

MORFINAK ERAGINDAKO ALDAKETA EPIGENETIKOEN AZTERKETA *IN VITRO* ETA *IN VIVO*

Manu Araolaza, Iraia Muñoa-Hoyos, Jon Irazusta eta Nerea Subirán.

Fisiologia departamentua, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea, Leioa (Bizkaia).
Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).

1. Sarrera

Patroi epigenetikoak aldatu egin daitezke kanpo faktoreen bidez, hala nola, elikadura, toxikokoikiko kontaktua, jarduera fisikoa, estresa eta drogen kontsumoa (Dunn eta Bale, 2011; Kaati et al., 2002; Whitelaw eta Whitelaw, 2006; Morgan eta Bale, 2011; Vassoler et al., 2014; Yohn et al., 2015). Marka epigenetikoak, DNA-ren sekuentzia inolako mutaziorik sortu gabe DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimikoak dira eta hauek, geneen adierazpena kontrolatu dezakete (Marx, 2012). Morfina, opioaren konposatu aktiboena da eta oso erabilia da medikuntzan analgesiko moduan, baina honen gehiegizko erabilera albo efektu ugari sor ditzake. Orain arte burutu diren ikerketa gehienak, morfina garuneko eremu espezifikoetan sortzen duen erregulazio-epigenetikoan zentratu dira, tolerantzia, menpekotasuna eta bestelako nahasmen psikiatrikoekin erlazionatuz (Browne et al 2020; Maze eta Nestler 2011). Hala ere, morfina gainerako organo eta aparatuetan eragiten dituen aldaketa epigenetikoaren inguruan oso gutxi aztertu da.

2. Ikerketaren Helburuak

Ikerketa honen helburu nagusia morfina eragiten dituen aldaketa epigenetikoak aztertzea eta prozesu honetan parte hartzen duten mekanismoen inguruan ezagutzak handitzea da. Honetarako, DNA katean ematen diren metilazio eta hidroximetilazio aldaketak, eta hauek erregulatzen dituzten konplexuen gene-adierazpen mailak aztertu dira.

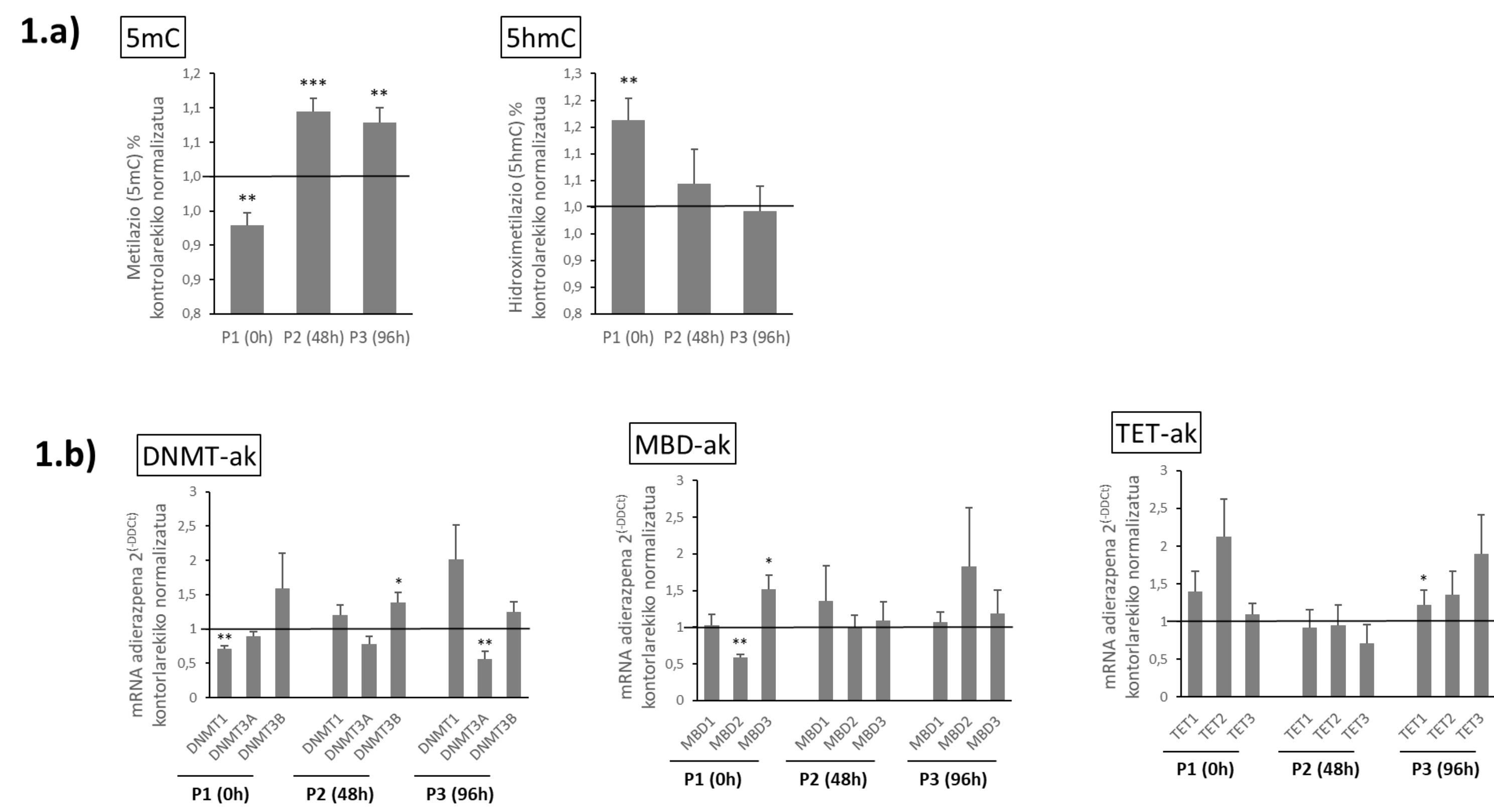
Helburu espezifikoak:

- 1) Morfinaren tratamendu kronikoa *in vitro*, mESC-etan.
- 2) Morfinaren tratamendu kronikoa *in vivo*, sagu ar eta emeetan.

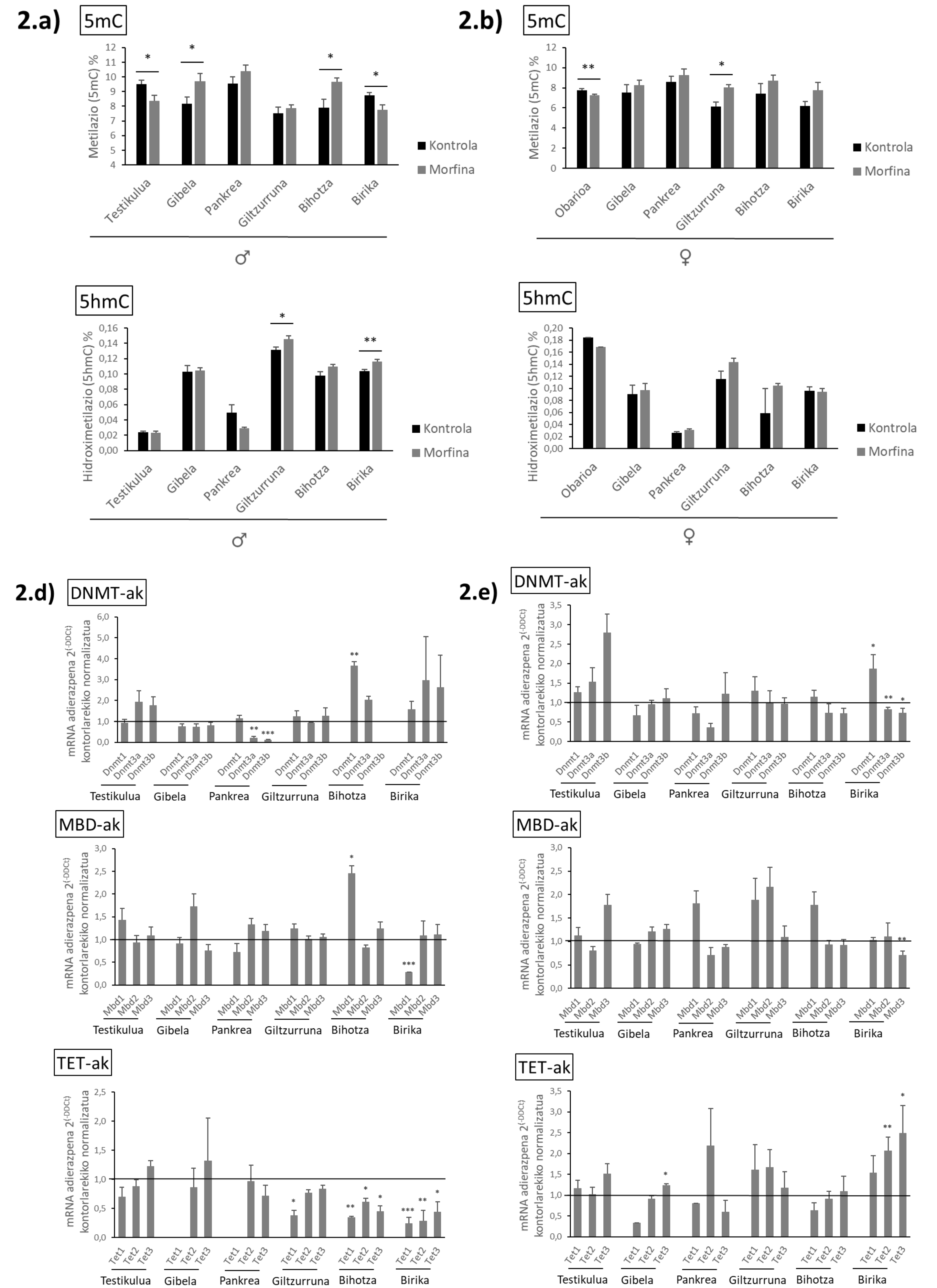
3. Metodologia

In vitro esperimenduak mESC-ak erabili ziren; morfinaren 24 orduko tratamendu kronikoa. *In vivo* esperimenduak berriz, Swiss Webster saguak erabili ziren; 12 orduko tartearrekin 4 egunetan zehar gauzaturiko injekzio azpikutaneoaren bidezko morfinaren tratamendua, dosiaren emendio gradual batekin. Kasu bakoitzean:

- Genomako metilazio (5mC) eta hidroximetilazio (5hmC) maila globalak neurtzeko, Kromatografia Likidora akoplaturiko Masa Espektrometria (LC-MS/MS) teknika erabili zen.
- Geneen adierazpen maila neurtzeko, Polimerasaren Kate-Erreakzio kuantitatiboa Denbora Errealean (RT-qPCR) teknika erabili zen.



1. irudia. Morfinak eragindako metilazio eta hidroximetilazio maila globalen eta asoziatu geneen adierazpen aldaketak mESC zeluletan, 3 pasekin. (a) genomako metilazio eta hidroximetilazio hondarren maila globalari dagozkion ehunekoak (LC-MS/MS); eta (b), erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen mailak (RT-qPCR). Bi neurketak 3 pasetan neurtu ziren, 48 orduko diferentziarekin (0, 48 eta 96 ordu).



4. Ondorio Nagusiak

1. Morfinaren *in vitro* tratamendu kronikoa DNA-ren metilazioan eragiten du mESC-etan, hauen pluripotentzia maila handituz. Honen ondorioz sorturiko desdoikuntzak denboran zehar mantentzen dira behin morfinaren presentzia desagertu eta gero.
2. Morfinaren *in vivo* tratamendu kronikoa aldaketak dakartza maila sistemikoan, saguen organo gehienetan eraginez.
3. *In vivo* behaturiko aldaketa sistemiko hauek ezberdinak dira indibiduo ar eta emeetan. Beraz, morfinaren eragina sexuaren menpekota da.
4. Sexu organoetan eman den metilazio patroien aldaketa joera berdina izan da eta honek, inplikazio handia izan dezake belaunaldiz belaunaldiko herentzia epigenetikoan.

5. Erreferentziak

Browne, C.J., Godino, A., Salery, M. eta Nestler, E.J. (2020), Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction, *Biol Psychiatry* 87, 22-33.
Dunn, G.A. eta Bale, T.L. (2011), Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage, *Endocrinology* 152(6), 2228-36.
Kaati, G., Bygren, L. eta Edvinsson, S. (2002), Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period, *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 682-688.
Marx, V. (2012), Epigenetics: Reading the second genomic code, *Nature* 491(7422), 143-7.
Maze, I. eta Nestler, E.J. (2011), The epigenetic landscape of addiction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1216, 99-113.
Morgan, C.P. eta Bale, T.L. (2011), Early prenatal stress epigenetically programs dysmasculinization in second generation offspring via the paternal lineage, *J. Neurosci.* 31, 11748-11755.
Vassoler, F.M., Byrnes, E.M. eta Pierce, R.C. (2014a), The impact of exposure to addictive drugs on future generations: Physiological and behavioral effects, *Neuropharmacology* 76(Pt B), 269-275.
Whitelaw, N.C. eta Whitelaw, E. (2006), How lifetimes shape epigenotype within and across generations, *Hum. Mol. Genet.* 15(2), 131-7.
Yohn, N.L., Bartolomei, M.S. eta Blendy, J.A. (2015), Multigenerational and transgenerational inheritance of drug exposure: The effects of alcohol, opiates, cocaine, marijuana, and nicotine, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 118, 21-33.

2. irudia. Morfinak eragindako metilazio eta hidroximetilazio maila globalen eta asoziatu geneen adierazpen aldaketak saguetako organo ezberdinetan. Saguetako organo ezberdinetan neurturiko DNA-ren metilazio eta hidroximetilazio -maila globalak arretan (a) eta emeetan (b), eta erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen maila arretan (d) eta emeetan (e). Aztertutako organoak sei dira: testikulu/obarioak, gibela, pankrea, giltzurrunak, bihotza eta birrikak, hurrenez hurren.

Manu Araolaza-k Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) beka predoktorala jaso du eta Iraia Muñoa-Hoyos-ek Eusko Jaurlaritzako beka predoktorala jaso zuen. Horrez gain, buruturiko proiektu hau, ISCIII eta Osasun Ministerioak eta Eusko Jaurlaritzako Osasun Departamentuak emandako diru laguntzen bidez gauzatu dugu. LC-MS/MS teknika, Sgiker Analisisako Zerbitzu Zentralaren laguntzaz burutu dugu.