133b

En el presente trabajo, estudiamos los efectos de la cocaína sobre el sistema dopaminérgico analizando los receptores dopaminérgicos, los factores de transcripción relacionados en la formación de las neuronas dopaminérgicas y el miRNA (miR-133b) que regula la actividad de uno de los factores de transcripción, durante el desarrollo embrionario del pez cebra. La importancia que tiene este estudio se basa en que los efectos que produce la cocaína en los embriones de pez cebra podrían en cierta manera simular lo que está sucediendo cuando una madre embarazada consume cocaína y los efectos que tendría la droga sobre los genes relacionados al sistema dopaminérgico en el embrión o el feto.

5.1. Expresión de los receptores dopaminérgicos: *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* y la implicación de la cocaína durante el desarrollo embrionario del pez cebra

Los receptores dopaminérgicos D1, D2 y D3 han sido relacionados con el proceso de la adicción, por su localización en sitios clave como el núcleo *accumbens*, el cuerpo estriado y la corteza pre frontal (Nader y cols., 2002; Callier y cols., 2003; Doherty y cols., 2008; Martínez y cols., 2011). El bloqueo que produce la cocaína sobre el transportador de dopamina incrementa los niveles de dopamina en el espacio sináptico (Koob, 1999; Hoffmann y cols., 2011; Andersen y cols., 2011) y al haber más dopamina, esta interactúa con los receptores dopaminérgicos, los cuales si son activados repetitivamente pueden producir efectos de plasticidad neural, lo que se relaciona con la adicción (Zhen y cols., 2001; Hoffmann y cols., 2011). Diversos estudios realizados en modelos de mamíferos han permitido mejorar nuestra comprensión del proceso de adicción. Sin embargo, a pesar de los grandes esfuerzos de la comunidad científica en el estudio de los efectos que produce la cocaína, no se ha encontrado un tratamiento efectivo

contra la adicción, por lo que nos propusimos evaluar los efectos de la cocaína sobre los receptores dopaminérgicos en el pez cebra, ya que se ha sugerido que una alteración del sistema dopaminérgico trae como consecuencia alteraciones del SNC lo cual puede ser estudiado en el pez cebra según ha sido revisado por Souza y Tropepe (2011). Además, este modelo nos brinda muchas ventajas con respecto al resto de mamíferos (Dooley y Zon, 2000; Delvecchio y cols., 2011), un gran número de puesta de huevos (aproximadamente 200 a 300 embriones), el corto tiempo de desarrollo (a las 24 hpf ya se encuentra formado el SNC), los bajos costos de mantenimiento con respecto a mamíferos y la transparencia de los embriones durante el desarrollo.

En la presente investigación detallamos por primera vez los efectos de la cocaína en la expresión de los receptores dopaminérgicos *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* durante el desarrollo embrionario del pez cebra. La exposición de los embriones de peces cebra a cocaína produjo un incremento de *drd1* en los estadios tempranos y tardíos (8, 16 y 48 hpf) (Fig. 31 A y Tabla en anexo 2), lo cual indica que la cocaína puede tener implicaciones en los procesos de gastrulación (8 hpf), la formación de los neurómeros, diferenciación del SNC (16 hpf), la organogénesis primaria así como en los procesos de apoptosis (48 hpf) (Cole y Ross, 2001; Langheinrich y cols., 2002). Un aumento de expresión de los receptores dopaminérgicos también se han descrito en ratas (Unterwald, 2001), que al ser expuestas crónicamente a cocaína incrementan la densidad de los receptores D1 en el núcleo *accumbens* y el tubérculo olfatorio. Asimismo, en la presente investigación, al estudiar el estadio más tardío de desarrollo del pez cebra (72 hpf), la cocaína disminuye la expresión de *drd1*, esto indica que la cocaína puede afectar el desarrollo adecuado de la larva y de sus funciones, incluso puede

crear una alteración o daño irreversible que repercuta durante la vida adulta del organismo. Asimismo, estudios en mamíferos muestran, de manera análoga a nuestros resultados, que la cocaína induce la disminución de la densidad de D1 en el núcleo *acumbens* (Kleven y cols., 1990) y en el cerebro de embriones de ratones (Kubrusly and Bidhe, 2010). Tras el bloqueo del DAT en el SNC de los animales, la cocaína puede afectar la función del receptor dopaminérgico D1 (Koob 1999; Andersen y cols., 2011), por el incremento de dopamina en el espacio extracelular y producir un desacoplamiento entre el receptor y la proteína $G\alpha_s$ y disminuir la señalización intracelular (Wang y cols., 1995; Friedman y cols., 1996; Unterwald y cols., 2003). Asimismo, la persistencia del incremento de dopamina puede alterar la actividad de los receptores dopaminérgicos tanto pre como post sinápticos (Zhen y cols., 2001; Hoffmann y cols., 2011). La exposición crónica de cocaína a fetos de primates induce un aumento de la expresión de los receptores D1 en la corteza frontal y el estriado, así como una disminución en las regiones del diencefalo y mesencefalo, lo que indica que la cocaína actúa de manera distinta de acuerdo a la localización anatómica del receptor dopaminérgico (Choi y cols., 1998; Choi y Rønnekleiv, 1996). En el presente trabajo realizamos las qPCR en embriones *in toto*, desafortunadamente no trabajamos con núcleos específicos del SNC debido al pequeño tamaño del embrión, pero este modelo sí nos ofrece una referencia de que existe una variación en la expresión de genes debido a la acción de la cocaína, en los diferentes estadios embrionarios.

En el caso del receptor dopaminérgico D2, el pez cebra presenta un duplicado de este receptor, así los receptores duplicados son *Drd2a* y *Drd2b* (Boehmler y cols., 2004). En el presente estudio la cocaína produce acciones diferentes en cada uno de los duplicados. Nuestras observaciones muestran que la

cocaína induce un aumento de la expresión de *drd2a*, al mismo tiempo que disminuye *drd2b* a las 24 hpf y 48 hpf (Fig. 31 B y C y Tabla en anexo 2). Por otro lado, a las 72 hpf la cocaína incrementa la expresión de *drd2b* y disminuye el de *drd2a* (Fig. 31 B y C). Esta disminución es concordante con la disminución del receptor dopaminérgico D2 en estudios radiológicos realizados en humanos cocainómanos (Volkow, 2004a; Volkow, 2004b) y en animales adultos expuestos crónicamente a cocaína. En estos estudios se observa una disminución del receptor dopaminérgico D2 a nivel del cuerpo del estriado, (Morgan y cols., 2002; Nader y Czoty, 2005; Nader y Czoty., 2006). Esta disminución de D2 podría constituir un factor de riesgo para el desarrollo de la dependencia a la cocaína, promover la autoadministración de cocaína y una disminución de la sensibilidad a los reforzamientos naturales (Volkow y cols., 2002). Aunque no siempre esta disminución del receptor dopaminérgico D2 en el estriado promueva el comportamiento de la autoadministración de la cocaína (Martínez y cols., 2008). Por otra parte, el estudio de Kleven y cols. (1990) muestra un incremento de la densidad de D2 en el núcleo *accumbes*. Un incremento de los niveles de expresión de D2, se ha descrito también en mamíferos expuestos pre y/o postnatal con cocaína (Choi y cols., 1998), este incremento podría relacionarse a un aumento de la función del receptor D2 (Gifford y Johnson, 1992; King y cols., 1994; Kubrusly y Bhide 2010). Otros estudios en mamíferos tras la exposición pre y postnatal de cocaína presentan resultados variables, desde un incremento de la expresión de D2 (Leslie y cols., 1994), aumento de la función del receptor en el estriado (Scalzo y cols., 1990; Howard y cols., 1997; Choi y cols., 1998) y ausencia de cambio alguno (Fung y cols., 1989; Claye y cols., 1995; Zhao y cols., 2008). Estos cambios que se producen en la expresión de los receptores dopaminérgicos están mediados por muchas variables que pueden explicar estas diferencias de expresión, como la

dosis empleada, la vía de administración de la cocaína, el tiempo de exposición a la droga, el metabolismo que presenta cada especie, el tiempo transcurrido desde que se administró la última dosis y el momento del sacrificio del animal, entre otros parámetros.

Estudios recientes muestran la importancia del receptor D2 como autorreceptor. El D2 a nivel presináptico ejerce una retroalimentación negativa de la dopamina, que reduce la descarga de las neuronas dopaminérgicas, disminución de la síntesis y liberación de dopamina y liberación. Ratones *knockout* de autoreceptores D2 mostraron incremento en la síntesis y liberación de dopamina, hiperactividad motora e hipersensibilidad a los efectos psicomotores de la cocaína (Bello y cols, 2011), mientras que el receptor D2 a nivel postsináptico media las acciones de la dopamina tras su activación (Korchounov y cols., 2010). En el pez cebra podríamos atribuir que la expresión opuesta de *drd2a* y *drd2b* por acción de la cocaína podría deberse a su ubicación y actividad pre y postsináptico, que pueda ejercer indistintamente. Por otra parte, el receptor dopaminérgico D2 es el más implicado en la susceptibilidad a diferentes desórdenes mentales y al abuso de sustancias adictivas como la cocaína (Moyer y cols., 2010). Esto sugiere que estos cambios que hemos descrito de la expresión de *drd2a* y *drd2b* sean debido a que estos receptores estén trabajando de manera complementaria. Es decir, mientras un receptor disminuye su expresión y por lo tanto su función, el otro tipo de receptor trata de compensar su pérdida. Asimismo, el hecho de que el receptor *drd2b* se expresa en mayor número con respecto a *drd2a* (Fig. 31 B y C y Tabla en anexo 2) sugiere que *drd2b* presente una mayor relevancia en los procesos fisiológicos y *drd2a* complementa la acción de este otro receptor. Este hecho es avalado por la observación de una mayor distribución espacial de *dr2b* a las 24 hpf,

expresándose en el cerebro medio y la médula espinal, así como en la notocorda, mientras que *drd2a* se distribuye casi exclusivamente a nivel de la epífisis y a las 48 hpf *drd2b* tiene una mayor expresión a nivel del SNC que *drd2a* (Boehmler y cols., 2004). Este hecho puede implicar que el comportamiento disímil *drd2a* y *drd2b* que observamos tras la exposición de cocaína, puede ser debido a que estos receptores estén expresados en diferentes regiones anatómicas del SNC, ubicados a distintos niveles en la sinapsis (unos a nivel pre sináptico, y el otro a nivel post sináptico), por lo que la acción de la cocaína produciría acciones diferentes en cada tipo de receptor. Estudios futuros, a nivel molecular podrán elucidar este posible mecanismo sináptico.

Se ha descrito por Silvers y cols. (2006) que la cocaína no afecta la actividad del receptor D2 en crías hembras, mientras que si lo hace en machos. En el presente trabajo no hemos tomado en cuenta el género, ya que los embriones de peces cebras son estudiados durante los estadios embrionarios comprendidos entre las 8 y 72 hpf, cuando aún no se han diferenciado sexualmente. La diferenciación sexual del pez cebras podría iniciarse aproximadamente a los 25 días post fertilización (dpf) e incluso en la edad adulta estos pueden cambiar su género (Hofsten y Olsson, 2005). Además, en estudios realizados en peces cebras adultos expuestos a cocaína, no se observaron diferencias significativas entre peces machos y hembras (López-Patino y cols., 2008). Otras investigaciones sobre el receptor dopaminérgico D2, refieren que este receptor se encuentra en estados de alta y baja afinidad, por lo que la cocaína no induciría cambios en el número de receptores D2 pero si promueve un aumento de la proporción de los receptores D2 de alta afinidad (Briand y cols., 2008; Franco y cols., 2010).

Los receptores D1 y D2 han sido implicados en las diversas acciones que produce la cocaína (Hummel y unterwald, 2002, Kubrusly y Bidhe, 2010), en contraste a estos receptores, estudios en mamíferos sugieren que D3 y D4 presentan menor relevancia en el proceso de la adicción (Caine y cols., 2002) y en los efectos comportamentales producidos por otras drogas estimulantes (Boulay y cols., 1999, Ralph y cols., 1998, Reavill y cols., 2000). Por el contrario el estudio de Martínez y cols. (2009) muestra que la dependencia a la cocaína se asocia con la disminución de los receptores D2 y D3 (Martínez y cols., 2009). Además, estudios en mamíferos muestran que la exposición crónica prenatal de cocaína induce un aumento de la unión de los agonistas sobre el receptor D3 en el núcleo estriado (Silvers y cols., 2006) y el *accumbens* (Le Foll y cols., 2002; Silvers y cols., 2006), y en ratones condicionados a cocaína se incrementaron los niveles de mRNA de D3 (Le Foll y cols., 2002). Esto le otorga un papel relevante al receptor D3 en el proceso de adicción. Nosotros encontramos que la expresión de *drd3* a diferencia de los otros receptores dopaminérgicos del pez cebra *drd1*, *drd2a* y *drd2b*, no muestra cambios en los estadios más tempranos de desarrollo embrionario, pero sí a partir de las 48 hpf (Fig. 31 D y Tabla en anexo 2), sugiriendo que este receptor tenga mayor relevancia en la adicción en estadios más tardíos de la embriogénesis, cuando la mayoría de los órganos ya se han desarrollado y la coordinación motora se está afianzando (Kimmel y cols., 1995). Asimismo, la cocaína puede afectar la neurogénesis ya que la estimulación del receptor D3 conlleva a la proliferación de células progenitoras que promueven la neurogénesis (Kim y cols., 2010).

Los receptores *drd1* y *drd2a* presentan una alteración diferente de su expresión por efectos de la cocaína en el estadio de las 8hpf, pero tienen efectos semejantes de su expresión a las 48 y 72 hpf. Los efectos opuestos que produce la

cocaína en la expresión del receptor *drd1* con respecto a *drd2b* en el pez cebra (Fig. 31 A y C y Tabla en anexo 2), podrían alterar el correcto desarrollo neuronal durante el desarrollo embrionario del pez cebra, ya que en estudios tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado una acción opuesta del receptor D1 y D2 durante el desarrollo de la neurogénesis (Ohtani y cols., 2003; Popolo y cols., 2004) y la migración neuronal (Crandall y cols., 2007; Kubrusly y Bhide, 2010). Por otro lado estudios de cultivos primarios de neuronas corticales embrionarias muestran que D1 estimula la supresión del crecimiento de la neurita y el axón, mientras que la estimulación del receptor D2 promueve procesos de elongación (Reinoso y cols., 1996).

Al realizar la filogenia de los receptores dopaminérgicos de mamíferos y del pez cebra observamos que los receptores se alinean en dos ramas, que representan las dos familias de receptores D1 y D2, la familia D1 incluye a los subtipos D1 y D5, y la familia D2 que incluye a D2, D3 y D4 (Fig. 32 y 33). A diferencia de los mamíferos el pez cebra no presenta un ortólogo del receptor dopaminérgico D5. Realizamos dos tipos de análisis filogenético para corroborar que la alineación de las secuencias aminoacídicas era debida a la secuencia de los receptores de la diferentes especies, más que a los algoritmos que emplean los métodos de NJ (Fig. 32) y ML (Fig. 33). Las diferencias farmacológicas que presentan la familia de los receptores D1 y D2 podrían deberse al desarrollo evolutivo de los receptores dopaminérgicos, así el pez cebra al presentar dos familias de receptores semejantes a la de los mamíferos, muestra que es un buen modelo para el estudio de los receptores dopaminérgicos en procesos fisiológicos y fisiopatológicos. La alta homología de los receptores dopaminérgicos (Tabla 2 y anexos 12 y 13), el desarrollo filogenético de los receptores dopaminérgicos

semejante a los ortólogos de mamíferos (Fig. 32 y Fig. 33), muestra que el pez cebra es un modelo animal que puede brindarnos nuevas aproximaciones en el estudio de fármacos empleados durante el embarazo y los procesos de la adicción.

Por todo lo descrito y de acuerdo a nuestros resultados, postulamos que la cocaína afecta a los receptores dopaminérgicos *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* de diferente manera, de acuerdo al estadio embrionario de desarrollo y que estos cambios pueden tener implicaciones en el desarrollo del SNC, la organogénesis primaria, y sobre la función y señalización de los receptores dopaminérgicos.

5.2. Efectos de la cocaína en la expresión de *th* y *dat*

La principal función de la TH es la síntesis de la dopamina, mientras que el DAT se encarga de su regulación, mediante la recaptación del NT del espacio sináptico (Bhide, 2009). Diversas investigaciones refieren que la acción principal de la cocaína es el bloqueo del DAT (Tilley y cols. 2007; Huang y cols., 2009) y que este mecanismo tiene un rol importante en las propiedades de recompensa y reforzamiento que produce la adicción a la cocaína en humanos (Volkow, 1997). Además, la TH y el DAT se consideran marcadores característicos de las neuronas dopaminérgicas (Margolis y cols., 2010, Zeng y cols., 2004).

En el presente trabajo mostramos el efecto de la cocaína en la expresión de la *th1* (se denomina *th* por conveniencia) por su mayor implicación durante la embriogénesis y del *dat*. A las 24 hpf encontramos que la cocaína induce un aumento del *dat* y de la *th* (Fig. 35A, 36A), esto posiblemente ocurra debido a que durante la neurogénesis la cocaína potencia la formación de dopamina, ya que este NT está involucrado en los procesos de desarrollo temprano del cerebro (Liu y Lester, 2011) y para regular el aumento de dopamina se incrementa la expresión

del *dat*. La disminución que encontramos de la *th* y el *dat* a las 48h hpf (Fig.35 y 36) puede ser debido a que en este estadio el proceso de neurogénesis disminuye (Kimmel y cols., 1995). Al igual que en los receptores dopaminérgicos se han descrito diversos efectos de la cocaína sobre el DAT y la TH. El trabajo de Leslie y cols. (1994) muestra que la exposición prenatal de cocaína produce un aumento de la densidad del DAT, mientras Salvatore y cols. (2004) describen una disminución de la densidad del DAT en el estriado. Asimismo, se ha visto que la cocaína produce una disminución de la actividad del DAT (Byrnes y cols., 1993; Choi y cols., 1998; Kubrusly y Bhide, 2010). En mamíferos adultos la administración crónica de cocaína también produce resultados diversos como un incremento de la expresión de TH en el estriado (Balda y cols., 2009) y una disminución de su inmunoreactividad (Trulson y cols., 1987a; Trulson y cols., 1987b). La exposición crónica de cocaína y de morfina incrementan los niveles de TH en el VTA (Berhow y cols., 1995) indicando que ambas sustancias puedan tener acciones comunes en el proceso de la adicción. Esto implica que la investigación y la mejora en la comprensión del mecanismo de acción de las sustancias que producen adicción repercutirán en el mejor conocimiento de otras drogas o fármacos relacionados con la adicción.

En nuestro trabajo la cocaína afecta la expresión de *th* y de *dat* de manera similar tanto a las 24 hpf y a las 48 hpf (Fig 35A y 36A). El hecho de que en ambos periodos de desarrollo del embrión la cocaína afecte de la misma manera tanto al *dat* como a la *th*, nos llevó a contemplar la posibilidad de que la cocaína estaría afectando factores factores de transcripción para la especificación, diferenciación y el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas, entre ellos *Nurr1*, *Pixt3*, *Lmx1b* y *Otp*. El incremento de la expresión de *th* y *dat*, a las 24hpf, está relacionado con el

incremento de *nurr1* (Fig. 37 A), *pitx3* (Fig. 37 B), *lmx1b.1* (Fig. 38 A) y *lmx1b.2* (Fig. 38 B). Esto sugiere que estos factores de transcripción sean los responsables del aumento de la expresión de la *th* y *dat* por efecto de la cocaína. Contrariamente a lo ocurrido a las 24 hpf, la cocaína disminuye la expresión de *th* y *dat* a las 48 hpf y esto coincide con la disminución de la expresión de *nurr1* (Fig. 37 A), *pitx3* (Fig. 37 B) y *otpb* (Fig. 43 B), sugiriendo que estos factores de transcripción tengan una mayor participación en la formación de la *th* y *dat* en este estadio. En conjunto, estos datos, indican que la acción de la cocaína sobre los factores de transcripción relacionados en la formación de las neuronas dopaminérgicas afecta a sus genes diana como son la *th* y el *dat*. En ambos estadios observamos que tanto *nurr1*, *pitx3*, *th* y *dat* son afectados de la misma manera por la acción de la cocaína, indicando que los cambios de expresión de *nurr1* y *pitx3* parecen ser determinantes en la expresión de *th* y *dat*. Estas observaciones coinciden con las investigaciones que indican que Pitx3 y Nurr1 son necesarios para la formación de TH y DAT (Smidt y cols., 2000; Martinat y cols., 2006). Esto muestra la amplia gama de acciones de la cocaína, es decir no solo produce el bloqueo del DAT, sino también afecta la expresión de diversos factores de transcripción relacionados con la formación del sistema dopaminérgico, lo que puede producir alteraciones en la expresión de estos genes y alterar el correcto desarrollo del SNC del pez cebra.

5.3. Estudio de la variación de la TH en embriones expuestos a cocaína

La TH es una enzima de suma importancia para la síntesis de la dopamina (Chen y cols., 2003; Smidt y cols., 2003; Smith y cols., 2003) y actúa como el principal marcador de las neuronas catecolaminérgicas (Korzhevskii y cols., 2005). En el pez cebra, las neuronas dopaminérgicas se encuentran en telencéfalo y diencefalo, siendo esta última región donde se localiza el mayor número de

neuronas dopaminérgicas (Rink y Wullimans 2001), En el presente estudio, nuestros resultados de *IHC* muestran que la cocaína produce un incremento significativo de las neuronas dopaminérgicas a las 24 hpf (Fig. 49 A y B; A.1 y B.1), contrariamente a las 48 hpf se observa una disminución marcada de las neuronas dopaminérgicas (Fig. 50 C y D; C.1 y D.1). Estos cambios de la TH, concuerdan con los cambios de expresión de la *th* hallados por qPCR, mostrando que la cocaína produce una afectación tanto del mRNA como de la enzima TH.

5.4 Análisis de la expresión de *nurr1*, *pitx3*, *lmx1b.1*, *lmx1b.2*, *otpa*, *otpb* por efecto de la cocaína

Los factores de transcripción Lmx1b, Otp, Pitx3, Nurr1 están mediando el desarrollo, diferenciación, función y el mantenimiento de las neuronas mDA (Smidt y cols., 2004; Maxell y cols., 2005; Peng y cols., 2011; Smidt y cols., 2000; Yan y cols., 2011; Ryu y cols., 2007). Alteraciones en la expresión de Pitx3 se ha asociado a la enfermedad de Parkinson en humanos y puesto que la ausencia de Pitx3 en ratones causa una pérdida preferencial de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc las cuales son las más afectadas en la enfermedad de Parkinson (Papanikolaou y cols., 2009; Peng y cols., 2011). La ausencia de Pitx3 en ratones con ausencia de cristalino (*aphakia mice*), muestra que afecta también la expresión del DAT y del VMAT2, además estos genes de DAT y VMAT2 son regulados por Nurr1, lo que sugiere que estos factores de transcripción en conjunto pueden regular la especificación y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Hwang y cols., 2009). El análisis de secciones de la sustancia negra de pacientes con enfermedad de Parkinson muestra una disminución de la expresión de Lmx1b, correlacionándose con la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en esta área. Esto demuestra que Lmx1b es expresado en

desarrollo en neuronas de mesencefálicas y la expresión es mantenida en estas neuronas durante toda la vida (Smidt y cols., 2000). Por otro lado, Otp es esencial para el desarrollo de subgrupos específicos de neuronas dopaminérgicas en el diencefalo (Ryu y cols., 2007). En el pez cebra se encuentran dos duplicados de la proteína Otp: Otpa y Otpb con un homología con la proteína de ratón de 81% para Otpa y de 78% para Otpb (Del Giacco y cols., 2006), ambos son requeridos coordinadamente para el desarrollo de la mayor parte de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas, así mismo la sobreexpresión de Otp puede inducir expresión ectópica de la TH y del DAT, indicando que Otp puede especificar aspectos de la identidad de las neuronas dopaminérgicas (Ryu y cols., 2007).

En este trabajo, empleando como modelo de estudio los embriones de pez cebra, mostramos cómo la cocaína afecta ciertos factores de transcripción y asimismo sus genes diana. Nuestros resultados por qPCR muestran que la cocaína incrementa los niveles de expresión de *nurr1* (Fig. 37 A), *pitx3* (Fig. 37 B), *lmx1b.1* (Fig. 38 A) y *lmx1b.2* (Fig. 38 B) a las 24 hpf, mientras que en este mismo estadio *otpa* y *otpb* disminuyen su expresión. Esto muestra que la cocaína en estadios tempranos (cuando el SNC se está desarrollando) induce una mayor expresión de estos factores de transcripción quizá con el fin de incrementar la producción de dopamina y su posterior liberación al espacio sináptico. Puesto que uno de los mecanismos que tiene la cocaína es el de incrementar la dopamina en el espacio sináptico por bloqueo del DAT (Koob y Nestler, 1997; Jones y cols., 1999; Huang y cols., 2009). En el pez cebra, por estudios de *ISH*, se ha demostrado que la *th* y el *dat* se expresan desde las 18-20 hpf y es de esperar que la cocaína esté afectando la función de este transportador (Holzschuh y cols., 2001).

La disminución de los factores de transcripción de *otpa* y *otpb* a las 24 hpf podría deberse a una respuesta fisiológica con el fin de equilibrar la producción de dopamina ante el incremento de *th* por el aumento en la expresión de *nurr1*, *pitx3*, *lmx1b.1* y *lmx1b.2* inducido por acción de la cocaína. En relación a las 48 hpf, *nurr1*, *pitx3* y *otpb* disminuyen su expresión por efecto de la cocaína, mientras que *otpa* y *lmx1b.2* incrementan su expresión. La disminución de *nurr1* (Fig. 37 A), *pitx3* (Fig. 37 B) por acción de la cocaína son semejantes a los encontrados por Leo y cols. (2007) que señalan una disminución del mRNA de *pitx3* y *nurr1*, sin que se afecte la expresión de *lmx1b*. Esta actividad diferencial de la cocaína sobre estos factores de transcripción podría ser debido a que mientras la cocaína aumenta la expresión génica relacionada con la expresión de la TH (y la posterior síntesis de dopamina) en las neuronas dopaminérgicas, por otro lado, el organismo active algún o algunos otros mecanismos compensatorios que disminuyen otros factores de transcripción implicados en la expresión de TH con el objetivo de equilibrar la síntesis de la dopamina.

Estos factores de transcripción *Nurr1*, *Pitx3* y *Lmx1b* no sólo revelan su importancia durante el desarrollo embrionario (Martinat y cols., 2006), sino también en los procesos de supervivencia y mantenimiento de estas neuronas dopaminérgicas (Alavian y cols., 2008). En las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson se observa una disminución de *Pitx3* y una consecuente disminución de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (Hwang y cols., 2003; Leo y cols., 2009). Nuestras observaciones señalan que la exposición crónica a cocaína disminuye la expresión de *pitx3*, *nurr1* y *otpb* en el estadio de las 48 hpf, sugiriendo que el pez cebra puede ser un buen modelo en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. En relación a los factores de transcripción *Otpa*

y *Otpb*, nuestros resultados por qPCR muestran que *otpb* presenta una mayor expresión en los niveles basales de mRNA a las 24 y 48 hpf con respecto a *otpa* (Fig 43 A y B). A las 24 hpf *otpb* presenta una expresión basal de casi el doble que *otpa* y a las 48 hpf llega a ser inclusive 3 veces mayor. Tras la exposición de cocaína apreciamos que a las 24 hpf la cocaína induce una disminución de ambos factores, con respecto al grupo control. Esta alteración de *otpa* y *otpb* puede contrarrestar en cierta manera la formación de *th* y de la dopamina por el incremento de los factores de transcripción *nurr1*, *pitx3*, *lmx1b.1* y *lmx1b.2*. Sin embargo, a las 48 hpf la cocaína muestra cambios diferentes. Por una parte incrementa la expresión de *otpa*, y por otro lado disminuye la expresión de *otpb* (Fig. 43), este cambio de expresión diferente entre *otpa* y *otpb* podría deberse a que estos factores tengan funciones distintas en este estadio a diferencia de las 24 hpf y por lo tanto tengan distinta vulnerabilidad o sensibilidad a la acción de la cocaína. Por otro lado, observamos que *otpb* al igual que *nurr1* y *pitx3* disminuyen su expresión por efecto de la cocaína, mientras que *otpa* y *lmx1b.2* incrementan su expresión.

Smidt y cols. (2000) han encontrado expresión de *Lmx1b* antes de la aparición de las células positivas a *Nurr1*, *TH* y *Pitx3*, por lo que sugieren que *Lmx1b* puede actuar como un activador potencial de estos genes y estar relacionado con la aparición del sistema dopaminérgico mesencefálico. *Otp* y *Lmx1b* se encuentran duplicados en el pez cebra (O'hara y cols., 2005; Blechman y cols., 2007) lo que nos puede aportar valiosa información a la hora de evaluar agentes que afecten o estén relacionados a la expresión de estos factores de transcripción. La sobreexpresión de ambos *Otp*, en el pez cebra, induce la expresión de *th* y *dat* en localizaciones ectópicas, indicando que *Otp* puede

especificar aspectos de la identidad de las neuronas dopaminérgicas (Ryu y cols., 2007). Por otra parte, estudios en cerebros humanos postmortem indican que *Nurr1* y *Pitx3* se expresan predominantemente en las neuronas dopaminérgicas maduras y que el consumo de cocaína está relacionado con una disminución de estos factores conllevando a una pérdida parcial del fenotipo dopaminérgico (Bannon y cols., 2002; Bannon y cols., 2004).

5.5. Efecto de la cocaína en la distribución espacial del factor de transcripción *lmx1b.1* y *lmx1b.2* en embriones de 24 y 48 hpf

La expresión de *Lmx1b* es esencial en la aparición del sistema dopaminérgico mesencefálico (Smidt y cols.; 2000), aunque se las ha implicado también en el mantenimiento y la supervivencia celular en la región del istmo cerebeloso (O'Hara y cols., 2005; Guo y cols., 2007; Guo y cols., 2008). Nuestras observaciones muestran que la expresión de *lmx1b.1* y *lmx1b.2* se da principalmente en el diencéfalo ventral, y en el MHB a las 24 hpf (Fig. 39), y a las 48 hpf en el diencéfalo, MHB y rombencéfalo (Fig. 40). Los embriones expuestos a cocaína muestran un aumento de la intensidad del marcaje de ambos factores de transcripción sobre todo a nivel del diencéfalo ventral a las 24hpf (Fig. 39) y un gran incremento en la expresión de *lmx1b.2* en MHB (Fig. 40). La cocaína muestra efectos diferentes a las 48 hpf en la expresión de *lmx1b.1* y *lmx1b.2*, en el caso de *lmx1b.1*, la cocaína induce un aumento de la expresión en el diencéfalo, mientras que *lmx1b.2* altera su patrón de expresión en diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. Este aumento de la expresión por *ISH* de *lmx1b.1* y *lmx1b.2* a las 24 y 48 hpf corrobora nuestros resultados mostrados por qPCR (Fig. 38 A y B). Todo esto sugiere que la afectación de *lmx1b.1* y *lmx1b.2* por la cocaína durante el

desarrollo embrionario puede tener implicaciones (inmediatas o mediatas) en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos.

5.6. Silenciamiento (*Knockdown*) del factor de transcripción Lmx1b y Otp.

Dada la importancia del factor de transcripción Lmx1b y Otp para la diferenciación neuronal dopaminérgica en mamíferos nos propusimos corroborar su relevancia en el desarrollo del sistema dopaminérgico del pez cebra, por lo que utilizamos el método de silenciamiento por la microinyección de morfolinós. En nuestros resultados encontramos que se produce una disminución de la expresión de la *th* al silenciar Lmx1b.1-2 (Fig. 51 A y B) y Otpa-b (Fig. 53 A y B) tanto a las 24 como 48 hpf. Estos datos nos indican que Lmx1b.1, Lmx1b.2, Otpa y Otpb son importantes en el desarrollo y expresión de la *th* durante la embriogénesis y por lo tanto para la diferenciación de las neuronas dopaminérgicas. También observamos la importancia de Lmx1b para la expresión de *nurr1*, ya que este factor disminuye drásticamente por el silenciamiento de Lmx1b.1-2 a las 24 y 48 hpf (Fig. 52 A y B), lo que afectaría consiguientemente la expresión de la *th* y el correcto desarrollo de las neuronas dopaminérgicas (Smidt y cols., 2000). Este hecho coincide con el trabajo de Filippi y cols. (2007), quienes muestran que la expresión de Nurr1 y también de Pitx3 es regulado por Lmx1b en el pez cebra, mientras que en ratones knockout de Lmx1b encontraron una disminución de las neuronas positivas a TH y que no expresaban Pitx3 (Smidt y cols., 2000), por lo que Lmx1b también estaría regulando la expresión de Pitx3. Por lo descrito, podemos apreciar que existen múltiples factores de transcripción que intervienen en la formación del sistema dopaminérgico, lo que explica la gran complejidad en la acción de la cocaína y el tratamiento esquivo hasta el momento, ya que la FDA (acrónimo del inglés *Food*

and Drug Administration) no ha aprobado ningún medicamento para el tratamiento de la adicción (Shorter y Kosten, 2011).

Tras el silenciamiento de *Lmx1b1-2* y la posterior exposición de cocaína al grupo *Lmx1b1-2MO*, esta produce un incremento de la *th* a las 24 hpf (Fig. 51 A), pero, hay que destacar que este aumento de la *th* ejercido por la cocaína recupera la expresión de los niveles basales de la *th* de embriones del grupo a las 24 hpf (Fig. 51 A). A las 48 hpf (Fig. 51 B) la microinyección de *Lmx1b1-2MO* produce los mismos efectos en la expresión de la *th* que a las 24 hpf, con la diferencia de que la disminución es mucho es en mayor grado. La exposición de cocaína en los embriones *Lmx1b1-2MO* produce un incremento de la *th*, pero este aumento no fue suficiente para recobrar la expresión de los niveles basales de *th* (Fig. 51 B). Nuestras observaciones indican que la expresión de la *th*, en el pez cebra, depende del factor de transcripción *Lmx1b* y la cocaína afecta la expresión de la *th* por otro mecanismo de acción y no por intermedio de *Lmx1b*, estas observaciones es análogo a lo encontrado en un estudio en ratones adultos, donde la administración crónica de la cocaína no mostró alteración de la expresión de *Lmx1b* (Leo y cols., 2007). Por otra parte, determinamos que la cocaína requiere de *Lmx1b* para alterar la expresión de *nurr1* (Fig. 52 A y B).

Por otro lado, el silenciamiento de los factores de transcripción *Otpa* y *Otpb* muestra una disminución muy significativa en la expresión de la *th* a las 24 y las 48 hpf (Fig. 53 A y B), la exposición de cocaína a los embriones silenciados de *Otpa-b* tanto a las 24 como a las 48hpf (Fig. 53 A y B) no muestra efectos en la expresión de la *th*. Esto indica que la cocaína necesita de la presencia de los factores de transcripción *Otpa* y *Otpb* para ejercer su efecto sobre la expresión de *th*.

Por lo tanto, sugerimos que los factores de transcripción Lmx1b y Otp son importantes en la expresión de la *th*, siendo en concreto Otp esencialmente el más relacionado para la adecuada expresión de la *th*. Además, El efecto que la cocaína ejerce sobre la expresión de *th* estaría mediado por un mecanismo dependiente de Otpa y Otpb.

5.7. Efectos de la cocaína en la expresión de *ndr2*

En el desarrollo y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas además de los factores de transcripción como Lmx1b.1, Lmx1b.2, Otpa, Otpb, Nurr1 y Pitx3 intervienen otros moduladores, tales como señales extracelulares tipo la proteína Nodal. En el pez cebra la proteína Ndr2, es un regulador positivo de la expresión de Otpb y de las funciones en la determinación de las neuronas dopaminérgicas en la placa basal posterior del hipotálamo (Del Giacco y cols, 2006)

En el presente trabajo, mostramos una menor expresión basal de *ndr2* a las 48 hpf con respecto a las 24 hpf (Fig. 44), lo que indica que *ndr2* tendría una mayor acción en los estadios tempranos que tardíos. Los embriones expuestos a cocaína muestran una disminución en los niveles de expresión de *ndr2* tanto a las 24 como a las 48 hpf (Fig. 44), esta disminución de *ndr2* tiene concordancia con la disminución del factor de transcripción *otpb* (Fig. 43 B). Sugiriendo que existe alguna relación entre *ndr2* y el factor de transcripción *otpb*. Estos cambios descritos por nosotros, concuerda con lo señalado por Del Giacco y cols. (2006) al mostrar a la señalización nodal como regulador positivo de la expresión de Otpb. Además, se ha descrito que la proteína ndr2 regularía las funciones tempranas de Otpb en la determinación de las neuronas catecolaminérgicas en el tubérculo posterior.

5.8. Efectos de la cocaína en la expresión del miR-133b

Los microRNAs son considerados reguladores de la expresión de los mRNA, en concreto el miR-133b se ha relacionado con la regulación de Pitx3, concretamente uniéndose en la región 3'UTR-Pitx3 en mamíferos (Kim y cols., 2007) y el pez cebra (Sánchez-Simón y cols., 2010). El factor de transcripción Pitx3 es requerido para el desarrollo y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Nunes y cols., 2003; Van den Munckhof y cols., 2003). Aunque en el pez cebra, no se han encontrado neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo, se sugiere que las neuronas dopaminérgicas del diencéfalo sustituyen la función de las del mesencéfalo (Rink y Wullimans, 2001). El miR-133b regula la maduración y función de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, dentro de un circuito de retroalimentación negativo que incluye a Pitx3. El factor de transcripción Pitx3 induce la expresión del miR-133b y la actividad de Pitx3 es disminuida por el miR-133b post transcripcionalmente (Kim y cols., 2007).

En el presente trabajo de investigación, de acuerdo a nuestros resultados por qPCR, los embriones expuestos a clorhidrato de cocaína muestran una disminución de la expresión del miR-133b (Fig. 46) durante la formación del SNC. Asimismo, encontramos como es de esperar, ante una disminución endógena del miR-133b un aumento de la expresión de su gen diana, el factor de transcripción Pitx3 (Fig. 37). Estos resultados, encontrados por nosotros, en los embriones de pez cebra a las 24 hpf, son similares a los encontrados por Sánchez-Simón y cols. (2010) en la cual la disminución de la expresión del miR-133b, por la exposición de los embriones de pez cebra a 1 y 10 nM de morfina, produce un aumento de *pitx3*. Esto sugiere que las sustancias adictivas, como la cocaína y morfina (empleado crónicamente en el tratamiento del dolor puede producir adicción) presentan

mecanismos de acción similares en la expresión del miR-133b y que los cambios de expresión de Pitx3 afecta también la expresión del miR-133b y viceversa. Un hecho importante que resaltar con respecto al miR-133b, es que observamos un alto nivel de expresión de este miRNA (Fig. 37 y Tabla en anexo 8) con respecto a los factores de transcripción (*Imx1b.1*, *Imx1b.2*, *otpa*, *otpb*, *nurr1* y *pitx3*), *dat*, *th*, *ndr2* y los receptores dopaminérgicos, de entre los cuales su máxima expresión es de aproximadamente 15000 copias de cDNA, mientras que el miR-133b se expresa en torno a 50000 y 110000 copias de cDNA a las 24 y 48 hpf, respectivamente. Esta gran expresión de los niveles basales indica que del miR-133b es esencial en el desarrollo embrionario.

5.9 Efecto de la cocaína en la distribución espacial del miR-133b en embriones de 24 y 48 hpf

El miR-133b, a pesar de su pequeño tamaño puede tener efectos muy relevantes, como por ejemplo en la expresión del factor de transcripción Pitx3 que es esencial en la formación y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo (Kim y cols., 2007). Hasta el momento no se ha descrito la expresión espacial del miR-133b, por lo que decidimos realizar la *ISH* de este miRNA en el pez cebra y determinar su distribución espacial que es de suma importancia en el estudio del desarrollo embrionario.

Nuestros estudios por *ISH* muestran por primera vez la expresión espacial del miR-133b en el pez cebra, este miRNA presenta una marcada expresión a nivel de los somitos a las 24 hpf (Fig. 47 A, C y E). Además, se observa la distribución de este miRNA en el diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, aunque de manera tenue. A las 48 hpf observamos que la expresión del miR-133b es más intensa a nivel de los somitos que a las 24 hpf y se expresa en mayor medida en el SNC en

regiones como el diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Fig. 48 A) y siguiendo la ruta del fascículo longitudinal medio del mesencéfalo (Fig. 48 C). Nuestras observaciones sugieren que el miR-133b puede tener un rol clave en la formación del músculo esquelético y además en la formación de las neuronas dopaminérgicas por afectación de Pitx3. Aunque su expresión sea poco notoria en el SNC a las 24 hpf por *ISH* (Fig. 47 A, C y E), debemos recordar que esta técnica es más cualitativa que cuantitativa y que una expresión poco intensa de un gen no necesariamente está relacionada con su función. En el caso de las 48 hpf, el miR-133b al expresarse en mayor medida que a las 24 hpf en el diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo (Fig. 48 A, C y E) muestra que este miRNA tenga una mayor función en estadios tardíos a nivel del SNC. De manera análoga a nuestros resultados, Kim y cols. (2007) muestran una mayor cantidad del miR-133b en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo del cerebro humano. La expresión en los somitos indica que este miRNA es vital en el correcto desarrollo del músculo esquelético y esto se observa también en trabajos de investigación realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, en el que se relaciona a la familia del miRNA-133 en el desarrollo y diferenciación del músculo esquelético (Sweetman y cols., 2008), junto con otros miRNAs como el miR-133a (Deng y cols., 2011), miR-1 (Chen y cols., 2006; Mishima y cols., 2009) y miR-206 (Koutsoulidou y cols., 2011), incluso considerándose a estos miRNAs como factores reguladores del músculo. El miR-133b puede afectar también la expresión de otros genes ya que los miRNAs tienen el potencial de unirse por lo menos a 100 tipos diferentes de mRNA, en la región 5'UTR, 3'UTR y la región codificante de aminoácidos, proveniente de varios genes (Brennecke y cols., 2005), y además cada una de estas regiones 5'UTR y 3'UTR presentan sitios de unión potenciales para varios tipos de miRNAs.

La exposición de los embriones de pez cebra a clorhidrato de cocaína induce una disminución de la expresión del miR-133b en el encéfalo principalmente a las 48 hpf (Fig. 48 B, D y F). Esta disminución del miR-133b estudiado por qPCR (Fig. 46) podría deberse a la disminución en el diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, no obstante en los somitos, al igual que a las 24 hpf, es difícil poder afirmar si la cocaína induce algún cambio en la expresión de este miRNA (Fig. 48 B, D y F). La alteración en la expresión del miR-133b por acción de la cocaína en los somitos es difícil distinguirlo, aunque nuestros resultados por qPCR indican que la cocaína disminuye la expresión del miR-133b de manera significativa, y siendo, posiblemente, en su mayor parte a nivel de somitos. La expresión del miR-133b en los somitos que originarán el músculo esquelético, indica que este miRNA tiene un rol clave en el desarrollo y función de los músculos y que la cocaína podría interferir con estos procesos durante el desarrollo o incluso alterar estos procesos irreversiblemente de por vida. Debemos enfatizar que el miR-133b al expresarse en el músculo esquelético de las aletas laterales del embrión de pez cebra a las 48 hpf (Fig. 48 E) presente una gran relevancia en la flotación y natación del pez cebra y sorprende cómo moléculas muy pequeñas puedan tener una acción muy importante en la supervivencia de los embriones. Un desarrollo normal de las aletas garantiza que el embrión y su posterior fase larvaria del pez cebra puedan desplazarse libremente en busca de alimentos y evitar los estímulos nocivos que pongan en riesgo su vida, pero si los músculos de la aleta están alterados por alguna afectación que sufra el miR-133b, es de suponer que el embrión perecerá antes de llegar a su vida adulta, o incluso en peces adultos puede comprometer su supervivencia.

Es muy interesante como estas moléculas muy pequeñas tengan un rol importante en los procesos de desarrollo y función de muchos procesos biológicos. Los datos analizados en conjunto por *ISH* y la técnica de la qPCR indican que la cocaína produce cambios en la expresión del miR-133b, lo que sugiere que la cocaína puede modular los efectos que presente el miR-133b y además indirectamente afectar a los dianas de este miRNA. Asimismo, la cocaína puede inducir alteraciones en la expresión del desarrollo del músculo esquelético.

5.10. Silenciamiento del miRNA 133b

Cuando microinyectamos la secuencia 3'UTR-Pitx3, diana del miR-133b, se incrementó la expresión de *pitx3* y *drd2a* (Fig. 45 B y C). Este incremento se debe a que la administración exógena de 3'UTR-Pitx3 interactúa con el miR-133b (Sánchez-Simón y cols., 2010) y al haber más *pitx3* endógeno libre, éste influye en la mayor expresión del receptor *drd2a*, mientras que el *drd2b* muestra una disminución de su expresión a las 24 hpf. El aumento *drd2a* y la disminución de *drd2b* inducidos por el silenciamiento del miR-133b a las 24 hpf (Fig. 45 C y D) es semejante al aumento de *drd2a* y la disminución de *drd2b* producido por la cocaína a las 24 hpf (Fig. 31 B y C), lo cual puede ser debido a la disminución de la expresión del miR-133b producido por la acción de la cocaína (Fig. 46).

Nuestros resultados sugieren además, que la disminución del mir133b por acción de la cocaína a las 24 hpf, se corresponde con un incremento de la expresión de *pitx3* (Fig. 37B), y de los genes afectados por este factor de transcripción como son *th* y *dat* (Fig. 35 y 36). Esto indica que el miR-133b también es un diana de la cocaína, y la afectación del miR-133b puede modular sus genes diana tales como el Pitx3 y a los genes relacionados a este factor de transcripción. Nuestras observaciones de la expresión del miR-133b por la microinyección de la

secuencia de DNA de 3'UTR-Pitx3, son semejantes a los encontrados por Sánchez-Simón y cols. (2010), quienes al silenciar al miR-133b muestran una disminución del miR-133b y aumento de Pitx3 y de sus genes diana TH y DAT.

Tomando en cuenta de forma global nuestras observaciones, podemos decir que la cocaína afecta el desarrollo de las neuronas dopaminérgicas a través de tres posibles mecanismos de regulación del sistema dopaminérgico (Fig. 54 y 55), por un lado la cocaína afecta al factor de transcripción Lmx1b el cual es indispensable para la formación de otros factores de transcripción como son Nurr1 y Pitx3 (estos dos se complementan en su acción) los cuales son imprescindibles para la expresión de la TH, el DAT y los receptores dopaminérgicos y el VMT2. Por otro lado, tendríamos un segundo mecanismo dado por la regulación del miR-133b sobre el *pitx3* (sobre todo en estadios tempranos del desarrollo embrionario). Un tercer mecanismo, estaría dado por la proteína Nodal (*ndr2*), la cual es un importante regulador de *Otp* y este factor de transcripción regula a su vez la expresión de *th*. Por lo tanto, estos mecanismos descritos en conjunto intervienen en la formación de las neuronas dopaminérgicas durante la embriogénesis y son afectados por la cocaína de manera diferencial de acuerdo al estadio embrionario. Durante el estadio de las 24 hpf, cuando el sistema nervioso se ha formado, proponemos que la cocaína afecta la ruta de dos mecanismos principalmente (Fig. 54). En el primer mecanismo *lmx1b*, regula a *nurr1* y *th*, y la cocaína al producir un aumento de la expresión de *lmx1b*, genera un aumento del factor de transcripción *nurr1* y de sus genes diana *th*, *dat* y *drd2a* (flechas rojas). El segundo mecanismo está mediado por el mir-133b (flecha azul), en la cual la cocaína al producir una disminución del miR-133b induce un aumento de *pitx3* y como consecuencia un incremento en los niveles de expresión de *th*, *dat* y *drd2a*. El tercer mecanismo esta

mediado por *ndr2* y *otp*, en la cual la cocaína al producir una disminución de *ndr2* y de *otp* (específicamente el *otpa*) debería disminuir la expresión de *th* y *dat*, sin embargo produce todo lo contrario, esto se puede atribuir a que la *th* al estar regulada por otros factores de transcripción tiene una menor dependencia por *ndr2* a las 24 hpf (Fig. 54).

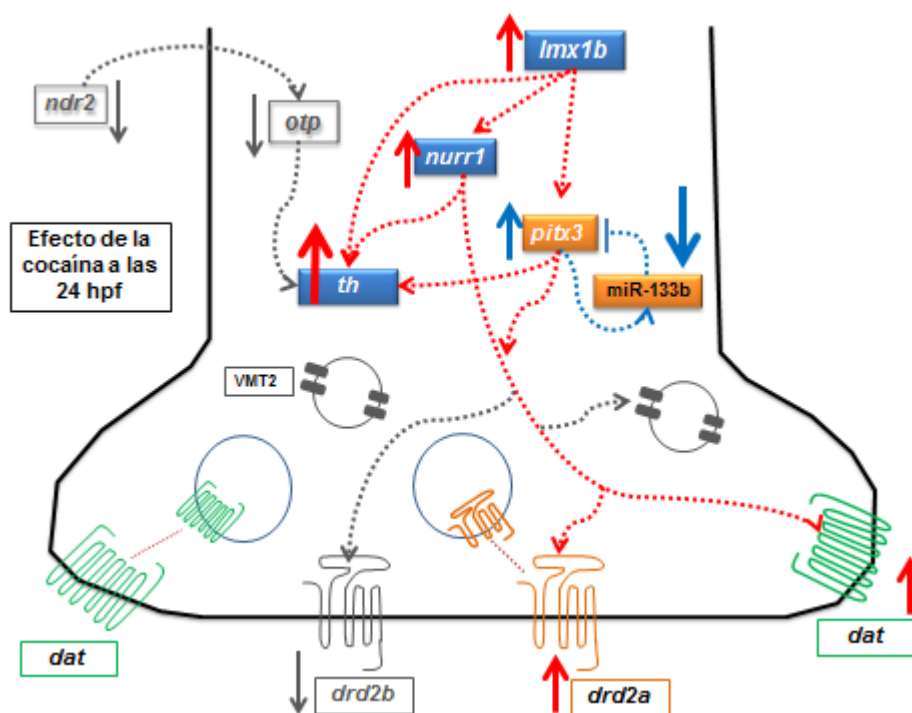


Fig. 54 Esquema que describe el mecanismo por el cual la cocaína afecta la expresión de los factores de transcripción que intervienen en el desarrollo del sistema dopaminérgico durante las 24 hpf. La cocaína afecta principalmente los factores de transcripción *lmx1b.1*, *lmx1b.2*, *nurr1* y *pitx 3* (flechas rojas), asimismo, estos producen un aumento de sus dianas *th1*, *drd2a* (flechas rojas). Por otro lado, la cocaína afectando la expresión del miR-133b (flecha azul) incrementa la expresión de *pitx3*. El *ndr2* y el factor de transcripción Otp (*otpa* y *otpb*) no tendrían una acción relevante en el desarrollo del sistema dopaminérgico. Las flecha rojas y azules indican el aumento de expresión, mientras que todos los trazos discontinuos muestran el mecanismo de acción de los factores de transcripción y del miR-133b sobre sus genes diana. Las flechas negras muestran la expresión de *ndr2*, *otp* y *drd2b*.

Cuando la organogénesis ha concluido en el pez cebra, de los tres mecanismos que planteamos en párrafos anteriores, la cocaína sólo afecta a uno de estos. El mecanismo de la señalización nodal es que se afecta en su expresión por acción de la cocaína, la expresión de *ndr2* se muestra disminuida y de igual manera el factor de transcripción *otpb* (flechas verdes), asimismo el gen diana de

Estos esquemas, que representan posibles mecanismos de acción de la cocaína sobre el sistema dopaminérgico parten de la base de que hay diferenciación en la acción de los factores de transcripción a las 24 y 48 hpf en la formación del sistema dopaminérgico, y que los requerimientos moleculares en estos estadios son distintos según avanza el desarrollo embrionario. A las 24 hpf presentan una mayor relevancia los factores de transcripción *lmx1b.1*, *lmx1b.2*, *nurr1*, *pitx3* y el miR-133b y son los más afectados por acción de la cocaína, mientras que las 48 hpf los que tienen la mayor implicación en la formación del sistema dopaminérgico son la señalización Nodal (*ndr2*) y el factor de transcripción *otp* que además tienen una mayor vulnerabilidad a los efectos de la cocaína. Estudios futuros sobre la regulación de los factores de transcripción, el miR-133b y la señalización Nodal, podrían ampliar o avalar los mecanismos que proponemos, lo cual puede ser de gran utilidad en el campo de la búsqueda de fármacos que puedan controlar el sistema dopaminérgico y como consecuencia los mecanismos endógenos que describen el fenómeno de la adicción.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten llegar a los siguientes conclusiones:

1. En relación con la expresión de los receptores dopaminérgicos durante el desarrollo embrionario del pez cebra y la influencia de la cocaína
 - ❖ Es la primera vez que se relaciona la acción de la cocaína en la formación del sistema dopaminérgico en embriones del pez cebra. En este modelo, la cocaína altera la expresión de genes necesarios para el correcto desarrollo y regulación del sistema dopaminérgico.
 - ❖ El tiempo de exposición a la cocaína constituye un factor relevante para la acción de la cocaína sobre los receptores dopaminérgicos *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* durante el desarrollo embrionario del pez cebra,
2. Efecto de la cocaína en la expresión de la *th* y el *dat*
 - ❖ Los cambios producidos por la cocaína en la expresión de la *th* y *dat* en el desarrollo embrionario afectan el correcto desarrollo de las neuronas dopaminérgicas.
 - ❖ La exposición a cocaína, durante la embriogénesis del pez cebra, altera la expresión tanto temporal como espacial de la tirosina hidroxilasa en dos estadios críticos del desarrollo
3. Al haber analizado 6 factores de transcripción, *Imx1b.1*, *Imx1b.2*, *otpa*, *otpb*, *nurr1*, *pitx3* y un gen relacionado a la proteína Nodal (*ndr2*), podemos concluir que la cocaína altera la expresión de estos factores en los estadios embrionarios del pez cebra estudiados.

- ❖ Los factores de transcripción *Lmx1b.1* y *Lmx1b.2* son necesarios para la expresión de *nurr1* y *th* en estadios embrionarios de pez cebra y por consiguiente la cocaína puede afectar la expresión de estos genes a través de sus moduladores, permitiéndonos aportar un posible mecanismo de acción de la cocaína.
- ❖ Los cambios en la expresión espacial y temporal de *lmx1b.1*, *lmx1b.2*, provocados por la acción de la cocaína pueden conllevar a secuelas en el curso natural del desarrollo del sistema dopaminérgico en embriones de pez cebra.
- ❖ La cocaína afecta la expresión del gen de la proteína Nodal, *ndr2*, y del factor de transcripción *otp* al verse ambos implicados en un tipo de regulación positiva en el pez cebra y al ser este factor de transcripción *Otpa* y *Otpb* importantes para la expresión de la *th*, nos indica otro posible mecanismo de acción de la cocaína.

4. Expresión temporal y espacial del miR-133b y el efecto de la cocaína

- ❖ La distribución espacial del miR-133b en el diencéfalo y otras áreas del SNC nos dan a entender la importancia de este miRNA en el desarrollo neurológico durante el desarrollo embrionario del pez cebra.
- ❖ La expresión del miR-133b en somitos, muestra que este miRNA tiene un rol clave en el desarrollo y función del músculo esquelético y la cocaína puede afectar este correcto desarrollo
- ❖ La cocaína inhibiendo la expresión del miR-133b produce cambios en la expresión del factor de transcripción *pitx3* y de los receptores dopaminérgicos *drd2a* y *drd2b*.

Resumiendo de manera global, el presente trabajo aporta información sobre la importancia de los diferentes factores de transcripción *Lmx1b*, *Otp*, *Nurr1*, *Pitx3* y el *miR-133b* en el desarrollo y mantenimiento del sistema dopaminérgico en el pez cebra y cómo la cocaína puede afectar el desarrollo de éste sistema y sus componentes a través de tres posibles mecanismos. Estos hallazgos serían más críticos en los embriones de gestantes que consumen cocaína y otras sustancias adictivas durante el embarazo. Por lo descrito, la existencia de múltiples factores de transcripción que intervienen en la formación del sistema dopaminérgico explica la gran complejidad en la acción que presenta la cocaína (además del bloqueo del transportador del DAT), esto hace comprensible el por qué no se ha logrado desarrollar hasta el momento un medicamento eficaz para el tratamiento de la adicción que la cocaína produce. Si se pretende elaborar un antídoto, este debería tener múltiples acciones y a diferentes niveles, es decir desarrollar diferentes fármacos con mecanismos de acción diferentes con un objetivo común y no un único fármaco.

ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación absoluta del número de transcritos de *ef1a* en embriones control y expuestos a cocaína

Número de copias de cDNA de <i>ef1a</i> en embriones de pez cebra control y expuestos a cocaína					
	8hpf	16hpf	24hpf	48hpf	72hpf
Control	1737000 ± 195800	1576000 ± 435300	1451000 ± 317300	1464000 ± 163300	1719000 ± 338600
Cocaína	1901000 ± 274500	1464000 ± 163300	1719000 ± 338600	1451000 ± 317300	1756000 ± 450200

Expresión de *ef1a* en los embriones del grupo control. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 2. Comparación de la cuantificación absoluta del número de transcritos de los receptores dopaminérgicos *drd1*, *drd2a*, *drd2b* y *drd3* en el grupo control y grupo expuestos a cocaína.

Nº de copias de cDNA de los receptores dopaminérgicos en los diferentes estadios embrionarios del pez cebra									
Estadios de desarrollo	<i>drd1</i>		<i>drd2a</i>		<i>drd2b</i>		<i>drd3</i>		
	control	cocaína	control	cocaína	control	cocaína	control	cocaína	
	8 hpf	154,1 ± 10,15	254,5 ± 10,82	51,85 ± 5,117	25,25 ± 2,128	113,8 ± 19,73	157,5 ± 23,59	321.6 ± 8.265	426.2 ± 49.69
16 hpf	247,7 ± 82,50	474,4 ± 38,03	131,9 ± 28,32	133,4 ± 26,55	531,1 ± 38,29	621,5 ± 38,27	405.9 ± 14.49	402.5 ± 41.99	
24 hpf	446,6 ± 76,52	334,2 ± 40,44	141.2 ± 5.614	215,3 ± 22,48	9652 ± 585.5	4876 ± 818.9	380.4 ± 17.84	323.1 ± 25.90	
48 hpf	342,0 ± 20,29	424,8 ± 33,57	298.0 ± 28.24	493.6 ± 61.52	11570 ± 748.1	6621 ± 379.9	416.3 ± 37.71	684.4 ± 31.86	
72 hpf	888,3 ± 23,61	713,3 ± 61,55	1019 ± 124.5	552.2 ± 112.4	13100 ± 857.9	16700 ± 1907	1515 ± 37.29	806.6 ± 112.1	

Se observa que la expresión de los receptores dopaminérgicos en los embriones del grupo control y expuestos a cocaína es variable de acuerdo al estadio de desarrollo. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 3. Cuantificación absoluta del número de transcritos de *ef1a*

Nº de copias de cDNA de <i>ef1a</i> en los estadios de las 24 y 48 hpf del pez cebra				
	24 hpf		48 hpf	
	control	cocaína	control	cocaína
<i>ef1a</i>	5710000 ± 509200	5656000 ± 815900	6993000 ± 21 68000	6522000 ± 2208000

Cuantificación absoluta del número de transcritos de *ef1a* amplificados en 5ng de cDNA de cada estadio embrionario (embriones expuestos y no expuestos a 1,5 µM de clorhidrato de cocaína). Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 4. Cuantificación absoluta de *th* en los estadios de 24, 42, 44, 48 hpf

Nº de copias de cDNA de <i>th</i> en los diferentes estadios embrionarios del pez cebra					
	24hpf	42hpf	44hpf	46hpf	48hpf
control	348.1 ± 12.94	827.1 ± 42.11	930.6 ± 56.60	604.2 ± 97.17	755.7 ± 15.23
cocaína	650.2 ± 13.33	661.0 ± 76.87	538.8 ± 137.5	316.2 ± 48.66	237.2 ± 9.794

Cuantificación absoluta de *th* en los estadios de 24, 42, 44, 48 hpf para el grupo control y el expuesto a cocaína. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 5. Cuantificación absoluta del *dat* en los estadios de 24, 42, 44, 48 hpf

Nº de copias de cDNA de <i>dat</i> en los diferentes estadios embrionarios del pez cebra					
	24hpf	42hpf	44hpf	46hpf	48hpf
control	1932 ± 58.98	2192 ± 48.12	1752 ± 48.37	2054 ± 109.3	2224 ± 36.26
cocaína	2214 ± 63.00	1896 ± 22.19	1836 ± 59.87	1742 ± 60.46	1889 ± 78.56

Cuantificación absoluta de *dat* en los estadios de 24, 42, 44, 48 hpf para el grupo control y el expuesto a cocaína. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 6. Comparación de la cuantificación absoluta del número de transcritos de los factores de transcripción *nurr1* y *pitx3*

Nº de copias de cDNA de <i>nurr1</i> y <i>pitx3</i>				
	24 hpf		48 hpf	
	control	cocaína	control	cocaína
<i>nurr1</i>	686,9 ± 79,61	973,6 ± 106,8	3587 ± 28,11	1982 ± 50,34
<i>pitx3</i>	1763 ± 33,91	2022 ± 68,88	6418 ± 313,1	3360 ± 377,1

Comparación de la cuantificación absoluta del número de transcritos de los factores de transcripción *nurr1* y *pitx3*, amplificados de 5ng de cDNA por qPCR. Se observa que la expresión de los factores de transcripción tras la exposición de 1,5 µM de clorhidrato de cocaína sufre variaciones tanto en el grupo control y el grupo expuesto a cocaína en los estadios de las 24 y 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 7. Comparación de la cuantificación absoluta del número de transcritos de los factores de transcripción *lmx1b.1* y *lmx1b.2*

Nº de copias de cDNA de <i>lmx1b.1</i> y <i>lmx1b.2</i>				
	24 hpf		48 hpf	
	control	cocaína	control	cocaína
<i>lmx1b.1</i>	2290 ± 6520	3052 ± 249,2	3178 ± 241,9	1982 ± 50,34
<i>lmx1b.2</i>	1343 ± 83,98	1835 ± 132,1	1760 ± 51,93	2483 ± 206,1

Comparación de la cuantificación absoluta del número de transcritos de los factores de transcripción *lmx1b.1* y *lmx1b.2* amplificados de 5ng de cDNA por qPCR. Se observa que la expresión de los factores de transcripción tras la exposición de 1,5 µM de clorhidrato de cocaína sufre variaciones tanto en el grupo control y los de cocaína en los estadios de las 24 y 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 8. Comparación de la cuantificación absoluta del número de transcritos de los factores de transcripción *otpa* y *otpb*

Nº de copias de cDNA de <i>otpa</i> y <i>otpb</i>				
	24 hpf		48 hpf	
	control	cocaína	control	cocaína
<i>otpa</i>	1565 ± 132,4	770,9 ± 117,0	3183 ± 248,5	5623 ± 429,9
<i>otpb</i>	4451 ± 186,7	1630 ± 68,19	12250 ± 603,9	6262 ± 412,1

Comparación de la cuantificación absoluta del número de transcritos de los factores de transcripción *otpa* y *otpb*, amplificados de 5ng de cDNA por qPCR. Se observa que la expresión de los factores de transcripción tras la exposición de 1,5 µM de clorhidrato de cocaína sufre variaciones tanto en el grupo control y el grupo expuesto a cocaína en los estadios de las 24 y 48 hpf. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 9. Cuantificación absoluta del *ndr2* a las 24 y 48 hpf

Nº de copias de cDNA del <i>ndr2</i>				
	24 hpf		48 hpf	
	control	cocaína	control	cocaína
<i>ndr2</i>	397,8 ± 27,12	244,2 ± 21,31	328,9 ± 12,67	258,3 ± 19,50

Cuantificación absoluta del *ndr2* a las 24 y 48 hpf tanto para el grupo control y el grupo expuesto a cocaína. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 10. Cuantificación absoluta del número de transcritos de *ef1α*, *pitx*, *drd2a* y *drd2b* tras la microinyección de *pitx3*-3UTR.

Nº de copias de cDNA a las 24 hpf en el pez cebra		
	Control	microinyección <i>Pitx3</i> -3UTR
<i>Ef1a</i>	603400 ± 137300	577300 ± 86880
<i>pitx3</i>	1698 ± 187.9	3610 ± 253.9
<i>drd2a</i>	146.4 ± 16.54	215.7 ± 21.20
<i>drd2b</i>	12010 ± 1283	7252 ± 1649

Cuantificación absoluta del número de transcritos de *ef1α*, *pitx*, *drd2a* y *drd2b* tras la microinyección de *pitx3*-3UTR. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

Anexo 11. Cuantificación absoluta del miR-133b a las 24 y 48 hpf

Nº de copias de cDNA del <i>mir-133b</i>				
	24 hpf		48 hpf	
	control	cocaína	control	cocaína
<i>mir-133b</i>	51780 ± 13240	18070 ± 5099	115900 ± 32940	1387 ± 243,7

Cuantificación absoluta del miR-133b a las 24 y 48 hpf tanto para el grupo control y el grupo expuesto a cocaína. Doscientos cincuenta embriones han sido empleados para la extracción de RNA y la síntesis de cDNA. Los números mostrados son el promedio del número de copias de cDNA ± EEM.

	▼	TM 1	
Humano		MRTLNTSAMDGTG-LVVERDFSVRILTACFLSLLILSTLLGNTLVCAAVIRFRHLRSKVT	59
Rata		-MAPNTSTMDEAG-LPAERDFSFRLTACFLSLLILSTLLGNTLVCAAVIRFRHLRSKVT	58
Ratón		-MAPNTSTMDEAG-LPVERDFSFRLTACFLSLLILSTLLGNTLVCAAVIRFRHLRSKVT	58
Fugu		-MAQNFSTVGDGKQMLLERDSSKRVLTGCFLSLLIF'TLLGNTLVCAAVTKFRHLRSKVT	59
drd1		-MDVNYSTVLDSS--VSQRDSSKRVLTGCFLSLLILSTLLGNTLVCAAVTKFRHLRSKVT	57
		* *:: : ** * *:* .***** : :***** . * :*****	
	TM 2	TM 3	
Humano		NFFVISLAVSDLLVAVLVPWKAVAEIAGFWPFGSFCNIWVAFDIMCSTASILNLCVIV	119
Rata		NFFVISLAVSDLLVAVLVPWKAVAEIAGFWPFGSFCNIWVAFDIMCSTASILNLCVIV	118
Ratón		NFFVISLAVSDLLVAVLVPWKAVAEIAGFWPFGSFCNIWVAFDIMCSTASILNLCVIV	118
Fugu		NFFVISLAISDLLVAILVMPWKAATEIMGFWPFGEFCNIWVAFDIMCSTASILNLCVIV	119
drd1		NFFVISLAISDLLVAILVMPWKAATEIVGFWPFAGCDVWVAFDIMCSTASILNLCVIV	117
		*****:*****:*****.* ***** **: :*****	
	◆	TM 4	▼
Humano		DRYWAISSPFYERKMTPKAAFILISVAWTLVLSVLSFIPVQLSWHKAKPTSPSDGNATSL	179
Rata		DRYWAISSPFQYERKMTPKAAFILISVAWTLVLSVLSFIPVQLSWHKAKPTWPLDGNFTSL	178
Ratón		DRYWAISSPFQYERKMTPKAAFILISVAWTLVLSVLSFIPVQLSWHKAKPTWPLDGNFTSL	178
Fugu		DRYWAISSPFYERKMTPKVAACLMSVAVWTLVLSVLSFIPVQLNWHKAQTASYVELNGTYA	179
drd1		DRYWAISSPFYERKMTPKAVAFIMISVAVWTLVLSVLSFIPVQLNWHKAQTTSYTELNGTYG	177
		*****:*****.* :*****:*****.***:: : * *	
	TM 5		
Humano		AETID-NCDSLSRITYAIISSSVISFYIPVAIMIVTYTRIIYRIAQKQIRRIALERA AVHA	238
Rata		EDTEDDNC DTRLSRITYAIISSSLISFYIPVAIMIVTYTSIYRIAQKQIRRIALERA AVHA	238
Ratón		EDAEDDNC DTRLSRITYAIISSSLISFYIPVAIMIVTYTSIYRIAQKQIRRIALERA AVHA	238
Fugu		GDLPPDNC DSSLNRTYAIISSSLISFYIPVAIMIVTYTRIIYRIAQKQIRRIALERA AVHA	239
drd1		-ELPPDNC DSSLNRTYAIISSSLISFYIPVAIMIVTYTRIIYRIAQKQIRRIALERA AVHA	236
		: ***: *.*****:*****:**** *****:***** *	
	◆ ◆ ◆	TM 6	
Humano		KNCQTTTGNGKPVVECSQPESSEFKMSFKRETKVLKTLVIMGVFVCCWLPFFILNLCILPFC	298
Rata		KNCQTTAGNGNPVECAQSESEFKMSFKRETKVLKTLVIMGVFVCCWLPFFISNCMPFC	298
Ratón		KNCQTTTGNGNPVECSQSESEFKMSFKRETKVLKTLVIMGVFVCCWLPFFISNCMPFC	298
Fugu		KNRHSSMGNSLMESE--ECSFKMSFKRETKVLKTLVIMGVFVCCWLPFFILNLCMPFC	296
drd1		KNRHSSMGNNAMES--ESSFKMSFKRETKVLKTLVIMGVFVCCWLPFFVLNLCMPFC	293
		** :: : * . :* . * .*****:*****:*****:*****:*****	
	TM 7		
Humano		GSETQPF-CIDSNTFDVFVWFGWANSNLNPIIYAFNADFRKAFSTLLGCYRLCPATNNA	357
Rata		GSEETQPF-CIDSITFDVFVWFGWANSNLNPIIYAFNADFRKAFSTLLGCYRLCPTNNA	357
Ratón		GSEETQPF-CIDSITFDVFVWFGWANSNLNPIIYAFNADFRKAFSTLLGCYRLCPTNNA	357
Fugu		EADTTDFPCISSTFDVFVWFGWANSNLNPIIYAFNADFRKAFSILLGCHRLCPGNS-A	355
drd1		NPNESTDFLCISSTFDVFVWFGWANSNLNPIIYAFNADFRKAFSILLGCHRLCPGSS-A	352
		. :: : * * . * *****:*****:***** . * * . * . * . * . * . * . *	
Humano		IETVSINNGAAMF--SSHHEPRGSIKDCN--LVYLIPHAVGSSED--LKK-----EEA	406
Rata		IETVSINNGAVVF--SSHHEPRGSIKDCN--LVYLIPHAVGSSED--LKK-----EEA	406
Ratón		IETVSINNGAVMF--SSHHEPRGSIKDCN--LVYLIPHAVGSSED--LKR-----EEA	406
Fugu		IEIVSINNTGAPLSPSCQYQPKSHIPKEGNHSSSYVIPHSLCQEELQKKGDFGGEME	415
drd1		IEIVSINNCGPPS--TSQYQPKGHIPKEGNNSN-YEIPHSIICQEENQKK-----EDD	404
		** * * * . . : : : : * . * : * * * * : . * : * : *	
Humano		AGIARP-LEKLSPALSVILDYD TDVSLEKIQPITQNGQHPT---	446
Rata		GGIARP-LEKLSPALSVILDYD TDVSLEKIQPVTHSGQHST---	446
Ratón		GGIPKP-LEKLSPALSVILDYD TDVSLEKIQPVTHSGQHST---	446
Fugu		VGLVNAMEKVS PAISGNFSDAAVLTLETINPITQNGQHKS MSC	459
drd1		SGIKT--FDKLSPSMSGTLDSDADVSLEKINPITQNGQHKSIPC	446
		* : : : * * : * * : * * : * * : * * : * * : *	

Anexo 12. Comparación de receptores D1 de dopamina de humano, rata, ratón pez cebra y fugu. Las secuencias fueron alineadas con CLUSTALW. Los asteriscos, dos puntos y puntos denotan aminoácidos idénticos, sustitución conservada y sustitución semiconservada, respectivamente. Las líneas sólidas indican los dominios transmembrana. Los lugares de glicosilación, fosforilación por PKA (Proteína Kinasa A) PKC (Proteína Kinasa C) están indicados por triángulos, diamantes cerrados y diamantes abiertos, respectivamente.

		TM 1	
Humano	-----MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSDGKADRPYNYATLLTLLIAIVVFGNVL		54
Rata	-----MDPLNLSWYDDDLERQNSRPFNGSEKADRPYNYAMLLTLLIFIVVFGNVL		54
drd2a	----MAMFSSGEWLWNDSEHSFTPGGNYSPASGVVEAKR-NYYAMLYSLLLIAIVVFGNVL		55
drd2b	-----MDFLTEYPYNDTY-YDNGTGALN-CTGCEAKHQYNYAMLLTLLIFVIVFGNVL		52
drd2l	MPVLNVTEELTITASPSSAVFLSLHQSNCSVSPSPSPSPYNYFYAVLLVLLIFCVVFGNVL		60
		: * ** :*****	
		TM 2	
Humano	VCMVVSREKALQTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVG-EWKFSRIHCDIFVTL		113
Rata	VCMVVSREKALQTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVG-EWKFSRIHCDIFVTL		113
drd2a	VCIAVLRERALQTTNYLVVSLAVADLLVASLVMPWAVYLEVVGAWLFSRLYCNVFTL		115
drd2b	VCMVVSREKALQTTNYLIVSLAVADLLVATLVMPWVVYLEVVG-EWRFSKIHCDFVTL		111
drd2l	VCVAVSREKALQTTNYLIVSLAVSDLLLATLVMPWGVYLEVVG-EWRFSRIHCDVLLTL		119
		: * ** :*****:*****:***:*:***** ***** * **:::*****	
		TM 3	TM 4
Humano	DVMMCTASILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWVLSFTISCPPLFG		173
Rata	DVMMCTASILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMIAIVVWVLSFTISCPPLFG		173
drd2a	DVMMCTASILNLCASIDRYTAVVMPVLYNTHSSRKRVSVMIAIVVWVLSFAISCPPLFG		175
drd2b	DVMMCTASILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISIVVWVLSFAISCPPLFG		171
drd2l	DVMMCTASILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSRRRVALMIAIVVWVLSFAISCPPLFG		179
		*****:*****:***:*:***** ***** * **:::*****	
		TM 5	
Humano	LNNADQNE--CIANPAFVVYSSIVSFYVFFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRVN--TKRS		228
Rata	LNNTGNNE--CIANPAFVVYSSIVSFYVFFIVTLLVYIKIYIVLRRRRKRVN--TKRS		228
drd2a	FNTTDDPA--VCSISNPDFVIYSSVVSFYLPFAVTLVYVRIYIFLRRRRKKIT-FRQGS		232
drd2b	LNNTATRDGSVCEIANPAFVVYSSIVSFYVFFIITLLVYVQIYVVLRRRRKRVN--TKRS		229
drd2l	LNNTASQEGRDSCFADPAFVVYSSIVSFYVFFIVTLLVYVQICVVLRRRRGRRTAPTRRA		239
		*::: * ** :***: ***:* :*****:* :.***: * :	
Humano	SRAFRAHLRAPLK--GNCTHPEDMKLCTVIMKSNGSFPVN--RRRVQEAARRAQELEM		283
Rata	SRAFRANLKTPLK--GNCTHPEDMKLCTVIMKSNGSFPVN--RRR--MDAARRAQELEM		281
drd2a	GKVQPASAPPSVETCLQDDAHKEKRDLSPIRINVI TESKEQVIRPRLLANCLRRKRQTA		292
drd2b	CQKTDADAQPPLK--EKCTHPEDVKLCTV IKTNGGVPKKNKAQLIKEVLHQGGDVGM		286
drd2l	ANTEPADAQRSCK--NKCTHPEDVKLCTLILKPPAAPQR-KKVTLVKEAVVHP--LAV		293
		. * . : . : * * . * . : : . : : :	
Humano	EMLSSTSPPERTR-YSPIPPSHHQTLTLPDPSHHGLHSTPDSPAKPEKNGHAKDH--PKIA		340
Rata	EMLSSTSPPERTR-YSPIPPSHHQTLTLPDPSHHGLHSNPDSPAKPEKNGHAKIVN-PRIA		339
drd2a	PAENSLPPVITLNYCSISQASFARTEQDANREEEEGDDEEQVAVRGCEVKKLAN-----		347
drd2b	EMVAGTSPPEKKK-LASSLVDDLATPPSPNHGSPSHA EYQSNQNGDEKNGHAKDVQSPKET		345
drd2l	EPVCSLS-ADREQ-TQTQPSGRAKLSLVAPCAG-----QSGPGRRD-----		334
		. . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . : . . . :	
		TM 6	
Humano	KIFEIQTMPNGKTRTSL-KTMSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPFFITHILNI		399
Rata	KFFEIQTMPNGKTRTSL-KTMSRRKLSQQKEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPFFITHILNI		398
drd2a	GRHTSLRPPRAAHAMVCPQARCRSMHSKEKKATQMLAIVLGVFLICWLPFFVTHILNT		407
drd2b	KPVETQALPNGKTRTFTVKTMSKRKMSQHEKKATQMLAIVLGVFIIICWLPFFITHILKT		405
drd2l	---TLQEKTHTEKHAHA-KERVGRKLSQQKERTATQMLAIVLGVFIIICWLPFFLTHVLLKA		390
		. . : : : ** :*****:*****:***:*	
		TM 7	
Humano	HCD-CNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNPIIYTFNIEFRKAFKILHC		445
Rata	HCD-CNIPPVLYSAFTWLGYN SAVNPIIYTFNIEFRKAFKILHC		444
drd2a	HCRACHIPPEVYSAFTWLGYN SALNPVIYTFNIEFRRAFIKILSC		454
drd2b	HCTSCVPLEMYNAFTWLGYN SAVNPIIYTFNVEFRKAFKILHC		452
drd2l	HCGSCCISPSLYSAFTWLGYN SAVNPIIYTFNIEFRKAFKILHC		437
		* * * . : * * . ***** :***:* :*****:***:* :*** *	

Anexo 13. Comparación de receptores D2 de dopamina de mamíferos y de pez cebra. Las secuencias fueron alineadas con CLUSTALW. Los asteriscos, dos puntos y puntos denotan aminoácidos idénticos, sustitución conservada y sustitución semiconservada, respectivamente. Las líneas sólidas indican los dominios transmembrana.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acampora D, Postiglione MP, Avantageggiato V, Di Bonito M, Vaccarino FM, Michaud J, Simeone A (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev* 13:2787-2800.
- Adinoff B (2004) Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv Rev Psychiatry* 12:305-320.
- Adinoff B, Rilling LM, Williams MJ, Schreffler E, Schepis TS, Rosvall T, Rao U (2007) Impulsivity, neural deficits, and the addictions: the "oops" factor in relapse. *J Addict Dis* 26 Suppl 1:25-39.
- Agathon A, Thisse C, Thisse B (2003) The molecular nature of the zebrafish tail organizer. *Nature* 424:448-452.
- Alavian KN, Scholz C, Simon HH (2008) Transcriptional regulation of mesencephalic dopaminergic neurons: the full circle of life and death. *Mov Disord* 23:319-328.
- Ambre J, Ruo TI, Nelson J, Belknap S (1988) Urinary excretion of cocaine, benzoylecgonine, and ecgonine methyl ester in humans. *J Anal Toxicol* 12:301-306.
- Andersen ML, Sawyer EK, Carroll FI, Howell LL Influence of chronic dopamine transporter inhibition by RTI-336 on motor behavior, sleep, and hormone levels in Rhesus monkeys. *Exp Clin Psychopharmacol*.
- Andersson E, Tryggvason U, Deng Q, Friling S, Alekseenko Z, Robert B, Perlmann T, Ericson J (2006) Identification of intrinsic determinants of midbrain dopamine neurons. *Cell* 124:393-405.
- Ang SL (2006) Transcriptional control of midbrain dopaminergic neuron development. *Development* 133:3499-3506.
- Appelboom T (1991) [Consumption of coca in history]. *Verh K Acad Geneesk Belg* 53:497-505.
- Aquilina-Beck A, Ilagan K, Liu Q, Liang JO (2007) Nodal signaling is required for closure of the anterior neural tube in zebrafish. *BMC Dev Biol* 7:126.
- Arbeille P, Maulik D, Salihagic A, Locatelli A, Lansac J, Platt LD (1997) Effect of long-term cocaine administration to pregnant ewes on fetal hemodynamics, oxygenation, and growth. *Obstet Gynecol* 90:795-802.

- Balda MA, Anderson KL, Itzhak Y (2009) The neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene contributes to the regulation of tyrosine hydroxylase (TH) by cocaine. *Neurosci Lett* 457:120-124.
- Balldin J, Berggren U, Lindstedt G, Sundkler A (1993) Further neuroendocrine evidence for reduced D2 dopamine receptor function in alcoholism. *Drug Alcohol Depend* 32:159-162.
- Bannon MJ, Pruetz B, Manning-Bog AB, Whitty CJ, Michelhaugh SK, Sacchetti P, Granneman JG, Mash DC, Schmidt CJ (2002) Decreased expression of the transcription factor NURR1 in dopamine neurons of cocaine abusers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6382-6385.
- Bannon MJ, Pruetz B, Barfield E, Schmidt CJ (2004) Transcription factors specifying dopamine phenotype are decreased in cocaine users. *Neuroreport* 15:401-404.
- Beaulieu JM, Del'guidice T, Sotnikova TD, Lemasson M, Gainetdinov RR Beyond cAMP: The Regulation of Akt and GSK3 by Dopamine Receptors. *Front Mol Neurosci* 4:38.
- Bello EP, Mateo Y, Gelman DM, Noain D, Shin JH, Low MJ, Alvarez VA, Lovinger DM, Rubinstein M Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors. *Nat Neurosci* 14:1033-1038.
- Bergman O, Westberg L, Nilsson LG, Adolfsson R, Eriksson E Preliminary evidence that polymorphisms in dopamine-related transcription factors LMX1A, LMX1B and PITX3 are associated with schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:1094-1097.
- Berhow MT, Russell DS, Terwilliger RZ, Beitner-Johnson D, Self DW, Lindsay RM, Nestler EJ (1995) Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neuroscience* 68:969-979.
- Berke JD, Hyman SE (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-532.
- Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ (2006) Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 311:864-868.
- Best JA, Nijhout HF, Reed MC (2009) Homeostatic mechanisms in dopamine synthesis and release: a mathematical model. *Theor Biol Med Model* 6:21.
- Blechman J, Borodovsky N, Eisenberg M, Nabel-Rosen H, Grimm J, Levkowitz G (2007) Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia. *Development* 134:4417-4426.

- Boehmler W, Obrecht-Pflumio S, Canfield V, Thisse C, Thisse B, Levenson R (2004) Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Dev Dyn* 230:481-493.
- Boehmler W, Carr T, Thisse C, Thisse B, Canfield VA, Levenson R (2007) D4 Dopamine receptor genes of zebrafish and effects of the antipsychotic clozapine on larval swimming behaviour. *Genes Brain Behav* 6:155-166.
- Boulay D, Depoortere R, Rostene W, Perrault G, Sanger DJ (1999) Dopamine D3 receptor agonists produce similar decreases in body temperature and locomotor activity in D3 knock-out and wild-type mice. *Neuropharmacology* 38:555-565.
- Brand M, Heisenberg CP, Jiang YJ, Beuchle D, Lun K, Furutani-Seiki M, Granato M, Haffter P, Hammerschmidt M, Kane DA, Kelsh RN, Mullins MC, Odenthal J, van Eeden FJ, Nusslein-Volhard C (1996) Mutations in zebrafish genes affecting the formation of the boundary between midbrain and hindbrain. *Development* 123:179-190.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 3:e85.
- Briand LA, Flagel SB, Seeman P, Robinson TE (2008) Cocaine self-administration produces a persistent increase in dopamine D2 High receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 18:551-556.
- Brick J, Erickson CK (1950) *Drugs, the brain, and behavior: the pharmacology of abuse and dependence*. The Haworth Medical Press Inc.
- Burton K, Calne DB (1984) Pharmacology of Parkinson's disease. *Neurol Clin* 2:461-472.
- Byrnes JJ, Pritchard GA, Koff JM, Miller LG (1993) Prenatal cocaine exposure: decreased sensitization to cocaine and decreased striatal dopamine transporter binding in offspring. *Neuropharmacology* 32:721-723.
- Caine SB, Negus SS, Mello NK, Patel S, Bristow L, Kulagowski J, Vallone D, Saiardi A, Borrelli E (2002) Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists. *J Neurosci* 22:2977-2988.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2999-3004.
- Calin GA, Liu CG, Sevignani C, Ferracin M, Felli N, Dumitru CD, Shimizu M, Cimmino A, Zupo S, Dono M, Dell'Aquila ML, Alder H, Rassenti L, Kipps TJ, Bullrich F,

- Negrini M, Croce CM (2004) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11755-11760.
- Callahan PM, De La Garza R, 2nd, Cunningham KA (1997) Mediation of the discriminative stimulus properties of cocaine by mesocorticolimbic dopamine systems. *Pharmacol Biochem Behav* 57:601-607.
- Callier S, Snapyan M, Le Crom S, Prou D, Vincent JD, Vernier P (2003) Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. *Biol Cell* 95:489-502.
- Casadei R, Pelleri MC, Vitale L, Facchin F, Lenzi L, Canaider S, Strippoli P, Frabetti F Identification of housekeeping genes suitable for gene expression analysis in the zebrafish. *Gene Expr Patterns* 11:271-276.
- Chao J, Nestler EJ (2004) Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu Rev Med* 55:113-132.
- Chen S, Xianwen C, Dehua X, Zhenguang L, Lingfei X, Smith SW, Zhongcheng Z (2003) Behavioral correction of Parkinsonian rats following the transplantation of immortalized fibroblasts genetically modified with TH and GCH genes. *Parkinsonism Relat Disord* 9 Suppl 2:S91-97.
- Chen R, Tilley MR, Wei H, Zhou F, Zhou FM, Ching S, Quan N, Stephens RL, Hill ER, Nottoli T, Han DD, Gu HH (2006) Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:9333-9338.
- Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ (2006) The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet* 38:228-233.
- Chen YC, Priyadarshini M, Panula P (2009) Complementary developmental expression of the two tyrosine hydroxylase transcripts in zebrafish. *Histochem Cell Biol* 132:375-381.
- Chinta SJ, Andersen JK (2005) Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 37:942-946.
- Choi WS, Ronnekleiv OK (1996) Effects of in utero cocaine exposure on the expression of mRNAs encoding the dopamine transporter and the D1, D2 and D5 dopamine receptor subtypes in fetal rhesus monkey. *Brain Res Dev Brain Res* 96:249-260.
- Choi SJ, Mazziro E, Koltz MG, Soliman KF (1998) Prenatal cocaine exposure affects postnatal dopaminergic systems in various regions of the rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 844:293-302.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.

- Civelli O, Bunzow JR, Zhou QY, Grandy DK (1992) The diversity of the dopamine receptors. *NIDA Res Monogr* 126:23-33.
- Clay SW, Allen J, Parran T (2008) A review of addiction. *Postgrad Med* 120:E01-07.
- Claye LH, Akunne HC, Davis MD, DeMattos S, Soliman KF (1995) Behavioral and neurochemical changes in the dopaminergic system after repeated cocaine administration. *Mol Neurobiol* 11:55-66.
- Cole LK, Ross LS (2001) Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev Biol* 240:123-142.
- Corominas M, Roncero C, Ribases M, Castells X, Casas M (2007) Brain-derived neurotrophic factor and its intracellular signaling pathways in cocaine addiction. *Neuropsychobiology* 55:2-13.
- Crandall JE, McCarthy DM, Araki KY, Sims JR, Ren JQ, Bhide PG (2007) Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex. *J Neurosci* 27:3813-3822.
- Cranwell-Bruce LA Drugs for Parkinson's disease. *Medsurg Nurs* 19:347-349, 355; quiz 350.
- Dackis CA, Gold MS (1985) Pharmacological approaches to cocaine addiction. *J Subst Abuse Treat* 2:139-145.
- Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M (2004) Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam Clin Pharmacol* 18:601-607.
- Darland T, Dowling JE (2001) Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11691-11696.
- Das G (1993) Cocaine abuse in North America: a milestone in history. *J Clin Pharmacol* 33:296-310.
- Del Giacco L, Sordino P, Pistocchi A, Andreakis N, Tarallo R, Di Benedetto B, Cotelli F (2006) Differential regulation of the zebrafish orthopedia 1 gene during fate determination of diencephalic neurons. *BMC Dev Biol* 6:50.
- Delaney-Black V, Covington C, Ostrea E, Jr., Romero A, Baker D, Tagle MT, Nordstrom-Klee B, Silvestre MA, Angelilli ML, Hack C, Long J (1996) Prenatal cocaine and neonatal outcome: evaluation of dose-response relationship. *Pediatrics* 98:735-740.
- Delaney-Black V, Covington C, Ostrea E, Jr., Romero A, Baker D, Tagle MT, Nordstrom-Klee B, Silvestre MA, Angelilli ML, Hack C, Long J (1996) Prenatal cocaine and neonatal outcome: evaluation of dose-response relationship. *Pediatrics* 98:735-740.

- Delvecchio C, Tiefenbach J, Krause HM The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay Drug Dev Technol* 9:354-361.
- Deng Z, Chen JF, Wang DZ Transgenic overexpression of miR-133a in skeletal muscle. *BMC Musculoskelet Disord* 12:115.
- Di Chiara G (1995) The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend* 38:95-137.
- Dlugos CA, Brown SJ, Rabin RA Gender differences in ethanol-induced behavioral sensitivity in zebrafish. *Alcohol* 45:11-18.
- Dlugos CA, Rabin RA (2003) Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations. *Pharmacol Biochem Behav* 74:471-480.
- Doherty JM, Masten VL, Powell SB, Ralph RJ, Klamer D, Low MJ, Geyer MA (2008) Contributions of dopamine D1, D2, and D3 receptor subtypes to the disruptive effects of cocaine on prepulse inhibition in mice. *Neuropsychopharmacology* 33:2648-2656.
- Dooley K, Zon LI (2000) Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr Opin Genet Dev* 10:252-256.
- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkuis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123:37-46.
- Dueck A, Meister G MicroRNA processing without Dicer. *Genome Biol* 11:123.
- Eyler FD, Warner TD, Behnke M, Hou W, Wobie K, Garvan CW (2009) Executive functioning at ages 5 and 7 years in children with prenatal cocaine exposure. *Dev Neurosci* 31:121-136.
- Falcon M, Pichini S, Joya J, Pujadas M, Sanchez A, Vall O, Algar OG, Luna A, de la Torre R, Rotolo MC, Pellegrini M Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: Comparison with testing in placental and fetal remains. *Forensic Sci Int*.
- Feldman B, Gates MA, Egan ES, Dougan ST, Rennebeck G, Sirotkin HI, Schier AF, Talbot WS (1998) Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* 395:181-185.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

- Feng Q (2005) Postnatal consequences of prenatal cocaine exposure and myocardial apoptosis: does cocaine in utero imperil the adult heart? *Br J Pharmacol* 144:887-888.
- Filippi A, Mahler J, Schweitzer J, Driever W Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes *th1* and *th2* reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *J Comp Neurol* 518:423-438.
- Filippi A, Durr K, Ryu S, Willaredt M, Holzschuh J, Driever W (2007) Expression and function of *nr4a2*, *lmx1b*, and *pitx3* in zebrafish dopaminergic and noradrenergic neuronal development. *BMC Dev Biol* 7:135.
- Fishman MC (2001) Genomics. Zebrafish--the canonical vertebrate. *Science* 294:1290-1291.
- Franco R, Seeman P, Barrera C, Aymerich MS Cocaine self-administration markedly increases dopamine D2 receptor negative cooperativity for dopamine binding: A receptor dimer-based analysis. *Synapse* 64:566-569.
- Friedman E, Yadin E, Wang HY (1996) Effect of prenatal cocaine on dopamine receptor-G protein coupling in mesocortical regions of the rabbit brain. *Neuroscience* 70:739-747.
- Fung YK, Reed JA, Lau YS (1989) Prenatal cocaine exposure fails to modify neurobehavioral responses and the striatal dopaminergic system in newborn rats. *Gen Pharmacol* 20:689-693.
- Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Caron MG (2002) Monoamine transporter pharmacology and mutant mice. *Trends Pharmacol Sci* 23:367-373.
- Gardner EL Addiction and brain reward and antireward pathways. *Adv Psychosom Med* 30:22-60.
- 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.
- Gifford AN, Johnson KM (1992) Effect of chronic cocaine treatment on D2 receptors regulating the release of dopamine and acetylcholine in the nucleus accumbens and striatum. *Pharmacol Biochem Behav* 41:841-846.
- Goldsmith P (2004) Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr Opin Pharmacol* 4:504-512.
- Goridis C, Rohrer H (2002) Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nat Rev Neurosci* 3:531-541.

- Guo S, Wilson SW, Cooke S, Chitnis AB, Driever W, Rosenthal A (1999) Mutations in the zebrafish unmask shared regulatory pathways controlling the development of catecholaminergic neurons. *Dev Biol* 208:473-487.
- Guo S, Brush J, Teraoka H, Goddard A, Wilson SW, Mullins MC, Rosenthal A (1999) Development of noradrenergic neurons in the zebrafish hindbrain requires BMP, FGF8, and the homeodomain protein soulless/Phox2a. *Neuron* 24:555-566.
- Guo S (2004) Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav* 3:63-74.
- Guo C, Qiu HY, Huang Y, Chen H, Yang RQ, Chen SD, Johnson RL, Chen ZF, Ding YQ (2007) Lmx1b is essential for Fgf8 and Wnt1 expression in the isthmic organizer during tectum and cerebellum development in mice. *Development* 134:317-325.
- Guo C, Qiu HY, Shi M, Huang Y, Johnson RL, Rubinstein M, Chen SD, Ding YQ (2008) Lmx1b-controlled isthmic organizer is essential for development of midbrain dopaminergic neurons. *J Neurosci* 28:14097-14106.
- Harvey JA (2004) Cocaine effects on the developing brain: current status. *Neurosci Biobehav Rev* 27:751-764.
- Hashisaki GT, Johns ME (1987) Cocaine applications in otorhinolaryngologic anesthesia. *Contemp Anesth Pract* 9:31-45.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit LM (2007) Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer* 7:246-255.
- Hoffmann HM, Nadal R, Vignes M, Ortiz J Chronic cocaine self-administration modulates ERK1/2 and CREB responses to dopamine receptor agonists in striatal slices. *Addict Biol.*
- Holzschuh J, Ryu S, Aberger F, Driever W (2001) Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mech Dev* 101:237-243.
- Holzschuh J, Hauptmann G, Driever W (2003) Genetic analysis of the roles of Hh, FGF8, and nodal signaling during catecholaminergic system development in the zebrafish brain. *J Neurosci* 23:5507-5519.
- Howard SG, Fisher R, Landry CF (1997) Alterations in the spontaneous release of dopamine and the density of the DA D2 receptor mRNA after chronic postnatal exposure to cocaine. *Brain Res Bull* 43:101-106.
- Huang YZ, Rothwell JC, Lu CS, Chuang WL, Chen RS Abnormal bidirectional plasticity-like effects in Parkinson's disease. *Brain* 134:2312-2320.

- Huang CC, Liang YC, Lee CC, Wu MY, Hsu KS (2009) Repeated cocaine administration decreases 5-HT(2A) receptor-mediated serotonergic enhancement of synaptic activity in rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 34:1979-1992.
- Huang X, Gu HH, Zhan CG (2009) Mechanism for cocaine blocking the transport of dopamine: insights from molecular modeling and dynamics simulations. *J Phys Chem B* 113:15057-15066.
- Hummel M, Unterwald EM (2002) D1 dopamine receptor: a putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. *J Cell Physiol* 191:17-27.
- Hwang DY, Ardayfio P, Kang UJ, Semina EV, Kim KS (2003) Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain Res Mol Brain Res* 114:123-131.
- Hwang DY, Hong S, Jeong JW, Choi S, Kim H, Kim J, Kim KS (2009) Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporter are molecular targets of Pitx3 in the ventral midbrain dopamine neurons. *J Neurochem* 111:1202-1212.
- Hyman SE (1996) Addiction to cocaine and amphetamine. *Neuron* 16:901-904.
- Hyman SE (2008) How might cocaine interfere with brain development? *PLoS Med* 5:e130.
- Jacobs FM, van Erp S, van der Linden AJ, von Oerthel L, Burbach JP, Smidt MP (2009) Pitx3 potentiates Nurr1 in dopamine neuron terminal differentiation through release of SMRT-mediated repression. *Development* 136:531-540.
- Jacobs FM, van der Linden AJ, Wang Y, von Oerthel L, Sul HS, Burbach JP, Smidt MP (2009) Identification of Dlk1, Ptpu and Khl1 as novel Nurr1 target genes in meso-diencephalic dopamine neurons. *Development* 136:2363-2373.
- Jaffe JA, Kimmel PL (2006) Chronic nephropathies of cocaine and heroin abuse: a critical review. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:655-667.
- Jakowec MW, Nixon K, Hogg E, McNeill T, Petzinger GM (2004) Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration of the mouse nigrostriatal pathway. *J Neurosci Res* 76:539-550.
- Jankovic J, Chen S, Le WD (2005) The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 77:128-138.
- Jin LQ, Wang HY, Friedman E (2001) Stimulated D(1) dopamine receptors couple to multiple Galpha proteins in different brain regions. *J Neurochem* 78:981-990.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Hu XT, Cooper DC, Wightman RM, White FJ, Caron MG (1999) Loss of autoreceptor functions in mice lacking the dopamine transporter. *Nat Neurosci* 2:649-655.

- Jones LB, Stanwood GD, Reinoso BS, Washington RA, Wang HY, Friedman E, Levitt P (2000) In utero cocaine-induced dysfunction of dopamine D1 receptor signaling and abnormal differentiation of cerebral cortical neurons. *J Neurosci* 20:4606-4614.
- Jones DT, Taylor WR, and Thornton JM (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.
- Kaslin J, Panula P (2001) Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 440:342-377.
- Kelley AE, Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci* 22:3306-3311.
- Kim Y, Wang WZ, Comte I, Pastrana E, Tran PB, Brown J, Miller RJ, Doetsch F, Molnar Z, Szele FG Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. *J Neurochem* 114:750-760.
- Kim KS, Kim CH, Hwang DY, Seo H, Chung S, Hong SJ, Lim JK, Anderson T, Isacson O (2003) Orphan nuclear receptor Nurr1 directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *J Neurochem* 85:622-634.
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A (2007) A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317:1220-1224.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253-310.
- King GR, Ellinwood EH, Jr., Silvia C, Joyner CM, Xue Z, Caron MG, Lee TH (1994) Withdrawal from continuous or intermittent cocaine administration: changes in D2 receptor function. *J Pharmacol Exp Ther* 269:743-749.
- Kleven MS, Perry BD, Woolverton WL, Seiden LS (1990) Effects of repeated injections of cocaine on D1 and D2 dopamine receptors in rat brain. *Brain Res* 532:265-270.
- Kloosterman WP, Plasterk RH (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 11:441-450.
- Kloosterman WP, Steiner FA, Berezikov E, de Bruijn E, van de Belt J, Verheul M, Cuppen E, Plasterk RH (2006) Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish. *Nucleic Acids Res* 34:2558-2569.
- Koob GF (1996) Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16:893-896.

- Koob GF, Nestler EJ (1997) The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9:482-497.
- Koob GF (1999) Cocaine reward and dopamine receptors: love at first site. *Arch Gen Psychiatry* 56:1107-1108.
- Korchounov A, Meyer MF, Krasnianski M Postsynaptic nigrostriatal dopamine receptors and their role in movement regulation. *J Neural Transm* 117:1359-1369.
- Koutsoulidou A, Mastroiannopoulos NP, Furling D, Uney JB, Phylactou LA Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. *BMC Dev Biol* 11:34.
- Kreek MJ, Borg L, Ducat E, Ray B Pharmacotherapy in the treatment of addiction: methadone. *J Addict Dis* 29:200-216.
- Kreek MJ (2001) Drug addictions. Molecular and cellular endpoints. *Ann N Y Acad Sci* 937:27-49.
- Kreek MJ, LaForge KS, Butelman E (2002) Pharmacotherapy of addictions. *Nat Rev Drug Discov* 1:710-726.
- Kreek MJ, Nielsen DA, Butelman ER, LaForge KS (2005) Genetic influences on impulsivity, risk taking, stress responsivity and vulnerability to drug abuse and addiction. *Nat Neurosci* 8:1450-1457.
- Kreek MJ, Bart G, Lilly C, LaForge KS, Nielsen DA (2005) Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacol Rev* 57:1-26.
- Kubrusly RC, Bhide PG Cocaine exposure modulates dopamine and adenosine signaling in the fetal brain. *Neuropharmacology* 58:436-443.
- Langheinrich U, Hennen E, Stott G, Vacun G (2002) Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling. *Curr Biol* 12:2023-2028.
- Langheinrich U (2003) Zebrafish: a new model on the pharmaceutical catwalk. *Bioessays* 25:904-912.
- Le Foll B, Frances H, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P (2002) Role of the dopamine D3 receptor in reactivity to cocaine-associated cues in mice. *Eur J Neurosci* 15:2016-2026.
- Leo D, di Porzio U, Racagni G, Riva MA, Fumagalli F, Perrone-Capano C (2007) Chronic cocaine administration modulates the expression of transcription factors involved in midbrain dopaminergic neuron function. *Exp Neurol* 203:472-480.

- Leshner AI (2000) The disease of addiction. *Lippincotts Prim Care Pract* 4:249-253.
- Leslie CA, Robertson MW, Jung AB, Liebermann J, Bennett JP, Jr. (1994) Effects of prenatal cocaine exposure upon postnatal development of neostriatal dopaminergic function. *Synapse* 17:210-215.
- Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S (1965) Elucidation of the Rate-Limiting Step in Norepinephrine Biosynthesis in the Perfused Guinea-Pig Heart. *J Pharmacol Exp Ther* 148:1-8.
- Li P, Shah S, Huang L, Carr AL, Gao Y, Thisse C, Thisse B, Li L (2007) Cloning and spatial and temporal expression of the zebrafish dopamine D1 receptor. *Dev Dyn* 236:1339-1346.
- Li J, Dani JA, Le W (2009) The role of transcription factor Pitx3 in dopamine neuron development and Parkinson's disease. *Curr Top Med Chem* 9:855-859.
- Li J, Dani JA, Le W (2009) The role of transcription factor Pitx3 in dopamine neuron development and Parkinson's disease. *Curr Top Med Chem* 9:855-859.
- Lidow MS, Bozian D, Song ZM (2001) Cocaine affects cerebral neocortical cytoarchitecture in primates only if administered during neocortical neurogenesis. *Brain Res Dev Brain Res* 128:45-52.
- Lin C, Spikings E, Zhang T, Rawson D (2009) Housekeeping genes for cryopreservation studies on zebrafish embryos and blastomeres. *Theriogenology* 71:1147-1155.
- Liu J, Lester BM Reconceptualizing in a dual-system model the effects of prenatal cocaine exposure on adolescent development: a short review. *Int J Dev Neurosci* 29:803-809.
- Lizasoain I, Moro MA, Lorenzo P, (2002) Cocaína: aspectos farmacológicos. *ADICCIONES* 14: (1) 57-64
- Lohr H, Ryu S, Driever W (2009) Zebrafish diencephalic A11-related dopaminergic neurons share a conserved transcriptional network with neuroendocrine cell lineages. *Development* 136:1007-1017.
- Long S, Ahmad N, Rebagliati M (2002) Zebrafish hearts and minds: nodal signaling in cardiac and neural left-right asymmetry. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67:27-36.
- Lopez Patino MA, Yu L, Yamamoto BK, Zhdanova IV (2008) Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. *Physiol Behav* 95:36-47.
- Lopez-Patino MA, Yu L, Cabral H, Zhdanova IV (2008) Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiol Behav* 93:160-171.

- Margolis EB, Coker AR, Driscoll JR, Lemaitre AI, Fields HL Reliability in the identification of midbrain dopamine neurons. *PLoS One* 5:e15222.
- Martinat C, Bacci JJ, Leete T, Kim J, Vanti WB, Newman AH, Cha JH, Gether U, Wang H, Abeliovich A (2006) Cooperative transcription activation by Nurr1 and Pitx3 induces embryonic stem cell maturation to the midbrain dopamine neuron phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2874-2879.
- Martinez D, Saccone PA, Liu F, Slifstein M, Orlowska D, Grassetti A, Cook S, Broft A, Van Heertum R, Comer SD Deficits in Dopamine D(2) Receptors and Presynaptic Dopamine in Heroin Dependence: Commonalities and Differences with Other Types of Addiction. *Biol Psychiatry*.
- Martinez D, Broft A, Foltin RW, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, Perez A, Frankle WG, Cooper T, Kleber HD, Fischman MW, Laruelle M (2004) Cocaine dependence and d2 receptor availability in the functional subdivisions of the striatum: relationship with cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* 29:1190-1202.
- Martinez D, Greene K, Broft A, Kumar D, Liu F, Narendran R, Slifstein M, Van Heertum R, Kleber HD (2009) Lower level of endogenous dopamine in patients with cocaine dependence: findings from PET imaging of D(2)/D(3) receptors following acute dopamine depletion. *Am J Psychiatry* 166:1170-1177.
- Maxwell SL, Ho HY, Kuehner E, Zhao S, Li M (2005) Pitx3 regulates tyrosine hydroxylase expression in the substantia nigra and identifies a subgroup of mesencephalic dopaminergic progenitor neurons during mouse development. *Dev Biol* 282:467-479.
- Mayes LC, Cicchetti D, Acharyya S, Zhang H (2003) Developmental trajectories of cocaine-and-other-drug-exposed and non-cocaine-exposed children. *J Dev Behav Pediatr* 24:323-335.
- McClung CA, Sidiropoulou K, Vitaterna M, Takahashi JS, White FJ, Cooper DC, Nestler EJ (2005) Regulation of dopaminergic transmission and cocaine reward by the Clock gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9377-9381.
- 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.
- Messiah SE, Miller TL, Lipshultz SE, Bandstra ES Potential latent effects of prenatal cocaine exposure on growth and the risk of cardiovascular and metabolic disease in childhood. *Prog Pediatr Cardiol* 31:59-65.
- Mishima Y, Abreu-Goodger C, Staton AA, Stahlhut C, Shou C, Cheng C, Gerstein M, Enright AJ, Giraldez AJ (2009) Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization. *Genes Dev* 23:619-632.

- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Morgan D, Grant KA, Gage HD, Mach RH, Kaplan JR, Prioleau O, Nader SH, Buchheimer N, Ehrenkauf RL, Nader MA (2002) Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration. *Nat Neurosci* 5:169-174.
- Moyer RA, Wang D, Papp AC, Smith RM, Duque L, Mash DC, Sadee W Intronic polymorphisms affecting alternative splicing of human dopamine D2 receptor are associated with cocaine abuse. *Neuropsychopharmacology* 36:753-762.
- Nader MA, Daunais JB, Moore T, Nader SH, Moore RJ, Smith HR, Friedman DP, Porrino LJ (2002) Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology* 27:35-46.
- Nader MA, Czoty PW (2005) PET imaging of dopamine D2 receptors in monkey models of cocaine abuse: genetic predisposition versus environmental modulation. *Am J Psychiatry* 162:1473-1482.
- Nader MA, Morgan D, Gage HD, Nader SH, Calhoun TL, Buchheimer N, Ehrenkauf R, Mach RH (2006) PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. *Nat Neurosci* 9:1050-1056.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S (1964) Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step in Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239:2910-2917.
- Nasevicius A, Ekker SC (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 26:216-220.
- Nei M, Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nestler EJ (2001) Neurobiology. Total recall-the memory of addiction. *Science* 292:2266-2267.
- Nestler EJ (2005) The neurobiology of cocaine addiction. *Sci Pract Perspect* 3:4-10.
- Ninkovic J, Bally-Cuif L (2006) The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods* 39:262-274.
- Nunes I, Tovmasian LT, Silva RM, Burke RE, Goff SP (2003) Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4245-4250.

- O'Hara FP, Beck E, Barr LK, Wong LL, Kessler DS, Riddle RD (2005) Zebrafish Lmx1b.1 and Lmx1b.2 are required for maintenance of the isthmus organizer. *Development* 132:3163-3173.
- Ohtani N, Goto T, Waeber C, Bhide PG (2003) Dopamine modulates cell cycle in the lateral ganglionic eminence. *J Neurosci* 23:2840-2850.
- Papanikolaou T, Amano T, Lenington J, Sink K, Farrar AM, Salamone J, Yang X, Conover JC (2009) In-vitro analysis of Pitx3 in mesodiencephalic dopaminergic neuron maturation. *Eur J Neurosci* 29:2264-2275.
- Pascual, F (2001) Aproximación histórica a la cocaína. *Adicciones* 13 (Supl. 2): 7-22
- Peng C, Aron L, Klein R, Li M, Wurst W, Prakash N, Le W Pitx3 is a critical mediator of GDNF-induced BDNF expression in nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 31:12802-12815.
- Plessinger MA, Woods JR, Jr. (1998) Cocaine in pregnancy. Recent data on maternal and fetal risks. *Obstet Gynecol Clin North Am* 25:99-118.
- Popolo M, McCarthy DM, Bhide PG (2004) Influence of dopamine on precursor cell proliferation and differentiation in the embryonic mouse telencephalon. *Dev Neurosci* 26:229-244.
- Prakash A, Das G (1993) Cocaine and the nervous system. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 31:575-581.
- Prakash N, Wurst W (2006) Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci* 63:187-206.
- Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC (1992) Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol* 11:1-20.
- Puelles L, Verney C (1998) Early neuromeric distribution of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons in human embryos. *J Comp Neurol* 394:283-308.
- Qin G, Taylor M, Ning YY, Iversen P, Kobzik L (2000) In vivo evaluation of a morpholino antisense oligomer directed against tumor necrosis factor- α . *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 10:11-16.
- Ralph RJ, Varty GB, Kelly MA, Wang YM, Caron MG, Rubinstein M, Grandy DK, Low MJ, Geyer MA (1999) The dopamine D2, but not D3 or D4, receptor subtype is essential for the disruption of prepulse inhibition produced by amphetamine in mice. *J Neurosci* 19:4627-4633.
- Ramsden DB, Parsons RB, Ho SL, Waring RH (2001) The aetiology of idiopathic Parkinson's disease. *Mol Pathol* 54:369-380.

- Reavill C, Taylor SG, Wood MD, Ashmeade T, Austin NE, Avenell KY, Boyfield I, Branch CL, Cilia J, Coldwell MC, Hadley MS, Hunter AJ, Jeffrey P, Jewitt F, Johnson CN, Jones DN, Medhurst AD, Middlemiss DN, Nash DJ, Riley GJ, Routledge C, Stemp G, Thewlis KM, Trail B, Vong AK, Hagan JJ (2000) Pharmacological actions of a novel, high-affinity, and selective human dopamine D(3) receptor antagonist, SB-277011-A. *J Pharmacol Exp Ther* 294:1154-1165.
- Rebagliati MR, Toyama R, Haffter P, Dawid IB (1998) cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9932-9937.
- Reiner A, Northcutt RG (1992) An immunohistochemical study of the telencephalon of the senegal bichir (*Polypterus senegalus*). *J Comp Neurol* 319:359-386.
- Reinoso BS, Undie AS, Levitt P (1996) Dopamine receptors mediate differential morphological effects on cerebral cortical neurons in vitro. *J Neurosci Res* 43:439-453.
- Rink E, Wullmann MF (2001) The teleostean (zebrafish) dopaminergic system ascending to the subpallium (striatum) is located in the basal diencephalon (posterior tuberculum). *Brain Res* 889:316-330.
- Rink E, Wullmann MF (2002) Development of the catecholaminergic system in the early zebrafish brain: an immunohistochemical study. *Brain Res Dev Brain Res* 137:89-100.
- Rivera TL, Belmont HM, Weissmann G (2009) Systemic lupus erythematosus in 6 male cocaine users at Bellevue hospital. *J Rheumatol* 36:2854-2855.
- Robinson DL, Howard EC, McConnell S, Gonzales RA, Wightman RM (2009) Disparity between tonic and phasic ethanol-induced dopamine increases in the nucleus accumbens of rats. *Alcohol Clin Exp Res* 33:1187-1196.
- Rohr KB, Barth KA, Varga ZM, Wilson SW (2001) The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* 29:341-351.
- Rojas-Munoz A, Rajadhyksha S, Gilmour D, van Bebber F, Antos C, Rodriguez Esteban C, Nusslein-Volhard C, Izpisua Belmonte JC (2009) ErbB2 and ErbB3 regulate amputation-induced proliferation and migration during vertebrate regeneration. *Dev Biol* 327:177-190.
- Ronnekleiv OK, Naylor BR (1995) Chronic cocaine exposure in the fetal rhesus monkey: consequences for early development of dopamine neurons. *J Neurosci* 15:7330-7343.
- Ruetsch YA, Boni T, Borgeat A (2001) From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Curr Top Med Chem* 1:175-182.

- Ryu S, Mahler J, Acampora D, Holzschuh J, Erhardt S, Omodei D, Simeone A, Driever W (2007) Orthopedia homeodomain protein is essential for diencephalic dopaminergic neuron development. *Curr Biol* 17:873-880.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.
- Salvatore MF, Hudspeth O, Arnold LE, Wilson PE, Stanford JA, MacTutus CF, Booze RM, Gerhardt GA (2004) Prenatal cocaine exposure alters potassium-evoked dopamine release dynamics in rat striatum. *Neuroscience* 123:481-490.
- Sanchez-Simon FM, Zhang XX, Loh HH, Law PY, Rodriguez RE Morphine regulates dopaminergic neuron differentiation via miR-133b. *Mol Pharmacol* 78:935-942.
- Saucedo-Cardenas O, Quintana-Hau JD, Le WD, Smidt MP, Cox JJ, De Mayo F, Burbach JP, Conneely OM (1998) Nurr1 is essential for the induction of the dopaminergic phenotype and the survival of ventral mesencephalic late dopaminergic precursor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4013-4018.
- Scalzo FM, Ali SF, Frambes NA, Spear LP (1990) Weanling rats exposed prenatally to cocaine exhibit an increase in striatal D2 dopamine binding associated with an increase in ligand affinity. *Pharmacol Biochem Behav* 37:371-373.
- 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.
- Schmidt LG, Sander T (2000) Genetics of alcohol withdrawal. *Eur Psychiatry* 15:135-139.
- Schultz W (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7:191-197.
- Schweitzer J, Lohr H, Filippi A, Driever W Dopaminergic and noradrenergic circuit development in zebrafish. *Dev Neurobiol*.
- Shimada H, Yoshimura N, Tsuji A, Kunisada T (2009) Differentiation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells: modulation of differentiation by FGF-20. *J Biosci Bioeng* 107:447-454.
- Shomron N MicroRNAs and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 11:629-632.
- Shomron N MicroRNAs and developmental robustness: a new layer is revealed. *PLoS Biol* 8:e1000397.
- Shorter D, Kosten TR Novel pharmacotherapeutic treatments for cocaine addiction. *BMC Med* 9:119.
- Sibley DR, Monsma FJ, Jr. (1992) Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13:61-69.

- Silvers JM, Wallace DR, Harrod SB, Mactutus CF, Booze RM (2006) Prenatal cocaine alters dopamine and sigma receptor binding in nucleus accumbens and striatum in dams and adolescent offspring. *Neurotoxicol Teratol* 28:173-180.
- Singer LT, Minnes S, Short E, Arendt R, Farkas K, Lewis B, Klein N, Russ S, Min MO, Kirchner HL (2004) Cognitive outcomes of preschool children with prenatal cocaine exposure. *Jama* 291:2448-2456.
- Smeets WJ, Gonzalez A (2000) Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Res Brain Res Rev* 33:308-379.
- Smidt MP, van Schaick HS, Lanctot C, Tremblay JJ, Cox JJ, van der Kleij AA, Wolterink G, Drouin J, Burbach JP (1997) A homeodomain gene Ptx3 has highly restricted brain expression in mesencephalic dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13305-13310.
- Smidt MP, Asbreuk CH, Cox JJ, Chen H, Johnson RL, Burbach JP (2000) A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nat Neurosci* 3:337-341.
- Smidt MP, Smits SM, Burbach JP (2003) Molecular mechanisms underlying midbrain dopamine neuron development and function. *Eur J Pharmacol* 480:75-88.
- Smidt MP, Smits SM, Burbach JP (2004) Homeobox gene Pitx3 and its role in the development of dopamine neurons of the substantia nigra. *Cell Tissue Res* 318:35-43.
- Smidt MP, Burbach JP (2007) How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nat Rev Neurosci* 8:21-32.
- Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R, Navia BA (2003) Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 119B:77-85.
- Smits SM, Ponnio T, Conneely OM, Burbach JP, Smidt MP (2003) Involvement of Nurr1 in specifying the neurotransmitter identity of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 18:1731-1738.
- Smits SM, Smidt MP (2006) The role of Pitx3 in survival of midbrain dopaminergic neurons. *J Neural Transm Suppl*:57-60.
- Souza BR, Tropepe V The role of dopaminergic signalling during larval zebrafish brain development: a tool for investigating the developmental basis of neuropsychiatric disorders. *Rev Neurosci* 22:107-119.

- Spence R, Jordan WC, Smith C (2006) Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Front Zool* 3:5.
- Spiehler VR, Reed D (1985) Brain concentrations of cocaine and benzoylecgonine in fatal cases. *J Forensic Sci* 30:1003-1011.
- Stanwood GD, Washington RA, Shumsky JS, Levitt P (2001) Prenatal cocaine exposure produces consistent developmental alterations in dopamine-rich regions of the cerebral cortex. *Neuroscience* 106:5-14.
- Stanwood GD, Levitt P (2003) Repeated i.v. cocaine exposure produces long-lasting behavioral sensitization in pregnant adults, but behavioral tolerance in their offspring. *Neuroscience* 122:579-583.
- Stanwood GD, Levitt P (2007) Prenatal exposure to cocaine produces unique developmental and long-term adaptive changes in dopamine D1 receptor activity and subcellular distribution. *J Neurosci* 27:152-157.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291:293-296.
- Su TP, Hayashi T (2001) Cocaine affects the dynamics of cytoskeletal proteins via sigma(1) receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22:456-458.
- Sulzer D How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission. *Neuron* 69:628-649.
- Summerton J, Weller D (1997) Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7:187-195.
- Sweetman D, Goljanek K, Rathjen T, Oustanina S, Braun T, Dalmay T, Munsterberg A (2008) Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Dev Biol* 321:491-499.
- 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* (In Press).
- Tang R, Dodd A, Lai D, McNabb WC, Love DR (2007) Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 39:384-390.
- Tian J, Andree B, Jones CM, Sampath K (2008) The pro-domain of the zebrafish Nodal-related protein Cyclops regulates its signaling activities. *Development* 135:2649-2658.

- Tilley MR, Cagniard B, Zhuang X, Han DD, Tiao N, Gu HH (2007) Cocaine reward and locomotion stimulation in mice with reduced dopamine transporter expression. *BMC Neurosci* 8:42.
- Tongiorgi E (1999) Tenascin-C expression in the trunk of wild-type, cyclops and floating head zebrafish embryos. *Brain Res Bull* 48:79-88.
- Trulson ME, Ulissey MJ (1987) Chronic cocaine administration decreases dopamine synthesis rate and increases [3H] spiroperidol binding in rat brain. *Brain Res Bull* 19:35-38.
- Trulson ME, Joe JC, Babb S, Raese JD (1987) Chronic cocaine administration depletes tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the meso-limbic dopamine system in rat brain: quantitative light microscopic studies. *Brain Res Bull* 19:39-45.
- Unterwald EM (2001) Regulation of opioid receptors by cocaine. *Ann N Y Acad Sci* 937:74-92.
- Unterwald EM, Ivkovic S, Cuntapay M, Stroppolo A, Guinea B, Ehrlich ME (2003) Prenatal exposure to cocaine decreases adenylyl cyclase activity in embryonic mouse striatum. *Brain Res Dev Brain Res* 147:67-75.
- Ursitti F, Klein J, Koren G (2001) Confirmation of cocaine use during pregnancy: a critical review. *Ther Drug Monit* 23:347-353.
- van den Munckhof P, Luk KC, Ste-Marie L, Montgomery J, Blanchet PJ, Sadikot AF, Drouin J (2003) Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development* 130:2535-2542.
- Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Schlyer D, Shiue CY, Alpert R, Dewey SL, Logan J, Bendriem B, Christman D, et al. (1990) Effects of chronic cocaine abuse on postsynaptic dopamine receptors. *Am J Psychiatry* 147:719-724.
- Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin RW, Fowler JS, Abumrad NN, Vitkun S, Logan J, Gatley SJ, Pappas N, Hitzemann R, Shea CE (1997) Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386:827-830.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2002) Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behav Pharmacol* 13:355-366.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2004) The addicted human brain viewed in the light of imaging studies: brain circuits and treatment strategies. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:3-13.
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM (2004) Dopamine in drug abuse and addiction: results from imaging studies and treatment implications. *Mol Psychiatry* 9:557-569.

- Von Hofsten J, Olsson PE (2005) Zebrafish sex determination and differentiation: involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod Biol Endocrinol* 3:63.
- Wallen A, Zetterstrom RH, Solomin L, Arvidsson M, Olson L, Perlmann T (1999) Fate of mesencephalic AHD2-expressing dopamine progenitor cells in NURR1 mutant mice. *Exp Cell Res* 253:737-746.
- Wallen A, Perlmann T (2003) Transcriptional control of dopamine neuron development. *Ann N Y Acad Sci* 991:48-60.
- Wang HY, Runyan S, Yadin E, Friedman E (1995) Prenatal exposure to cocaine selectively reduces D1 dopamine receptor-mediated activation of striatal Gs proteins. *J Pharmacol Exp Ther* 273:492-498.
- Wang W, Lufkin T (2000) The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* 227:432-449.
- Webb KJ, Norton WH, Trumbach D, Meijer AH, Ninkovic J, Topp S, Heck D, Marr C, Wurst W, Theis FJ, Spaink HP, Bally-Cuif L (2009) Zebrafish reward mutants reveal novel transcripts mediating the behavioral effects of amphetamine. *Genome Biol* 10:R81.
- Weng W, Stemple DL (2003) Nodal signaling and vertebrate germ layer formation. *Birth Defects Res C Embryo Today* 69:325-332.
- 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.
- Wise RA (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci* 5:483-494.
- Yamamoto K, Ruuskanen JO, Wullimann MF, Vernier P Differential expression of dopaminergic cell markers in the adult zebrafish forebrain. *J Comp Neurol* 519:576-598.
- Yan CH, Levesque M, Claxton S, Johnson RL, Ang SL Lmx1a and lmx1b function cooperatively to regulate proliferation, specification, and differentiation of midbrain dopaminergic progenitors. *J Neurosci* 31:12413-12425.
- Yin VP, Poss KD (2008) New regulators of vertebrate appendage regeneration. *Curr Opin Genet Dev* 18:381-386.
- Zeng X, Cai J, Chen J, Luo Y, You ZB, Fotter E, Wang Y, Harvey B, Miura T, Backman C, Chen GJ, Rao MS, Freed WJ (2004) Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22:925-940.

- Zeng Y (2009) Regulation of the mammalian nervous system by microRNAs. *Mol Pharmacol* 75:259-264.
- Zetterstrom RH, Williams R, Perlmann T, Olson L (1996) Cellular expression of the immediate early transcription factors Nurr1 and NGFI-B suggests a gene regulatory role in several brain regions including the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res Mol Brain Res* 41:111-120.
- Zetterstrom RH, Solomin L, Jansson L, Hoffer BJ, Olson L, Perlmann T (1997) Dopamine neuron agenesis in Nurr1-deficient mice. *Science* 276:248-250.
- Zhang L, Le W, Xie W, Dani JA Age-related changes in dopamine signaling in Nurr1 deficient mice as a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*.
- Zhao N, Wang HY, Dow-Edwards D (2008) Cocaine exposure during the early postnatal period diminishes medial frontal cortex Gs coupling to dopamine D1-like receptors in adult rat. *Neurosci Lett* 438:159-162.
- Zhen X, Torres C, Wang HY, Friedman E (2001) Prenatal exposure to cocaine disrupts D1A dopamine receptor function via selective inhibition of protein phosphatase 1 pathway in rabbit frontal cortex. *J Neurosci* 21:9160-9167.
- Zhou Y, Michelhaugh SK, Schmidt CJ, Liu JS, Bannon MJ, Lin Z Ventral midbrain correlation between genetic variation and expression of the dopamine transporter gene in cocaine-abusing versus non-abusing subjects. *Addict Biol*.
- Zhou Y, Spangler R, Yuferov VP, Schlussmann SD, Ho A, Kreek MJ (2004) Effects of selective D1- or D2-like dopamine receptor antagonists with acute "binge" pattern cocaine on corticotropin-releasing hormone and proopiomelanocortin mRNA levels in the hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 130:61-67.
- Zhuang X, Belluscio L, Hen R (2000) G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. *J Neurosci* 20:RC91.