

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

TRABAJO FINAL DE MÁSTER EN NEUROCIENCIAS



**Influencia de la cocaína en la transcripción de receptores
relacionados con la adicción: expresión de receptores
dopaminérgicos**

Katherine Barreto Valer

Realizado bajo la supervisión de la Pof. Raquel E. Rodríguez

2009

ÍNDICE

I. Introducción	1
a. El pez cebra	2
b. Pez cebra como modelo experimental	4
c. La cocaína como droga de abuso	6
d. Mecanismos de acción de la cocaína	7
e. Sistema dopaminérgico endógeno	9
f. Interacción entre la cocaína y el sistema dopaminérgico	11
g. Sistema dopaminérgico en el pez cebra	13
h. Aportaciones de nuestro grupo de investigación	15
II. Objetivos e Hipótesis	16
III. Metodología	
a. Animales	18
b. Exposición de los animales a clorhidrato de cocaína	21
c. PCR a tiempo real	23
IV. Resultados	
a. Análisis de expresión de receptor drd1	34
b. Análisis de expresión de receptor drd2a	35
c. Análisis de expresión de receptor drd2b	36
V. Discusión	39
VI. Conclusiones	33
VII. Bibliografía	44
VIII. Anexos	52

INTRODUCCIÓN

a. Pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pequeño pez actinopterigio, 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. 1), es originario de aguas dulces del sureste asiático (cuencas de los ríos Ganges y Brahmaputra) (Spence y cols., 2006). 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*.



Fig. 1. Patrón de bandas característico en el pez cebra adulto.

El pez cebra ha sido utilizado como modelo para llevar a cabo los estudios de mutagénesis hasta la saturación porque reúne varias ventajas (Streisinger y cols., 1981): 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). 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.

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.

b. El pez cebra como modelo experimental

El pez cebra ha sido utilizado como modelo experimental para estudiar el desarrollo embrionario de los vertebrados ya que presenta una serie de ventajas sobre otros organismos que son utilizados como modelos experimentales, siendo relativamente fácil el manejo de sus embriones y la realización de sondeos genéticos que revelan las etapas y mecanismos de la embriogénesis. Actualmente se han empezado a aplicar los sondeos genéticos para el estudio de enfermedades humanas en el pez cebra y los resultados son ciertamente alentadores: determinadas mutaciones provocadas en el pez cebra mimetizan el fenotipo descrito en varios desórdenes que afectan al ser humano (Dooley y Zon, 2002). Por ejemplo, algunas de las mutaciones observadas afectan al desarrollo normal del corazón alterando su contractilidad pero sin modificar su morfología, de manera que imita la cardiomiopatía dilatada (Xu y cols., 2002). También se ha logrado obtener fenotipos que se corresponden con los producidos por arritmias (Rottbauer y cols., 2001), enfermedades cardíacas congénitas (Horne-Badovinac y cols., 2001), enfermedades vasculares como la arteriosclerosis o isquemia (para lo que se utilizaron embriones en el estadio de 24 horas post-fertilización, Padilla y Roth, 2001), enfermedades renales como el fallo renal crónico o la enfermedad poliquística (el pez cebra presenta una ventaja adicional en este caso ya que después del desarrollo del riñón sigue manteniendo el pronefros), osteoporosis y enfermedades óseas congénitas, Parkinson, Alzheimer, sordera, diabetes y cirrosis (Shin y Fishman 2002). Además se ha estudiado el desarrollo del sistema inmune aplicando asimismo los sondeos genéticos y creando individuos transgénicos que mimetizan las leucemias que afectan tanto a linfocitos B como a linfocitos C (Trede

y cols., 2004). Asimismo, en los últimos años el pez cebra está siendo utilizado como organismo modelo para el descubrimiento y validación de nuevas dianas farmacológicas, así como en la búsqueda de nuevas drogas y estudios toxicológicos (Goldsmith, 2004). Una muestra de las posibilidades reales que ofrece el pez cebra, es la creación de la compañía DanioLabs (<http://www.daniolabs.com/index.htm1>) en Cambridge, Reino Unido, cuyo interés radica en descubrir nuevos agentes terapéuticos para tratar enfermedades oftálmicas y neurodegenerativas, así como iniciar la búsqueda en otras áreas de interés científico utilizando el pez cebra como modelo experimental. Por las ventajas que presenta el pez cebra, la industria farmacéutica está empezando a explotar las semejanzas en regiones de unión a determinados fármacos y drogas entre las proteínas del ser humano y el pez cebra para el desarrollo de nuevas y mejores estrategias terapéuticas (Guo, 2004).

Debido a su capacidad para incorporar moléculas disueltas en agua, el pez cebra puede emplearse para estudiar las interacciones entre el genoma y el medio ambiente; este screening químico podría emplearse como ensayo preclínico frente a tóxicos y, puesto que los embriones modifican 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). Varios autores ya han propuesto al pez cebra como un modelo para el análisis biológico de los efectos de diversas drogas como el alcohol (Gerlai et al, 2000; Dlugos y Rabin, 2003) y la cocaína (Darland y Dowling, 2001), obteniendo resultados parecidos a los encontrados en ratones (Anichtchik y cols., 2004). Estos autores postulan que el pez cebra podría emplearse en el análisis de fármacos que actúan sobre el sistema

dopaminérgico, especialmente en la identificación de nuevos genes implicados en el proceso de neurotoxicidad. Además, el pez cebra es un organismo en el que se pueden realizar análisis químicos de moléculas de bajo peso molecular, evitando el efecto materno que puede alterar los resultados si el mismo análisis se realiza sobre animales con desarrollo intrauterino (Pichler y cols., 2003). Por ello, este modelo es adecuado para realizar ensayos preclínicos frente a agentes tóxicos, y puesto que los embriones modifican su comportamiento tras la ingesta de alcohol o cocaína, el pez cebra podría ser utilizado como modelo para el estudio del fenómeno de drogodependencia.

c. La cocaína como droga de abuso

La cocaína es un alcaloide aislado a partir de las hojas de la planta *Erythroxylon coca*, originaria de Bolivia, Perú, Colombia y Ecuador, que se cultiva hoy en estos y otros países del Oeste Sudamericano. La cocaína no es una droga nueva, pues los indios sudamericanos masticaban las hojas de la coca por cientos de años por sus efectos psicoactivos y su uso es propio de su cultura. Pequeñas cantidades de cocaína se encuentran en la saliva (al masticarse las hojas de coca por los oriundos) que es absorbida en la circulación, pero es poco lo que se sabe acerca del abuso o la adicción de la hoja de coca en estas culturas. Un tiempo en Europa la cocaína fue recomendado para viajeros, excursionistas y soldados por sus efectos de supresión del apetito y como estimulante de acción media. En los Estados Unidos la cocaína fue usada en bebidas ligeras (Coca-Cola) y vinos por muchos años, pero en 1914 esto fue prohibido.

El uso terapéutico legal en nuestros días ha quedado restringido como anestésico

local para la cirugía de ojos (Brick y Erickson, 1998).

La cocaína actual 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*. 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). La forma ácida o 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, fumarse mezclado con tabaco, disolverse en agua para inyección intravenosa, ingerirse por vía oral, o aplicarse directamente en mucosas donde ejerce un efecto anestésico característico.

d. Mecanismos de acción de la cocaína

La cocaína actúa fundamentalmente a nivel del SNC inhibiendo el transporte de neurotransmisores (NTs) como dopamina, serotonina y noradrenalina. La inhibición de la recaptación de los mencionados NTs genera un aumento de Noradrenalina, serotonina y dopamina en el espacio sináptico, produciéndose por lo tanto una sobre activación de sus receptores: adrenérgicos, serotoninérgicos y dopaminérgicos respectivamente (Fig 2).

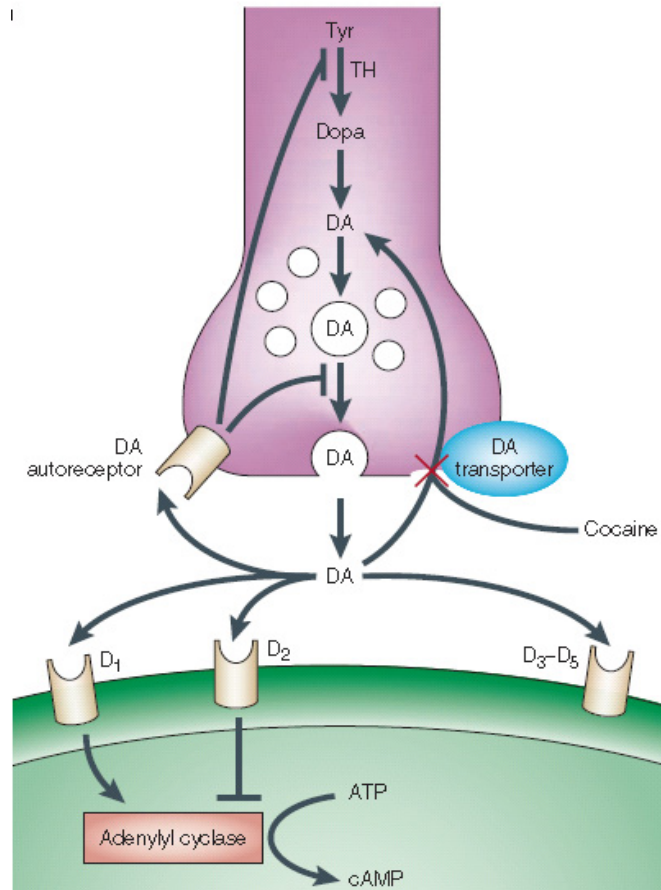


Fig. 2. Aumento del NT dopamina en el espacio sináptico por inhibición del transportador de dopamina por cocaína en la neurona presináptica. Tomado de Kreek y cols., 2002.

La activación continuada de estas poblaciones receptoriales origina los efectos estimuladores de la cocaína y contribuyen a la aparición de la depresión nerviosa característica cuando cesa el consumo del mencionado alcaloide. El exceso de noradrenalina en el organismo acarrea graves consecuencias, como la constricción vascular, responsable de las taquicardias y los infartos, o la constricción bronquial, que genera fallos respiratorios, efectos asociados al consumo prolongado y desmesurado de cocaína.

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, junto a la lidocaína y a la novocaína. El consumo habitual de cocaína incrementa el riesgo de padecer enfermedades autoinmunes como el lupus o la glomerulonefritis.

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 de la comunidad científica, aun no se conoce un antídoto eficaz para tratar la intoxicación por cocaína ni la adicción que su consumo produce.

e. Sistema dopaminérgico endógeno

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendocrina.

Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de 5 tipos de receptores dopaminérgicos, todos ellos acoplados a proteínas G y divididos en dos familias farmacológicas denominadas D1 y D2. Los receptores de la familia D1 (subtipos D1 y D5) están acoplados a proteínas Gs y estimulan la formación de AMPc (Adenosín monofosfato cíclico) como principal mecanismo de transducción de señales.

Los subtipos pertenecientes a la familia D2 (D2, D3 y D4) inhiben la formación de AMPc, activan canales de K^+ y reducen la entrada de iones de Ca^{2+} a través de

canales dependientes de voltaje, efectos mediados también por proteínas G (Gi y Go) (Fig. 3). 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.

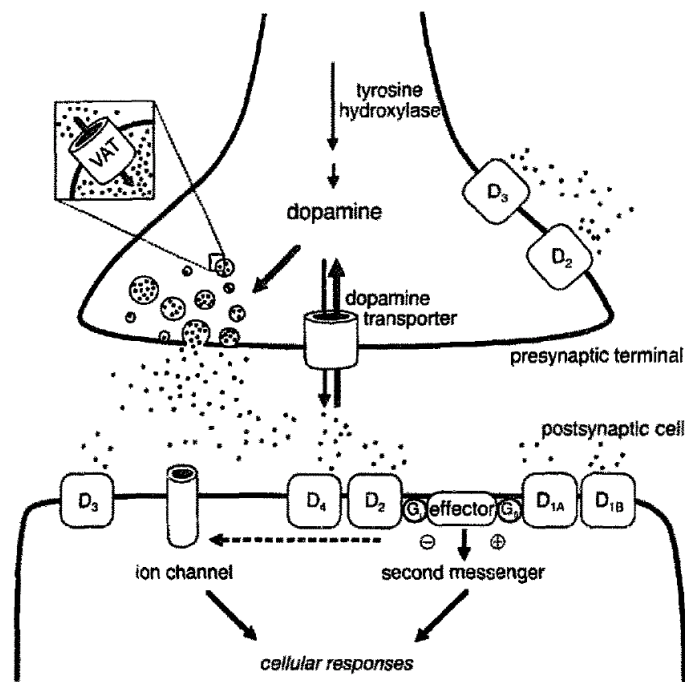


Fig. 3. Subtipos farmacológicos de los receptores de dopamina y su localización en la neuronas pre y postsinápticas. Tomado de Giros y Caron, 1993.

El estudio de los sistemas y receptores dopaminérgicos del SNC ha generado gran interés, debido a que diversas alteraciones en la transmisión dopaminérgica han sido relacionadas, directa o indirectamente, con trastornos severos como la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia, así como con la adicción a drogas (anfetaminas y cocaína).

Síntesis de la dopamina.

La síntesis del neurotransmisor tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables, la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa. Los trabajos de Nagatsu y cols. y de Levitt y cols. demostraron que la hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC y que en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina. 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 (E.C.1.14.16.2) que utiliza L-tirosina y oxígeno como sustratos y tetrahidrobiopterina (BH₄) como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido para formar L-DOPA .

f. Evidencias de la interacción entre la cocaína y la dopamina

Investigaciones llevadas a cabo durante los últimos años sugieren la posible implicación del sistema dopaminérgico endógeno en la aparición de adicción a la cocaína, aunque aún no hay resultados concluyentes en esta materia. La cocaína, a través de la inhibición del transporte de la dopamina y la continua activación de los receptores dopaminérgicos y puede inducir la activación de los receptores opioides delta, y como consecuencia, aumenta el estrés durante la abstinencia a la cocaína (Ambrose-Lanci y cols., 2008). Este estudio apunta a la posibilidad de utilizar agonistas del receptor opioide delta para disminuir los efectos del síndrome de abstinencia provocado por la cocaína, y que podría ser extrapolado a otras

drogas. Por otro lado, el sistema dopaminérgico tendría una interrelación con los receptores opioides kapa, puesto que una exagerada activación de receptores dopaminérgicos en el núcleo acumbens induce un incremento de la síntesis de dinorfina, que a su vez, actuaría como un NT inhibitorio de acción retrograda en las terminales nerviosas que liberan dopamina en el núcleo acumbens (Fig. 4).

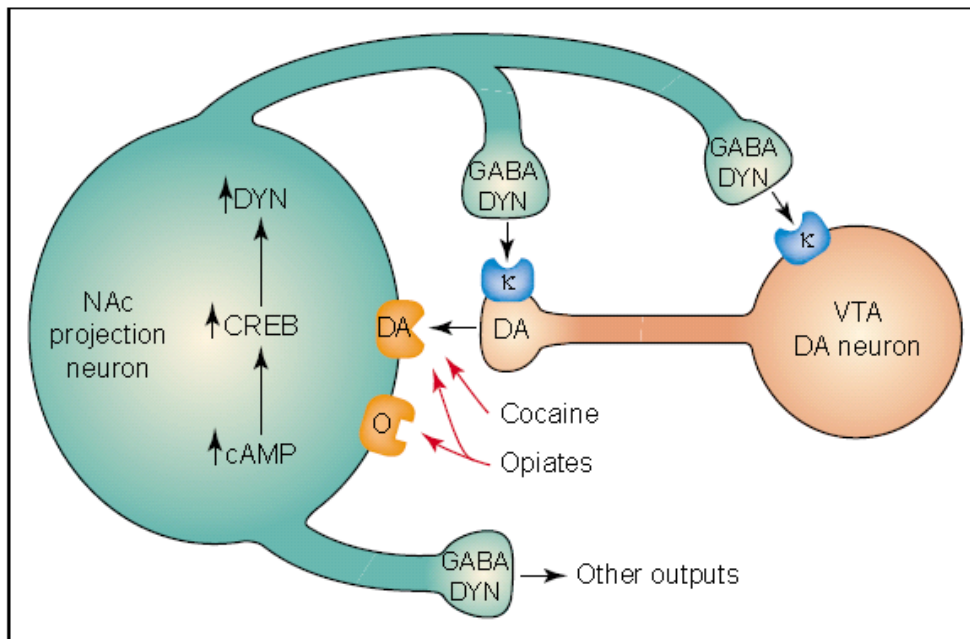


Fig. 4. Centros nerviosos que median el fenómeno de adicción y recompensa. Tomado de Wise, 2004.

Un estudio más amplio y profundo sobre la alteración en los niveles de transcripción de los receptores dopaminérgicos en la regulación de la adicción a la cocaína puede ayudar a entender el complejo mecanismo de la cocaína.

g. El sistema dopaminérgico en el pez cebra

Empleando la secuencia de los receptores de dopamina en humanos (Li y cols., 2007; Boehmler y cols., 2004; Boehmler y cols., 2007) clonaron los receptores de dopamina en el pez cebra, que se denominan como: *drd1*; *drd2a*, *drd2b*, *drd2l* o *drd2c*; *drd3*; *drd4a*, *drd4b*, *drd4rs* o *drd4c* (Tabla 1).

Receptores dopaminérgicos en el pez cebra	
Humano	Pez cebra
D1	<i>drd1</i>
D2	<i>drd2a</i> <i>drd2b</i> <i>drd2l</i>
D3	<i>drd3</i>
D4	<i>drd4a</i> <i>drd4b</i> <i>drd4rs</i>
D5	

Tabla 1. Correspondencia de los receptores de dopamina del humano con el del pez cebra

En general, la identidad de las proteínas del pez cebra con las del humano es menor del 70%, pero la conservación de los dominios funcionales, así como las regiones de unión a los substratos o ligandos es muy alto en el pez cebra, cercanos al 100% de identidad con las 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 de dopamina del pez cebra, estos presentan hasta una identidad de ~ 70% (receptor

drd1) con el receptor D1 de humano, siendo menores las identidades del resto de receptores dopaminérgicos del pez cebra, alrededor del 47 a 50 % (Tabla 2).

<i>Homología de receptores dopaminérgicos en diferentes especies</i>								
<i>Pez cebra</i>	<i>D1</i>	<i>D2a</i>	<i>D2b</i>	<i>D2l</i>	<i>D3</i>	<i>D4a</i>	<i>D4b</i>	<i>D4rs</i>
<i>Humano</i>	71	52	69	56	47	51	53	48
<i>Rata</i>	69	52	69	56	55	52	52	50
<i>Ratón</i>	69	52	69	55	54	53	53	51
<i>Chimpancé</i>		51	69	56	47	43	44	46
<i>Fugu</i>	84	52	71	57	77	68	74	50

Tabla 2. Identidad en porcentaje de los receptores de dopamina del pez cebra con diferentes especies.

h. Aportaciones de nuestro grupo de investigación al tema objeto de estudio

Hace doce años, el grupo que dirige la Dra. Raquel E. Rodríguez fue pionero en la clonación y caracterización del sistema opioide endógeno, así como de los receptores cannabinoides, y nuestros trabajos han demostrado la idoneidad del pez cebra como modelo para el estudio del entramado bioquímico tanto del dolor como de la tolerancia y dependencia a drogas, que pueden dar lugar a la adicción. A modo de resumen podemos decir que:

En los últimos años se han clonado en nuestro laboratorio cinco receptores de pez cebra semejantes a los receptores opioides de mamíferos, a los que se han denominado: zfDOR1 (ZFOR1) (ZebraFish Opioid Receptor 1), que presenta homología con el receptor opioide delta de mamíferos (Barrallo y cols., 1998a y 1998b; Rodríguez y cols., 2000); zfMOR (ZFOR2), que presenta homología con el receptor opioide mu (Barrallo y cols., 2000); zfKOR (ZFOR3), que presenta homología con el receptor opioide kappa (Alvarez, y cols., 2006); zfDOR2 (ZFOR4), que parece ser un duplicado de zfDOR1 y, por ello, presenta mayor homología con el receptor opioide delta (Pinal-Seoane y cols., 2006) y zfORL, que presenta homología con el receptor ORL (Rivas-Boyero, Tesis doctoral, 2003). También se han identificado los precursores de los ligandos endógenos opioides correspondientes a dichos receptores, con el objeto de profundizar en la funcionalidad del sistema opioide en este organismo modelo (González-Núñez y cols., 2003 a, b y c). En los últimos años se ha estudiado la expresión espacial y temporal de los receptores opioides durante los diferentes estadios embrionarios del pez cebra (Macho Sánchez-Simón y Rodríguez, 2008) y la realización del

análisis funcional del receptor opioide mu en pez cebra (Marrón- Fernández y Rodríguez, 2009).

Para emplear este teleósteo como un organismo modelo para el estudio del dolor y de la drogodependencia, es necesario, aparte del estudio del sistema opioide, cuyo abordaje está siendo ampliamente acometido por nuestro grupo de investigación, sumergirse en otros sistemas relacionados, como es el sistema dopaminérgico para comprender mejor la adicción y la interrelación entre el sistema opioide y dopaminérgico en la drogodependencia.

OBJETIVOS

II. Objetivos generales y específicos. Hipótesis

En la actualidad, la cocaína es una de las drogas ilícitas más consumidas y que más problemas ocasiona como consecuencia de la adicción, fundamentalmente psicológica, que produce. La cocaína puede influir en la transcripción de los genes que codifican los receptores y los precursores opioides, dopaminérgicos, serotoninérgicos, etc. afectando así a los procesos de plasticidad neuronal. Debido a que el consumo de las sustancias adictivas como la cocaína es de forma crónica es evidente que la cocaína puede inducir cambios en la expresión de receptores dopaminérgicos y otros sistemas en el sistema nervioso central. Por ello se hace necesario un mayor conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares que origina la cocaína.

Por otro lado, parece claro que mediante la utilización del pez cebra como modelo experimental se está obteniendo valiosa información sobre la biología molecular de numerosas enfermedades humanas (Dooley y Zon, 2000; Fishman, 2001) entre ellas la adicción a la cocaína (Darland y Dowling, 2001) de manera que este proyecto puede originar resultados novedosos que con otro modelo experimental no se obtendrían.

Teniendo en cuenta la conexión entre la adicción a la cocaína y la activación del sistema dopaminérgico endógeno, la viabilidad del pez cebra como modelo de estudio de adicción y aprovechando la clonación de los receptores dopaminérgicos en el pez cebra, nos planteamos como hipótesis de trabajo que la cocaína altera la expresión de receptores implicados en la regulación de la adicción que produce su consumo, con el objetivo de aportar información sobre los mecanismos endógenos que describen los efectos de la

cocaína en el sistema Nervioso Central, lo que abrirá una puerta de control a la adicción que provoca esta droga.

Para corroborar esta hipótesis, nos planteamos el siguiente objetivo:

1. Analizar la expresión de receptores dopaminérgicos en embriones de pez cebra al ser expuestos a clorhidrato de cocaína.

MATERIAL Y MÉTODOS

III. Materiales y métodos

a. Animales

Los peces cebra que se utilizaron en este estudio pertenecen a la cepa AB y han sido criados en nuestro laboratorio. Los animales se trataron de acuerdo con las directrices aprobadas en la *European Communities Council Directiva* el 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC), así como según lo suscrito en la Declaración de Helsinki, y de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio, adoptada y promulgada por U.S. National Institutes of Health y el Comité Ético Español.

El mantenimiento, cuidado y cría de los peces cebra se realiza siguiendo la metodología general descrita en "*The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish Danio rerio*" (by Monte Westerfield, Instituto of Neuroscience, University of Oregon). Los peces cebra se mantienen en un sistema de peceras diseñado por *ZF Biolabs* (Madrid) que utiliza un filtro biológico en lugar del tradicional filtro químico (carbón activo), de manera que la eliminación de nitratos es más eficaz. Asimismo, otras variables a controlar en el mantenimiento de los peces son unas condiciones de temperatura de 26 °C y un pH de 7. Los peces se alimentan tres veces al día: una con alimento seco y dos con alimento vivo (*Anemia nauplit*), para así mantener los animales en un buen estado nutricional y de salud. De esta forma, se obtienen puestas de cientos de huevos por pareja.

a. Cría de embriones de peces cebra.

Se ha establecido un sistema de cría en parideras con una hembra y un macho en el que la fecundación de los huevos es óptima, ya que la variable

limitante de este estudio es el número de embriones que se pueden obtener por semana. El macho y la hembra se encuentran separados mediante un separador colocado en la mitad de la paridera, que se elimina en el momento en el que la fecundación de los huevos ha de tener lugar. Teniendo en cuenta que la cría natural está inducida por la luz, los cruces se realizan por la mañana. Los huevos se recogen en un tamiz y se depositan posteriormente en una placa Petri con tampón E3 con azul de metileno, en una densidad de 50 embriones por placa. Los embriones se mantienen en una incubadora a 28.5 °C (temperatura establecida para su correcto desarrollo) hasta el momento de sacrificarlos para proceder a realizar los estudios pertinentes.

b. Exposición de animales a clorhidrato de cocaína

Los embriones de pez cebra serán expuestos a una solución 1.5 µM de clorhidrato de cocaína desde las 5hpf hasta las 8hpf, 16hpf, 24hpf, 48hpf, 72hpf (*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.

Se ha elegido el estadio de 5hpf, que se corresponde con la transición midblástula, como punto de inicio del tratamiento farmacológico, ya que a partir de ese momento ha finalizado la fase crítica del desarrollo embrionario. De esta forma se evitan malformaciones y mutaciones, que suelen ser frecuentes durante el inicio del desarrollo cuando el embrión es expuesto a cualquier sustancia exógena.

Para realizar las PCRs a tiempo real se emplearon embriones de 5 edades

diferentes comprendidos entre 8 hpf y (el estadio de eclosión) 72 hpf. En los estadios tempranos se recolectaron aproximadamente 300 embriones, de los cuales 150 fueron del grupo control y 150 restantes peces a los cuales se les expuso clorhidrato de cocaína. En los siguientes estadios la cantidad de embriones fue disminuyendo gradualmente hasta llegar al estadio de 72 hpf en el cuál se emplearon 140 embriones divididos entre el grupo control y expuestos a cocaína.

c. PCR a Tiempo real (qPCR)

Para estudiar la expresión temporal de los receptores dopaminérgicos 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, la cuantificación absoluta como número de copias del transcrito del gen en estudio.

Previo a la PCR a tiempo real se llevó a cabo varias etapas previas que a modo de resumen se enumeran y describen.

1. Búsqueda en las bases de datos actualizadas: MedLine (National Library of Medicine, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>), ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) y ZFIN (The Zebrafish Model Organism Database, <http://zfin.org>) etc, empleando herramientas bioinformáticas de internet así como paquetes bioinformáticos que permiten la búsqueda, el análisis y la comparación de secuencias: BLAST en sus diversas

modalidades, SIT (Sequence Interpretation Tools, <http://www.genome.jp/SIT/>), SMS (Sequence Manipulation Suite, <http://www.bioinformatics.org/sms2/>), EBI Tools (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/>), entre otras. De este modo, se obtuvieron las secuencias de partida para poder continuar con el estudio de los receptores de dopamina.

2. Diseño de oligonucleótidos, empleando otra serie de herramientas bioinformáticas tales como Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) u Oligo Faktory (<http://ueg.uib.ac.be/oiigofactory/>) y las páginas web del MedLine (National Library of Medicine, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi), EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>), ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) y ZFIN (The Zebrafish Model Organism Database, <http://zfin.org>). Los oligonucleotidos diseñados previamente son suministrados, por la empresa Isogen, de forma liofilizada.

3. La extracción de RNA total de embriones de pez cebra. Se realiza siguiendo el protocolo del *RNeasy[®] Mini Kit* de *QiaGen*. Esta técnica que emplea columnas de separación permite obtener RNA de gran pureza de muestras muy pequeñas. Los embriones en los distintos estadios, controles y expuestos a cocaína, se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80⁰ C para evitar la degradación del RNA. Se extrajo RNA de 300 embriones en los estadios de 8 hpf disminuyendo gradualmente hasta 140 en el estadio de 72 hpf (anteriormente descrito en el punto de exposición de peces a clorhidrato de cocaína).

El homogeneizado se realizó mecánicamente utilizando pistilos de plástico

que se adaptan a tubos eppendorf de 2ml y homogenizado con jeringas de tuberculina, siempre manteniendo la muestra en hielo para evitar degradación del RNA. Una vez homogeneizada la muestra se dejó incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir una completa disociación de los complejos nucleoprotéicos. Se añaden 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol invirtiendo los tubos para mezclar ambos líquidos durante 15 segundos (mezcla por inmersión). Se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugaron por 15 minutos a 12000xg y a 4°C. Tras la centrifugación la solución se separa en tres fases: en la inferior o fase orgánica, de color rosado, permanecen el DNA genómico y las proteínas; la interfase, en la que quedan componentes lipídicos y la fase superior acuosa en la que se encuentra exclusivamente el RNA.

La fase acuosa se transfirió a otro tubo para precipitar el RNA, proceso que se realiza utilizando isopropanol (0.5ml por ml inicial de Trizol). Se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 12000xg durante 10 minutos a 4°C. El RNA precipitado forma una pellet de consistencia tipo gel transparente, se lavó con etanol al 75% (1ml de etanol por ml de Trizol) y se centrifugó a 7500xg durante 5 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante y se dejó secar para que el pellet no contenga restos de etanol. Por último se resuspendió en agua libre de RNAasas y se almacena a -20 °C.

4. Las reacciones de síntesis de cDNA se llevan a cabo empleando el SuperScript® 111 FirstStrand Synthesis System de Invitrogen o ImProm-II™ Reverse Transcription System de Promega, siguiendo las especificaciones del fabricante y empleando un termociclador.

5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa se realiza utilizando el sistema *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* de *Promega*. El programa de amplificación se estableció específicamente para cada caso, teniendo en cuenta el tamaño del fragmento y la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador ABI 9700 de Perkin Elmer. Una vez obtenido el mRNA presente en el RNA total extraído se sintetizó cDNA sobre el que se amplificó posteriormente un fragmento de los genes que codifican para los receptores dopaminérgicos. La síntesis de cDNA tuvo una serie de características: todo el material y reactivos debieron estar libres de RNasas, para lo que se añadió a la reacción, aunque no es necesario, rNasin®, un inhibidor de RNasas; el buffer de la reacción no lleva MgCl₂, necesario para la actividad de la enzima. El stock de MgCl₂ tuvo una concentración de 25mM y su concentración final en la reacción fue optimizada a 5mM; la transcriptasa inversa está diseñada para que su efectividad sea mayor cuando se añade 1 µl en 20 µl de reacción; los nucleótidos deben estar a una concentración final de 0.5mM.

En primer lugar se incubó el RNA (la cantidad es elegida por el investigador, teniendo en cuenta su concentración) junto con el oligonucleótido dT (es un oligonucleótido poli-T que reconoce y anilla en la cola poli-A que tienen todos los mRNAs) durante 5 minutos a 70⁰ C. El volumen de RNA y oligonucleótido dT debe alcanzar como máximo 5 µl. Luego se añade el resto de reactivos (15µl), manteniendo los RNAs en hielo para evitar su degradación, y se lleva a cabo el siguiente programa en el termociclador: 5 minutos a 25¹ C, una hora a 42⁰ C y 15

minutos a 72° C.

6. Electroforesis en geles de agarosa. Los productos de PCR son sometidos a electroforesis en geles horizontales de agarosa, cuyos porcentajes oscilan entre 1-2 % según el tamaño del fragmento esperado en cada caso. Como tampón de electroforesis se emplea TBE. Junto con los productos de PCR se separa en paralelo un marcador de peso molecular, que permite discriminar el tamaño de los fragmentos. Para monitorizar la migración del DNA en el gel se utiliza un tampón de carga y las electroforesis se llevan a cabo bajo una diferencia de potencial constante de 80 Voltios durante 1 h aproximadamente. Los geles se tiñen con bromuro de etidio para visualizar los fragmentos de DNA y una vez terminada la electroforesis, el gel se fotografió con una cámara digital.

7. Purificación de los fragmentos amplificados por PCR. Los fragmentos de DNA amplificados por PCR se visualizan como bandas en un gel de agarosa y se purifican con el *QIAquick Gel Extraction Kit* de *QiaGen*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de la banda extraída se determinaron posteriormente.

Una vez realizado los paso anteriores, se procedió a realizar la amplificación de los receptores a tiempo real, para ello es necesario en primer lugar obtener el producto purificado de PCR que se desea amplificar sobre el cDNA de cada estadio embrionario estudiado, es decir los fragmentos de cada receptor de dopamina (*drd1*, *drd2a* y *drd2b*) y del *EF1 α* (se utiliza como control positivo en su calidad de gen constitutivo y que por tanto se expresa igual en todas las células). En nuestro caso se decidió utilizar *EF1 α* en contraste de β -

actina, pues se sabe que la cocaína puede alterar el citoesqueleto de las células y de que de alguna manera la cocaína podría alterar la expresión de β -actina. Además, es necesario luego poner a punto una recta patrón (standard curve) para cada uno de los genes de estudio descritos anteriormente. Los cebadores que fueron diseñados para cada receptor de dopamina (forward y reward y sus respectivos amplicones) se muestran en la tabla 3.

Receptores	Forward	Reward	Amplicon
<i>drd1</i>	<i>ACGCTGTCCATCCTTATCTC</i>	<i>TATGTCCGATTAAGGCTGGAG</i>	<i>137</i>
<i>drd2a</i>	<i>CCTTCTACGTTCCCTTCATCATA</i>	<i>ATCGGGATGGGTGCATTTTC</i>	<i>157</i>
<i>drd2b</i>	<i>AAATAACACAGCTACACGGGAT</i>	<i>GAACCACGTAAATCTGCACG</i>	<i>134</i>
<i>drd3</i>	<i>AAATAACACAGCTACACGGGAT</i>	<i>CCAAACAGTAGAGGGCAGG</i>	<i>137</i>
<i>drd4a</i>	<i>GTTTGTGTATGCGGAGTTTCA</i>	<i>TGATGGCGCAGAGGTTAAATA</i>	<i>119</i>
<i>drd4b</i>	<i>CCCTCAAGACGACGACAA</i>	<i>AACACCCCCTTGGAATC</i>	<i>110</i>

**Forward y reward tomados de la terminología anglosajona y amplicon referido a número de pares de bases.*

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para los 4 tipos de receptores de dopamina en el pez cebra y sus respectivos amplicones.

Para poner a punto la recta patrón se realizaron PCRs básicas con el termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystem para someterse el producto final de la reacción a electroforésis en un gel con 2% de agarosa BIORAD y 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio (Fig. 5), un agente

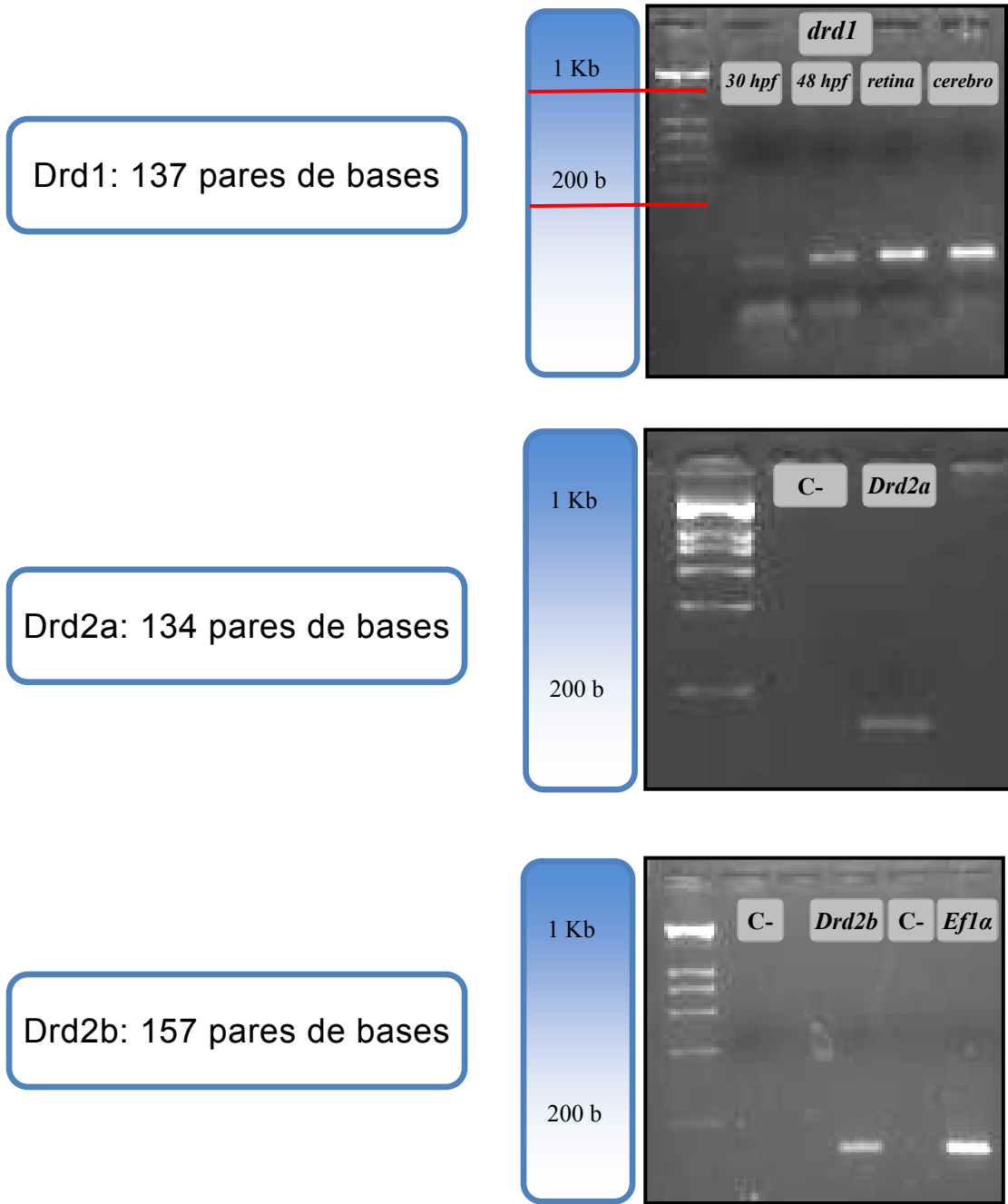


Fig.5 Electroforésis de la amplificación de los receptores *dr1*, *drd2a*, *drd2b* y *EF1a* con los oligonucleótidos a usar en la qPCR. El control negativo se realizó con todos los casos.

intercalante que permite visualizar el producto de reacción, y recortamos dicho producto, que es purificado con el kit Gel Extraction de QUIAGEN. Luego se midió la concentración de de cada producto de PCR correspondiente a los receptores *dr1*, *drd2a*, *drd2b* y *Ef1α* (que utilizamos como control positivo). Hacemos 5 diluciones de 25 ng/ml, 2.5 ng/ml, 0.25 ng/ml, 0.025 ng/ml y

0.0025ng/ml y 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, considerando la pendiente perfecta de -3.3. Este número representa los ciclos de amplificación de diferencia en cruzar el umbral de fluorescencia propuesto por el programa automáticamente que se supone debe haber entre muestras cuyas concentraciones varían entre $1.0e+1$. Una vez puesta a punto la recta patrón para cada receptor, se amplifica dicho receptor sobre 25 ng de cDNA de cada estadio embrionario de pez cebra sobre los que se realizó el estudio. Hemos utilizado para realizar las PCR a tiempo real el SYBR-Green, un agente intercalante que emite fluorescencia cuando se une a DNA de doble cadena. El SYBR-Green Power Master Mix® de Applied Biosystems contiene la DNA polimerasa AmpliTaq Gold, nucleótidos, Buffer, $MgCl_2$ y agua, todo en una concentración 2X, de manera que a cada reacción se añaden 10 μ l de SYBR-Green Power Master Mix®, 2 μ l de cDNA de concentración de 50 ng/ μ l, 1 μ l de oligonucleótido forward, 1 μ l de oligonucleótido reverse y 6 μ l 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. Hemos realizado las qPCR por triplicado en cada experimento incluyendo siempre las diluciones para hacer la recta patrón a partir del cual el programa va a calcular la concentración o el número de copias de producto amplificado sobre cDNA.

Análisis de expresión de receptores dopaminérgicos

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 cuál 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 3.3ciclos, 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:

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

Al final de la operación se obtiene la concentración del amplicón purificado de cada estadio embrionario estudiado sobre los cuales se amplificaron cada uno de los receptores.

RESULTADOS

IV. Resultados

La experiencia de nuestro grupo de investigación, que dirige la Dra. Raquel E. Rodríguez, que fue pionero en la clonación y caracterización del sistema opioide endógeno y de los receptores cannabinoides en el pez cebra, ha demostrado que este teleósteo es un organismo de gran utilidad para el estudio del dolor y de la drogodependencia. El sistema opioide endógeno en el pez cebra se está abordando con gran intensidad por nuestro grupo tanto en estudios de dolor y drogodependencia.

Con el fin de mejorar el entendimiento de la drogodependencia y la adicción nuestro grupo emprendió el estudio de un sistema endógeno que está estrechamente relacionado con la adicción, el sistema dopaminérgico, para ello nos propusimos realizar el estudio de la relación que existe entre la administración crónica de cocaína y la expresión de los receptores dopaminérgicos en diferentes estadios embrionarios de desarrollo.

Análisis de la expresión del receptor Drd1

La expresión del receptor dopaminérgico drd1 muestra sus mayores picos en los estadios de 16 y 48 hpf. Tras la exposición de 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína se observa una disminución de la expresión de los receptores drd1 en los estadios estudiados de 8 y 16hpf. A las 24 y 72 hpf se evidencia un aumento de expresión del receptor drd1, siendo estadísticamente significativo este aumento sólo en el estadio de 72hpf. La expresión del receptor drd1 disminuye durante el estadio de 48 hpf de aproximadamente 400 a 270 copias de DNA (Fig. 6).

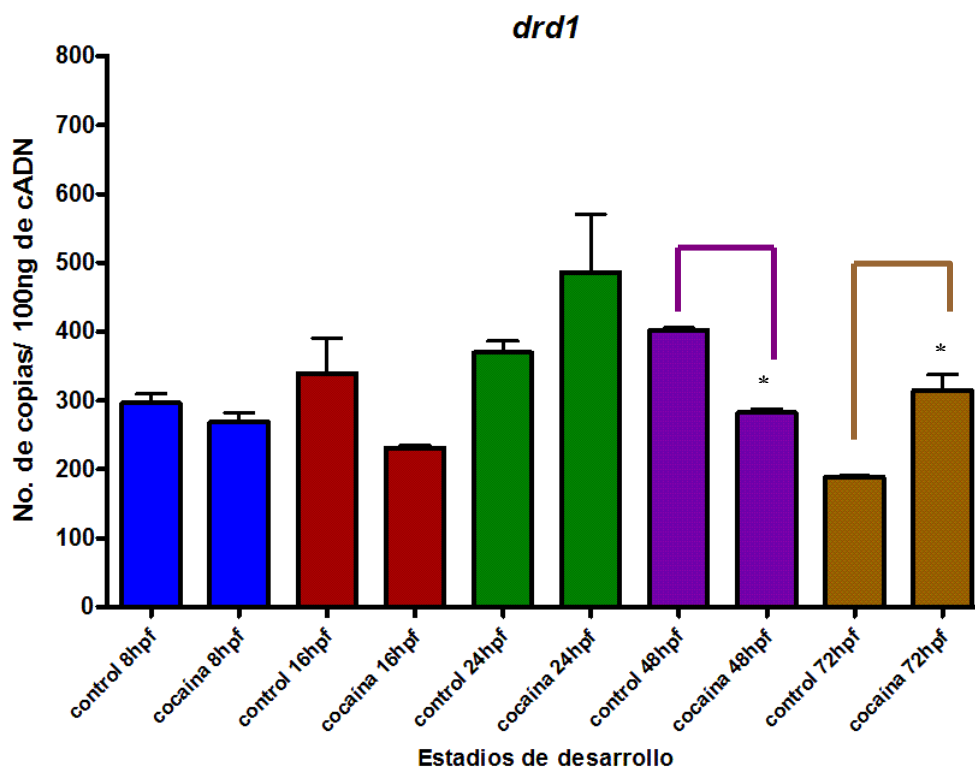


Fig. 6. Representación gráfica de la cuantificación absoluta del receptor drd1 del pez cebra en desarrollo expuestos a 1.5 µM de clorhidrato de cocaína y el grupo control. Cada barra representa el número de copias de DNA del receptor drd1 ± EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos; * $P \leq 0.05$ (Prueba T-Student para muestras no pareadas con la corrección de Welch).

N° de copias	Estadios embrionarios del pez cebra				
	8 hpf	16 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf
Embriones no expuestos a cocaína	297	339	369	402	189
Embriones expuestos a cocaína	269	231	486	282	314

Tabla 4. Resultados de la cuantificación absoluta del número de transcritos de drd1 amplificados en 100ng de cDNA de cada estadio embrionario de pez cebra (expuestos y no expuestos a 1.5µM de clorhidrato de cocaína).

Análisis de la expresión del receptor Drd2a

Los receptores drd2a mostraron aumento de expresión durante los estadios de 24 a 72 hpf tras la exposición crónica de 1.5 µM de clorhidrato de cocaína. El aumento de expresión observado, es estadísticamente significativo, en los estadios de estudio mencionado. El aumento de expresión del receptor drd2a que se observa a las 24 hpf es el que mayor número de copias de cDNA presenta con respecto a los demás receptores en los diferentes estadios de desarrollo del pez cebra (Fig. 7).

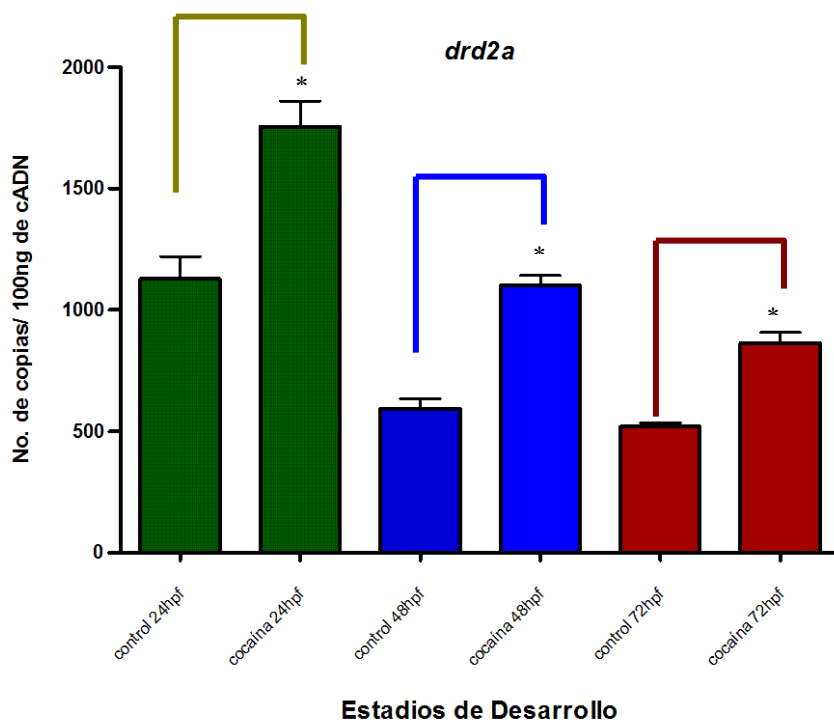


Fig. 7. Representación gráfica de la cuantificación absoluta del receptor *drd2a* del pez cebra en desarrollo expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína y el grupo control. Cada barra representa el número de copias de DNA del receptor *drd2a* \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos; * $P \leq 0.05$ (Prueba T-Student para muestras no pareadas con la corrección de Welch).

N° de copias	Estadios embrionarios del pez cebra		
	24 hpf	48 hpf	72 hpf
Embriones no expuestos a cocaína	1129	594	519
Embriones expuestos a cocaína	1755	1102	863

Tabla 5. Cuantificación absoluta del número de transcritos de *drd2a* amplificados en 100ng de cDNA de cada estadio embrionario de pez cebra (expuestos y no expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína).

Análisis de la expresión del receptor Drd2b

La expresión de los receptores dopaminérgicos *drd2b* muestra una gran expresión en estadios tempranos y que posteriormente a medida que va desarrollándose el embrión se observa disminución a las 72 hpf. La expresión del *drd2b* tras la exposición de cocaína aumenta en todos los estadios a excepción de las 8 hpf, en el que se mantiene casi inalterado. En todos los demás estadios se encontró un aumento de expresión, siendo significativo a las 24, 48 y 72 hpf (Fig. 7).

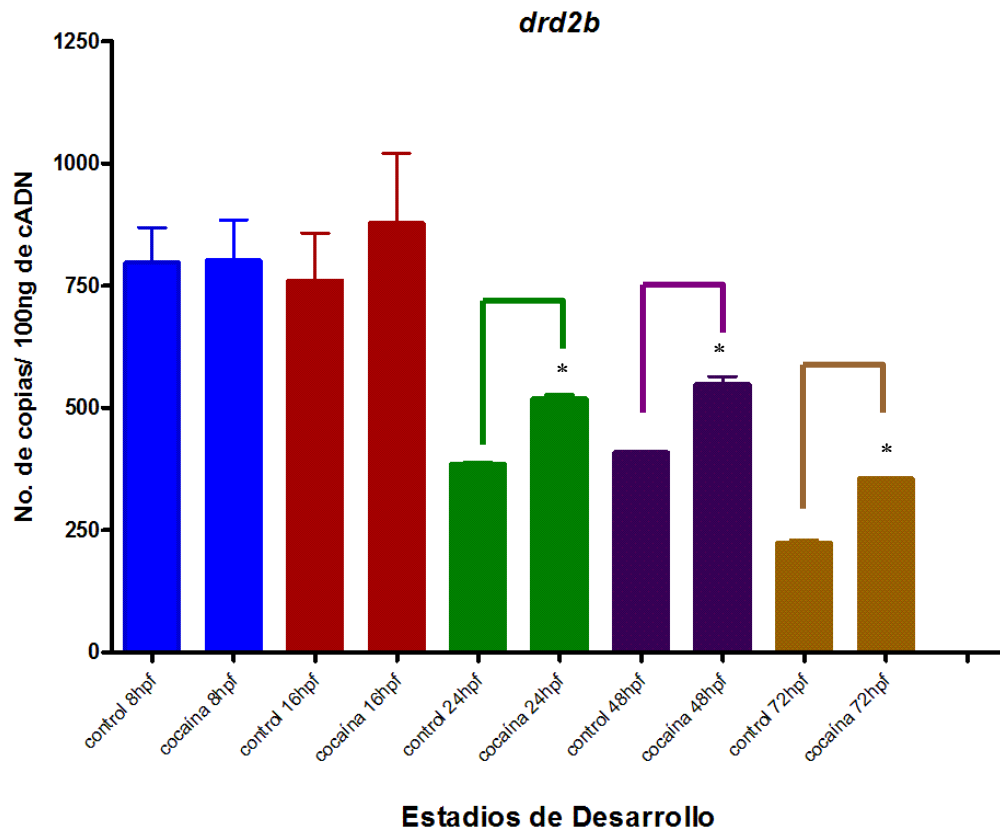


Fig. 7. Representación gráfica de la cuantificación absoluta del receptor drd2b del pez cebra en desarrollo expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína y el grupo control. Cada barra representa el número de copias de DNA del receptor drd2b \pm EEM. Para cada estadio se realizaron tres experimentos; * $P \leq 0.05$ (Prueba T-Student para muestras no pareadas con la corrección de Welch).

drd2b

N° de copias	Estadios embrionarios del pez cebra				
	8 hpf	16 hpf	24 hpf	48 hpf	72 hpf
Embriones no expuestos a cocaína	797	760	386	409	224
Embriones expuestos a cocaína	801	878	519	548	357

Tabla 6. Resultados de la cuantificación absoluta del número de transcritos de drd2b amplificados en 100ng de cDNA de cada estadio embrionario de pez cebra (expuestos y no expuestos a 1.5 μ M de clorhidrato de cocaína).

DISCUSIÓN

V. Discusión

La cocaína es una de las sustancias que mayor adicción produce, cuyo mecanismo de acción preciso es desconocido, por las complejas rutas de señalización (moleculares y celulares) que activa tras su administración tanto en estudios en animales como en los seres humanos. Conocer la acción que produce la cocaína en el sistema biológico permitirá entender mejor el fenómeno de la adicción y así mejorar el tratamiento contra esta drogodependencia.

Entre varios modelos animales, el pez cebra ha demostrado un gran potencial de estudio y terapéutico en procesos de desarrollo, diversas patologías humanas, y también. Varios autores han propuesto al pez cebra como un modelo para el análisis biológico de los efectos de diversas drogas de abuso como el alcohol (Dlugos & Rabin, 2003; Gerlai et al., 2000) y la cocaína (Darland & Dowling, 2001) obteniendo resultados parecidos a los encontrados en ratones. Estos hechos muestran que el uso del pez cebra es un buen modelo experimental, por ese motivo, fue tomado por nuestro grupo de investigación (pionero en clonar y caracterizar los componentes del sistema opioide endógeno, formado por receptores y precursores opioides). Puesto que el pez cebra puede ofrecer información muy valiosa sobre la relación entre el sistema dopaminérgico endógeno y la adicción a la cocaína que otros modelos no pueden aportar nos propusimos estudiar la interrelación de los receptores dopaminérgicos con la cocaína, específicamente analizar los efectos de la cocaína sobre la expresión de los receptores drdd1, drd2a y drd2b durante el desarrollo embrionario, ya que la alteración en los niveles de expresión génica provocada por la cocaína está estrechamente relacionada con la aparición de adicción.

En esta primera etapa de la investigación se realizó el análisis de expresión de los receptores dopaminérgicos (drd1, drd2a y drd2b) en el pez cebra, siendo los valores mostrados datos preliminares, puesto que la investigación seguirá realizándose con más qPCR y el desarrollo de técnicas de hibridación in situ y estudios de cultivos celulares. Nuestro avance preliminar muestra tanto un aumento claro en los receptores drd2a y drd2b y un aumento y disminución de la expresión de receptores drd1 que varía su perfil de expresión dependiendo del estadio embrionario post fertilización.; Estos hallazgos son concordantes con el trabajo realizado por Kleven y cols., 1990, quienes registran un aumento de expresión de receptores dopaminérgicos (D2) y disminución de D1 en el núcleo acumbens tras la exposición crónica de cocaína en ratas (Briand y cols., 2008). Sobre el aumento de expresión de unos receptores y disminución de otros tras la repetida exposición de cocaína se cree estaría mediado por una transitoria desensibilización de los auto receptores D2 en el área tegmental ventral lo que produciría como consecuencia un aumento de la liberación de dopamina, aumentando de esta manera la concentración de dopamina en el espacio sináptico, que a su vez produciría una sobreexposición de los receptores dopaminérgicos lo que con el transcurso del tiempo induciría el aumento de expresión génica de los receptores dopaminérgicos (Nestler, 2005; Andersen y Pierce, 2005). En nuestro caso el aumento o disminución de la expresión de los receptores dopaminérgicos en el pez cebra podría estar mediada por estos mecanismos explicados, pero que también tendría lugar por otros mecanismos, ya que las acciones de la cocaína en sistema biológico son muchos, como por ejemplo la cocaína tiene la capacidad de producir plasticidad sináptica (Cowan y cols., 2008) con un aumento o disminución de

espinas dendríticas en el SNC (Shen y cols., 2009). Aunque es difícil poder afirmar con seguridad un mecanismo concreto, lo que si es evidente es que la administración crónica de cocaína producirá en nuestro caso específico, según el estadio y tipo de receptor dopaminérgico un aumento o disminución de la expresión de receptores dopaminérgicos. Conocer la expresión espacial de los receptores dopaminérgicos en el pez cebra nos permitirá conocer que centros o núcleos del SNC están involucrados con el aumento o disminución de los receptores dopaminérgicos, que serán útiles para en un futuro poder diseñar experimentos farmacológicos con el fin de mejorar la terapia actual contra la adicción.

CONCLUSIONES

VI. Conclusiones

- 1.** La cuantificación de la expresión de los receptores dopaminérgicos en el pez cebra, en los diferentes estadios del desarrollo embrionario, tras la exposición de clorhidrato de cocaína presentan un perfil diferenciado: un aumento o disminución de la expresión, dependiendo del estadio y el tipo de receptor.
- 2.** El receptor drd1 del pez cebra, tras la exposición de clorhidrato de cocaína, presenta un aumento y disminución de su expresión dependiendo del estadio embrionario.
- 3.** La exposición de clorhidrato de cocaína en los diferentes estadios embrionarios del pez cebra presenta un aumento de expresión de los receptores duplicados drd2a y drd2b.

VII. Bibliografía

1. Álvarez FA, Rodríguez-Martin I, Gonzales-Nuñez V, de Velasco EM, González Sarmiento R, Rodríguez RE (2006). New Kappa opioid receptor from Zebrafish *Danio rerio*. *Neuroscience Lett* 405:94-9.
2. Ambrose-Lanci LM, Peiris NB, Unterwald Em, Van Bockstaele EJ (2008) Cocaine withdrawal-induced trafficking of delta-opioid receptors in rat nucleus accumbens. *Brain Res.* 1210:92-102
3. Andersen ML, Perry JC, Tufik S. Possible participation of D3 and D4 dopaminergic receptors on genital reflexes induced by cocaine in paradoxical sleep deprived male rats. *Scandinavian Journal of Psychology* 2007; 48(6):443-7.
4. Anichtchik OV, Kaslin J, Peitsaro N, Sheinin M, Panula P (2004). Neurochemical and behavioural changes in Zebrafish *Danio Rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* 88:443-453.
5. Barrallo A, Gonzalez-Sarmiento R, Porteros A, Garcia-Isidoro M, Rodríguez RE (1998a). Cloning, molecular characterization, and distribution of a gene homologous to delta opioid receptor from zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem Biophys Res Commun.* 245: 544-548.
6. Barrallo A, Malvar FG, Gonzalez R, Rodríguez RE, Traynor J.R. (1998b) Cloning and characterization of a delta opioid receptor from zebrafish. *Biochem Soc Trans.* 26: S360.

7. 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.* 6:155-66.
8. 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.* 230:481-93.
9. Briand LA, Flagel SB, Seeman P, Robinson TE. Cocaine self-administration produces a persistent increase in dopamine D2 High receptors. *European Neuropsychopharmacology* 2008;18(8):551-6.
10. Corchero J, Manzanares J, Fuentes JA (2004). Cannabinoid/opioid crosstalk in the central nervous system. *Crit Rev Neurobiol.* 16: 159-72.
11. Cowan CW, Taniguchi M, Hale CF. Regulation of synaptic connectivity with chronic cocaine. *American Journal of Psychiatry* 2008; 165(11):1393.
12. Darland T, Dowling JE (2001). Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11691-11696.
13. Dlugos CA, Rabin RA (2003). Ethanol effects on three strains of zebrafish: model system for genetic investigations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 74: 471-480.
14. Dooley K, Zon LI (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 10: 252-256.
15. Fishman MC (2001). Zebrafish — the canonical vertebrate. *Science* 294: 1290-1291.

16. 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(4): 773- 782.
17. Goldsmith, P (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Curr. Op. in Pharmacol.* 4: 504-512.
18. Gonzalez-Nunez V, Arsequell G, Szemenyei E, Toth G, Valencia G, Rodríguez RE (2005) Binding profile of the endogenous novel heptapeptide Met-enkephalin-Gly-tyr in zebrafish and rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 862-867.
19. Gonzalez-Nunez V, Barrallo A, Traynor JR, Rodríguez RE (2006). Characterization of opioidbinding sites in zebrafish brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 316: 900-4.
20. González-Núñez V, González-Sarmiento R y Rodríguez RE (2003a). Characterization of zebrafish proenkephalin reveals novel opioid sequences. *Mol. Brain Res.* 114: 31-39.
21. González-Núñez V, González-Sarmiento R y Rodríguez RE (2003b). Cloning and characterization of a full-length pronociceptin in zebrafish: evidence of the existence of two different nociceptin sequences in the same precursor. *BBA-Gene Structure and Expresión.* 1629: 114-118.
22. González-Núñez V, González-Sarmiento R y Rodríguez RE (2003c). Identification of two proopiomelanocortin genes in zebrafish *Danio rerio*. *Mol Brain Res.* 120: 1-8

23. Gonzalez-Nuñez V, Toth G, Rodríguez RE. (2007) Endogenous heptapeptide Met-enkephalinGly-Tyr binds differentially to duplicate delta opioid receptors from zebrafish. *Peptides*. 2007 Dec;28(12):2340-7.
24. Horne-Badovinac S, Lin D, Waldron S, Schwarz M, Mbamalu G, Pawson T, Jan Y, Stainier DY, Abdelilah-Seyfried S. (2001) Positional Cloning of heart and soul reveals multiple roles for PKC lambda in zebrafish organogenesis. *Curr Biol*. 11:1492-502.
25. Jhon Brick and Carlton Erickson. *Drugs, the Brain and Behavior*. The Haworth Medical Press. 1998. New York. United States).
26. Kim E, Clark AL, Kiss A, Hahn JW, Wesselschmidt R, Coscia CJ, Belcheva MM (2006) Mu-and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors. *J Biol Chem* 281: 33749-33760.
27. Kleven MS, Perry BD, Woolverton WL, Seiden LS. Effects of repeated injections of cocaine on D1 and D2 dopamine receptors in rat brain. *Brain Research* 1990; 532(1-2):265-70.
28. 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*. 236:1339-46.
29. López Patiño MA, Yu L, Yamamoto BK, Zhdanova IV. (2008) Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. *Physiol Behav*.
30. Macho Sanchez-Simón F, Rodríguez R.E. (2008). Developmental expression and distribution of opioid receptors in zebrafish. *Neuroscience*, 151:129-37

31. Marquen P, Nguyen AT, Hamid A, Lutfy K. (2008) The endogenous OFQ/N/ORL-1 receptor system regulates the rewarding effects of acute cocaine. *Neuropharmacology*. 54:564-8.
32. Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, Suzuki T (2006). Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J Neurochem*. 97: 1494-505.
33. Nasevicius A, Ekker SC. (2000) Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet*. 26:216-20.
34. Nestler EJ. The neurobiology of cocaine addiction. *Science and Practice Perspectives*. 2005;3(1):4-10.
35. Nüsslein-Volhard C, Dahm R, (2002) *Zebrafish*, Ed. Oxford University Press
36. Padilla PA, Roth MB (2001) Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 7331-5.
37. Paquette J, O'Leary M (2005). Ultra-low dose naltrexone enhances cannabinoid-induced antinociception. *Behav Pharmacol*. 16: 597-603.
38. Pichler FB, Laurenson S, Williams LC, Dodd A, Copp BR, Love DR (2003). Chemical discovery and global gene expression analysis in zebrafish. *Nat Biotechnol*. 21: 879-883.
39. Pinal-Seoane N, Martín IR, Gonzalez-Nunez V, de Velasco EM, Alvarez FA, Sarmiento RG, Rodriguez RE (2006). Characterization of a new duplicate delta-opioid receptor from zebrafish.
40. Redila VA, Chavkin C. (2008) Stress-induced reinstatement of cocaine seeking is mediated by the kappa opioid system. *Psychopharmacology (Berl)*.

41. Rottbauer W, Baker K, Wo ZG, Mohideen MA, Cantiello HF, Fishman MC. (2001). Growth and function of the embryonic heart depend upon the cardiac-specific L-type calcium channel alpha1 subunit. *Dev Cell*. 1: 265-75.
42. Shen HW, Toda S, Moussawi K, Bouknight A, Zahm DS, Kalivas PW. Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *Journal of Neuroscience* 2009;29(9):2876-84.
43. Shin JT, Fishman M. (2002) From Zebrafish to humana modular medica) modela. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 3: 311-40.
44. Shippenberg TS, Zapata A, Chefer VI. (2007) Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. *Pharmacol Ther*. 116:306-21.
45. Soderman AR, Unterwald EM. (2008) Cocaine reward and hyperactivity in the rata Sites of mu opioid receptor modulation. *Neuroscience*. 154:1506-16
46. Spanagel R, Weiss F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci*. 22:521-7.
47. Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LJ. (2004) The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*. 20: 367-79.
48. Xu X, Meiler SE, Zhong TP, Mohideen M, Crossley DA, Burggren WW, Fishman MC (2002) Cardiomyopathy in zebrafish due to mutation in an alternatively spliced exon of titin. *Nat Genet*. 30:205-9.
49. Zhang Y, Butelman ER, Schlussman SD, Ho A, Kreek MJ. (2004) Effect of the endogenous kappa opioid agonist dynorphin A(1 -17) on cocaine-evoked increases in striatal dopamine levels and cocaine-induced place preferente in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 172:422-9

50. Zhu Y, Song D, Tran NT, Nguyen N. (2007) The effects of the members of growth hormone family knockdown in zebrafish development. *Gen Comp Endocrinol.* 150:395-404.

ANEXOS


```

drd1      -----MDVNYSTVLD---SSVSQRDSSKRVLTCGFLSLLILTTLLGNT 40
drd2a    MAMFSS-----GEWLWNDSEHSFTPGGNYSPASGVVEAKRNYAMLYSLLILAIIVFGNV 54
drd2b    MDFL-----TEYPYNDTYDNGTG-ALNCTGCEAKHQYNYAMLLTLLIFVIVFGNV 51
drd2l    MPVLNVTEELTITASPSSAVFLSLHQS-NCNSVSPSPSSPPYNYFAYLLVLLIFCVVFGNV 59
          . . . . . : ***: :*:
          . . . . . :

drd1      LVCAAVTKFRHLRSKVTNFFVISLAISDLLVAILVMPWKAATEIVG-FWPFG-AFCDVWV 98
drd2a    LVCIAVLRERALQT-TTNYLVVSLAVADLLVASLVPWAVYLEVVGAWLFSRLYCNVVF 113
drd2b    LVCMAVSREKALQT-TTNYLIVSLAVADLLVATLVPWVVYLEVVG-EWRFSKIHCDFV 109
drd2l    LVCVAVSREKALQT-TTNYLIVSLAVSDLLLATLVPWGVYLEVVG-EWRFRIHCDVLL 117
          *** ** : : *:: .**:::***::***:* ***** . *:** * . .*: :
          . . . . . :

drd1      AFDIMCSTASILNLCVIVSDRYWAISSPFYERKMTP-KVAFIMISVAVTSLISLISF-IP 156
drd2a    TLDVMMCTASILNLCASIDRYTAVVMPVLYNTHSSRKRVSVMIAVWVLAFAVSCPLL 173
drd2b    TLDVMMCTASILNLCASIDRYTAVAMPMLYNTRYSSKRRVTVMISVVVWLSFAISCP 169
drd2l    TLDVMMCTASILNLCASIDRYTAVAMPPLYNTRYSSRRRVALMIAVVWLSFAISCP 177
          :*: * .*****.**:*** * : * . * : . : . :**:. * * : : * :
          . . . . . :

drd1      VQLNWHKAQTTSYTELNGTYGELPPDNCSSLNRTYAISSSLISFYIPVAIMLVITYRIY 216
drd2a    FGFN--TTDDPAVCSIS-----NPDFVIYSSVVSFYLPFAVTLVYVRIY 216
drd2b    FGLNNTATRDGVSCEIA-----NPAFVVYSSIMSFYVPIITLLVYVQIY 214
drd2l    FGLNNTASQEGRDSCFA-----DPAFVVYSSVASFYVPIVITLLVYVQIC 222
          . : * : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : * : * : * :
          . . . . . :

drd1      RIAQKQIRRI SALERAAESAKNRHSSMG---NNASMESESSFKMSFKRETKVLKTL SVI 272
drd2a    IFLRRRRKKIT-FRQGSQKVPASAPPSVETCLQDDAHKEKRDLSPIRIN VITESKEQVI 275
drd2b    VVLRRRRKRVN-TKRSCQKTD-ADAQP---PLKEKCTHPEDVKLCTV I IKTNGGVPKANK 269
drd2l    VVLRRRRRTAPTARRRAANTEPADAQR---SCKNKCTHPEDVKLCTLILKPAAAAPQR-K 278
          . : : : : : . : . . . : : : : . * . . . :
          . . . . . :

drd1      MGVFVCCWLPFFVLNCMVPCNPNESTDFLCISSTTFDVFVWFGWANSSLN-----PIIY 327
drd2a    RPRLLANCLRRKRPQTAPAENSLPPVITLNYCISQASFARTEQDANREEEEGGDEEQV 335
drd2b    KAQLIKEVLHQGGDVGEMVAGTSPPEKKKLASSLVVDLLATPPSPNHGSPSHAEQSNG 329
drd2l    KVTLVKEAVVHP--LAVEPVCSLSADREQTQTQPSGRAKLSLSVAPCAG----- 325
          : : : . . . . :
          . . . . . :

drd1      AFNADFRKAFSILLGCHRLCPGSSAIEIVSIN---NCGPPSTSQYQPKGHIPKEGNNSN 384
drd2a    AVRGCEVKKLANGRTHTSLRPPRAAHAMVCP---SQARCRSMHSKEKKATQMLAIVLGV 391
drd2b    DEKNGHAKDVQSPKETKPVETQALPNGKTRTTVTKTMSKRKMSQHEKKATQMLAIVLGV 389
drd2l    --QSGPGPRRDTLQEKTHTEKHAAAKERVRG-----RLSQQKERKATQMLAIVLGV 374
          . . . . . : * . .
          . . . . . :

drd1      YEIPHSIICQEEENQKEDDSGIKTFDKLSPSMSTGLDSDAD-VSLEKINPITQNGQHKS 443
drd2a    FLICWLPFFVTHILNTHCRACHIPPEVYSAFTWLGYNVNSALNPVIYTTFNIEFRRAFIKI 451
drd2b    FIICWLPFFITHILKTHCTSCVPLEMNAFTWLGYNVNSAVNPIIYTTFNIEFRKAFIKI 449
drd2l    FIICWLPFFLTHVLKAHCGSCCISPSLSYAVTWLGYLNSAVNPIYTTFNIEFRKAFIKI 434
          : * : . : : . : : : * : : * : : : : * : : . . *
          . . . . . :

drd1      IPC 446
drd2a    LSC 454
drd2b    LHC 452
drd2l    LHC 437
          : *
          . . . . . :

```

Comparación de receptores dopaminérgicos de pez cebra: drd1 y drd2a, drd2b y drd like. Las secuencias fueron alineadas con CLUSTALW. Los asteriscos, dos puntos y puntos denotan aminoácidos idénticos, sustitución conservada y sustitución semiconservada, respectivamente.