



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a  
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### OSASUN ZIENTZIAK

**Morfinak eragindako aldaketa  
epigenetikoaren azterketan *in vitro*  
eta *in vivo***

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

29-69 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.04.03>



## Morfinak eragindako aldaketa epigenetikoan azterketa *in vitro* eta *in vivo*

Araolaza, M., Muñoa-Hoyos, I., Irazusta, J. eta Subirán, N.

*Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)*

[manu.araolaza@ehu.eus](mailto:manu.araolaza@ehu.eus)

### Laburpena

Epigenetikaren inguruko ikerketa gehienak kanpo faktoreek edo barne estimuluek, prozesu zelular eta fisiologikoetan nola eragiten duten ulertzean zentratzen dira. Aldaketa epigenetikoak, nukleotidoen sekuentzian inongo aldaketarik sortu gabe DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimiko batzuk dira eta hauek, geneen adierazpena arautzen dute. Kanpo faktoreek aldaketa ugari sortu ditzakete patroi epigenetikoan, hala ere, prozesu honetan parte hartzen duten azpi-mekanismoen inguruan oso gutxi ezagutzen da. Hori dela eta, lan honen helburu nagusia, kanpo estimulu moduan morfina erabiliz geneen adierazpena arautzen dituzten marka epigenetikoak aztertzea da, DNA-ren metilazioan zentratuz eta interes berezia ezarriz hau baimentzen duen makineria erregulatzailaren adierazpenean.

Hitz gakoak: kanpo faktoreak, morfina, epigenetika, metilazioa eta hidroximetilazioa.

### Abstract

*Most of the research on epigenetics focuses on understanding how external factors or internal stimuli influence cellular and physiological processes. Epigenetic changes are chemical molecules that adhere to DNA without causing any change in the nucleotide sequence and that regulate the expression of genes. External factors can produce many changes in the epigenetic pattern, although very little is known about the sub-mechanisms involved in this process. Therefore, the main objective of this work is to analyse the epigenetic marks that regulate the expression of genes through the use of morphine as an external stimulus, focusing on the methylation of DNA and putting special interest in the gene-expression of its regulatory machinery.*

*Key words: external factors, morphine, epigenetic, methylation and hydroxymethylation.*

### 1. Sarrera

Hurrengo hamarkadetan existitzen den erronka handienetako bat norberaren bizimoduak eta inguruneak osasunean nola eragiten duen jakitea da. Orain dela gutxi arte, banakoa bere geneek definitzen zutela uste zen, baina ideia hau zeharo aldatzen joan da. Izan ere, geroz eta ezagutza handiagoa dugu epigenetikaren inguruan. Aldaketa epigenetikoak, DNA-ren sekuentzian inolako mutaziorik sortu gabe DNA-ri itsasten zaizkion molekula kimikoak dira eta hauek, geneen adierazpena kontrolatzen dute (Marx, 2012). Orokorrean, hiru dira geneen adierazpena arautzen duten mekanismoak: DNA-ren metilazioa, histonen eraldaketak eta RNA ez-kodetzaileak (Kiefer, 2007). Ikerketa honetan, metilazioan eta honekin erlazionaturik dagoen hidroximetilazioan zentratuko gara. Izan ere, DNA-ren metilazioa, ugaztunen genomaren transkripzioaren plastikotasuna erregulatzen duen eraldaketa epigenetiko garrantzitsuenetariko bat da (Jaenisch eta Bird, 2003).

DNA-ren metilazioa, zitosina hondarraren bosgarren posizioako karbonoan ematen den metilo taldearen gehikuntza kobalentea da, 5' metilzitosina hondarra sortuz (5mC) (Bird et al., 1985; Gardiner-Garden eta Frommer, 1987). Honen presentziak izugarriko garrantzia du zelulako transkripzioaren erregulazioan, geneen adierazpenaren isilpenarekin erlazionatua baitago (Baylin eta Jones, 2005). Metilo taldearen eta zitosina hondarraren artean sorturiko lotura mota hau itzulgarria den arren, biziraupen nahiko luzea du gainerako aldaketekin konparatuz gero (Lande-Diner eta Cedar, 2005). Horregatik, aldaketa epigenetiko egonkortzat hartzen da. DNA-ren metilazioaz arduratzen diren proteina katalitikoak DNMT1, DNMT3A eta DNMT3B entzimak (ingelesezko *DNA Methyltransferase*;

DNMT) dira eta MBD proteinek (ingelesezko *methyl-CpG-bindin domein*; MBD), oso paper garrantzitsua jokatzeko hauen mantenuan (Okano et al, 1998; Gowher eta Jeltsch, 2001; Jaenisch eta Bird, 2003; Wade, 2001a). 5mC hondarrek zelularen desberdintzapen prozesua ahalbidetzen dute, zelula bakoitzari identitate zelular jakin bat emanez (Allis eta Jenuwein, 2016). DNA metilatuaren oxidazio prozesuaren bidez berriz, 5'hidroximetilzitosina hondarra (5hmC) eratzen da, 5mC-aren demetilazio prozesu aktiboko hondar bitartekaria. Prozesu hau ahalbidetzen duten proteina katalitikoak TET1, TET2 eta TET3 entzimak (ingelesezko *Ten-Eleven Translocation*; TET) dira. 5hmC hondarren presentzia, geneen adierazpenaren emendioarekin erlazionatuta dago (Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010), aurretik aipaturiko 5mC hondarren kontrako efektua sortuz, hau da, pluripotentzia mailaren handipena (Leitch et al., 2013; Smith et al., 2012).

Metilazioaren patroia epigenetiko hau eraldatu egin daiteke kanpo faktoreen bidez eta honek, eragin zelular eta fisiologiko ugari izan ditzake. Faktore hauen artean, elikadura, toxikoekiko kontaktua, drogen kontsumoa (tabakoak, alkohola, opiazeoak, etab.), jarduera fisikoa eta estresa daude (Dunn eta Bale, 2011; Kaati et al., 2002; Whitelaw eta Whitelaw, 2006; Morgan eta Bale, 2011; Vassoler et al., 2014; Yohn et al., 2015). Morfina, opioaren konposatu aktiboena da eta hau izan zen lehendabizi isolatu zen opiazeoa. Konposatu hau, oso erabilia da analgesiko moduan medikuntzan, baina honen gehiegizko erabilera albo efektu ugari sor ditzake. Hauen artean, neurona dopaminergikoetan alterazioak, portaera emozionalean aldaketak eta analgesiarako sentsibilitatearen galera daude. Horrez gain, efektu hauek belaunaldi belaunaldi iragaten direla ere behatu da (Byrnes et al., 2011; Johnson et al., 2011). Hala ere, herentzia honen atzean dauden azpi mekanismoen inguruan ez da asko ezagutzen.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Proiektu hau garatzerako garaian, gure helburu nagusia morfina eragiten dituen aldaketa epigenetikoak aztertzea eta bertan parte hartzen duten mekanismoen inguruan dagoen ezagutza handitzea izan zen. Gure ikerketa taldeak berriki deskribatu du, morfina tratamendu kronikoak H3K27me3 histonaren eraldaketak gidatutako asaldura transkripzionalak sortzen dituela saguen ama-zelula enbrionarioetan (mESC) (Muñoa-Hoyos et al., 2020). Emaiza horrek, aldaketa epigenetikoek enbrionarioaren garapen prozesuan eragin nabarmena izan dezaketela adierazten du eta ondorioz, baita banako helduen fenotipoan ere. Dena dela, mekanismo horretan DNA-ren metilazioak betetzen duen funtzioaren inguruan ez da oraindik ezer adierazi. Gaiaren inguruko literatura zientifikoa aztertuz gero, informazio gehiena morfina garuneko eremu espezifikotan sortu dezakeen erregulazio-epigenetikoan zentratzen da, tolerantzia, menpekotasuna eta nahasmen psikiatrikoak bezalako efektu fenotipikoekin erlazionatuz (Browne et al 2020; Maze eta Nestler 2011). Gorputzeko beste organo eta aparatuetan eragiten dituen aldaketa epigenetikoaren inguruan berriz, ez dira ikerketa asko ezagutzen.

Guzti hau kontuan hartuta, lan honen helburu nagusia *in vitro* eta *in vivo* ereduetan morfina tratamendu kronikoak eragiten dituen aldaketa epigenetikoak aztertzea da, prozesu honetan dauden mekanismoen inguruan ezagutza handituz. Honetarako, DNA katean ematen diren metilazio eta hidroximetilazio aldaketak, eta hauek erregulatzen dituzten konplexuen gene-adierazpen mailak aztertuko dira. Helburu espezifikoak:

- 1) Morfina tratamendu kronikoak mESC-etan eragiten dituen metilazio eta hidroximetilazio aldaketen azterketa, metilazioaren erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen aldaketekin batera. Ondoren, morfina presente ez dagoenean aldaketa hauen memoria epigenetikoaren identifikazioa burutuko da.
- 2) Morfina tratamendu kronikoak, sagu ar eta emeen organoen DNA-ren metilazio eta hidroximetilazio patroian sortzen dituen aldaketa globalak identifikatzea, metilazioaren erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen aldaketekin batera.

## 3. Ikerketaren muina

### 3.1. Metodologia

*In vitro* esperimentuetan mESC-ak erabili ziren, ESC Oct-4<sup>+</sup> zelulak zehazki eta hauei, morfina (10 µM) 24 orduko tratamendu kronikoa gauzatu zitzaizkien. *In vivo* esperimentuetan berriz, 8-

10 astetako Swiss Webstar saguak erabili ziren. Saguen morfinaren tratamendu kronikoa aldiz, 12 orduko tartearekin 4 egunetan zehar gauzaturiko injekzio azpikutaneoaren bidez burutu zen, morfina dosiaren emendio gradual batekin (20, 30, 40, 50 mg/kg) (Yang et al., 2014; Crain eta Shen, 1995). Sagu kontroletan %0.9-ko sodio kloruroa injektatu zen. Morfinaz trataturiko saguak analgesia egoera batean aurkitzen zirela frogatzeko, Plater Beroaren Analgesia Test-a (ingelesezko *Hot-plate analgesia test*) froga gauzatu zitzairen. Saguekin zerikusia izan zuten protokolo guztiak UPV/EHU-ko Animaliekin Esperimentatzeko Batzorde Etikoa-ren bidez onartuak izan ziren (onespen-zenbakia: CEEA/339/2013/SUBIRAN CIUDAD eta M20/2016/142).

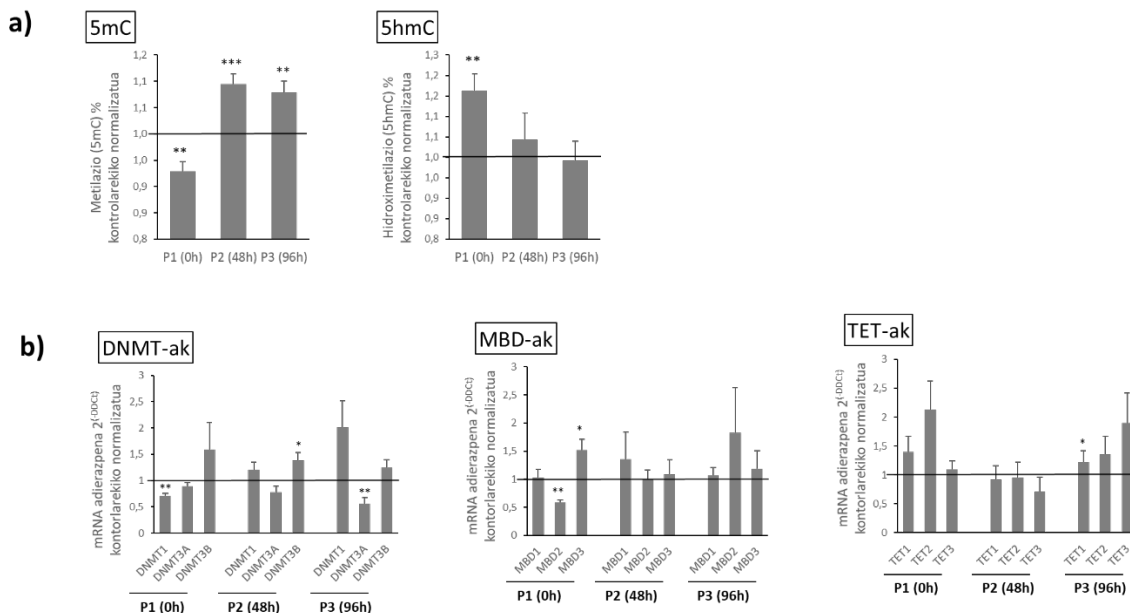
Genomako metilazio (5mC) eta hidroximetilazio (5hmC) maila globalak neurtzeko Kromatografia Likidora akoplaturiko Masa Espektometria (LC-MS/MS) teknika erabili zen, 5 N-ko laginarekin. Lorturiko datuak ehuneko moduan adierazi ziren, lagin bakoitzean neurturiko 5mC eta 5hmC hondakinen kopuruak C hondarren kopuru totalarekin zatituz. Geneen adierazpen maila neurtzeko berriz, Polimerasaren Kate-Erreakzio kuantitatiboa Denbora Errealean (RT-qPCR) teknika erabili zen, 3 N-ko laginarekin. Honetarako, hasle espezifikoak (ingelesezko *primer*) erabili genituen eta datuen normalizazioa burutzeko, erreferentzia gene egonkorrenak aukeratu ziren geneen normalizatzaile (ingelesezko *housekeeping*) moduan. Lorturiko geneen adierazpenen kuantifikazio erlatiboa  $2^{\Delta\Delta CT}$  metodoaren bidez aurkeztu dira. Esperimentu hauen bidez lorturiko emaitzen analisi estatistikoa Student-en T proba (ingelesezko *Student's t-test*) erremintaren bidez gauzatu zen, emaitzen esanguratsutasun maila hirutan bereiziz: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  eta \*\*\* $p < 0.001$ .

### **3.2. Morfinaren tratamendu kronikoak mESC-etan eragiten dituen metilazio eta hidroximetilazio aldaketan azterketa, metilazioaren erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen aldaketekin batera.**

Gure lehen helburua, mESC-tan morfinaren tratamendu kronikoak eragiten dituen aldaketak identifikatzea izan zen eta emaitza hauek, 1. irudian beha ditzakegu. 24 orduko tratamendu kronikoaren ostean, zenbait aldaketa esanguratsu deskribatu ziren. Alde batetik, metilazio maila globalaren jaitsiera eta hidroximetilazio maila globalaren igoera identifikatu ziren (1.a irudia; P1). Beste aldetik, gene-erregulatzailen adierazpena aztertuz gero (1.b irudia; P1), *Dnmt1* eta *Mbd2* geneen jaitsiera eta *Mbd3*-aren igoera antzeman ziren. *Tet* geneen kasuan aldiz, ez genuen hauen adierazpenean inongo aldaketarik sumatu. Deskribatutako metilazio mailen jaitsiera, hidroximetilazioen igoerarekin bat dator eta hori demetilazio-prozesu aktiboren adierazle izan daiteke. *Dnmt* eta *Mbd* geneei dagokionez berriz, hauen presentzia metilazioarekin erlazionatzen denez, *Dnmt1* eta *Mbd2*-aren jaitsierak azalduko emaitzekin bat datoz. *Mbd3*-aren adierazpenaren igoera aldiz, aurreko emaitzekin kontraesanean aurkitzen da. Ikerketa batean frogatu denez, MBD3 proteinaren presentzia ezinbestekoa da mESC zelula pluripotenteetan. Izan ere, proteina hau ezabatua duten saguak ez dira bideragarriak enbrioaren garapeneko lehen etapetan (Hendrich et al., 2001), beste edozein MBD proteinen ezabapenarekin gertatzen ez den moduan. Horregatik, zelula hauen pluripotenti maila handitzen denean, *Mbd3* genearen adierazpenaren igoera nahitaez eman behar dela pentsa dezakegu.

Morfinaren efektua denboran zehar mantentzen zen argitzeko, tratamendu ostean zelulak kultiboan mantendu ziren, laginak 48 eta 96 orduz jaso (P2 eta P3 hurrenez hurren). Ondoren, zelula hauen metilazio eta hidroximetilazioak aztertu ziren. Pase hauetan, zelulen egoera epigenetikoa erabat aldatu zen metilazioei dagokionez: P1 pasetik P2 pasera metilazio-maila globala nabarmenki handitu zen. Hidroximetilazioei dagokionez, P1 pasean maila altuagoak hauteman baziren ere, ondorengo bi pasetan (P2 eta P3) 5hmC-en maila globala bere horretara bueltatu zen. Geneen adierazpenari dagokionez, P2-an *Dnmt3b* genearen igoera esanguratsu bat behatu zen eta P3-an berriz, *Dnmt3a*-ren jaitsiera eta *Tet1*-aren igoera. Hortaz, metilazio mailetan igoera nabarmen bat eman zen arren, hidroximetilazio mailak konstante mantendu ziren. Metilazioaren erregulazio-komplexuetan lortutako emaitzen arabera, P2-an identifikatutako 5mC-mailen igoera, *de novo* metiltransferasa moduan ezagutzen den *Dnmt3b* genearen adierazpenaren igoerarekin erlazionaturik egon daiteke. P3-ari dagokionez berriz, 5mC-en mailan hauteman zen jaitsiera leuna, *Dnmt3a*-ren adierazpenaren jaitsierarekin eta *Tet1*-en adierazpenaren igoerarekin erlazionaturik egon daiteke. Edonola ere, *Tet1*-en igoerak ez zuen inongo aldaketarik sortu 5hmC-en mailan.

Hortaz, mESC-etan buruturiko morfinaren tratamendu kronikoa desagertzean metilazio-mailak esanguratsuki handitzen dira, pluripotenti maila murriztuz. Morfinaren efektu hori denboran zehar mantendu egiten da, gutxienez 96 ordutan, hala moduko memoria bat eraginez. mESC zelulek 11-14 orduko ziklo zelularra dutela kontuan hartzen badugu (Waisman et al., 2019), morfinaren eragina 8 bat belaunalditan zehar topatzen da gutxienez.

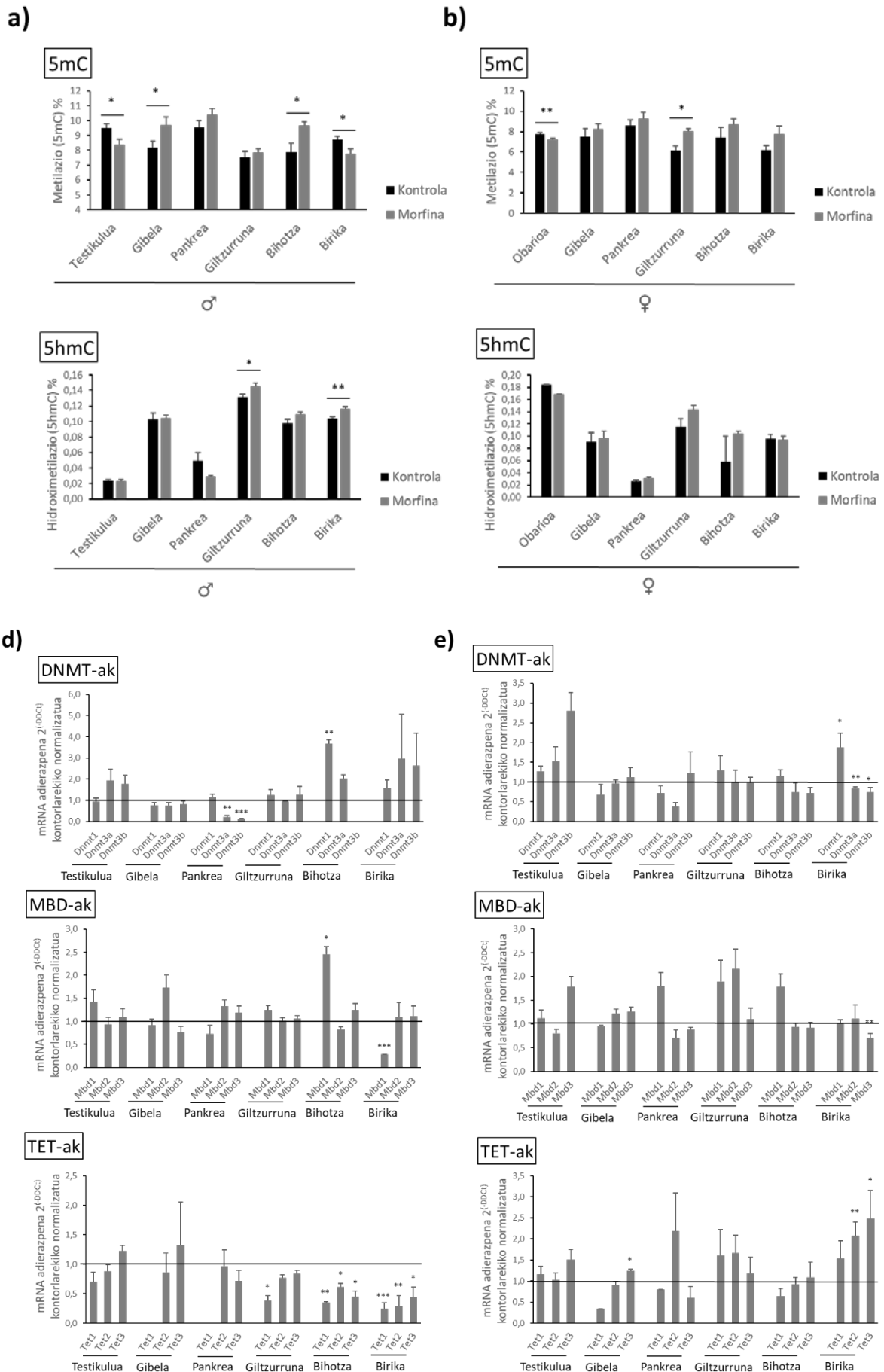


**1. irudia. Morfinak eragindako metilazio eta hidroximetilazio maila globalen eta asoziatu-riko geneen adierazpen aldaketak mESC zeluletan, 3 pasekin (0, 48 eta 96 ordu).** Morfinaren tratamenduak eragindako aldaketak mESC zeluletan. **(a)** genomako metilazio eta hidroximetilazio hondarren maila globalari dagozkion ehunekoak (LC-MS/MS); eta **(b)**, erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen mailak (RT-qPCR). Bi neurketa hauek 3 pasetan zehar neurtu ziren, pase batetik bestera 48 orduko diferentzia zegoelarik (0, 48 eta 96 ordu).

### 3.3. Morfinaren tratamendu kronikoak, sagu ar eta emeen organoen DNA-ren metilazio eta hidroximetilazio patroian sortzen dituen aldaketa globalak identifikatzea, metilazioaren erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen aldaketekin batera.

Bigarren helburu nagusia, morfinaren tratamendu kronikoak saguetako organoetan dituen eragin epigenetikoak eta hauen erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen mailak aztertzea izan zen. Helburu honetan lortu ditugun emaitzak 2. irudian azaltzen dira. Metilazio eta hidroximetilazioei dagokionez, emaitza oso ezberdinak eskuratu ziren aztertutako bi sexuetan eta sagu arretan aldaketa adierazgarriagoak topatu ziren. Arretan (2.a irudia), testikulek eta birikek metilazio-mailen jaitsiera erakutsi zuten eta gibelak eta bihotzak berriz, metilazioen igoera. Hidroximetilazioen kasuan aldiz, giltzurrunek eta birikek igoera bat jasan zuten. Emeetan (2.b irudia), 5mC balioei dagokionez, obarioek jaitsiera eta giltzurrunek igoera bat erakutsi zuten eta 5hmC balioetan aldiz, ez zen inongo aldaketarik identifikatu. Bi prozesu hauen erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpenari dagokionez, emaitza oso ezberdinak hauteman ziren. Arretan esaterako (2.d irudia), pankrean *Dnmt3a/b* geneen jaitsiera; giltzurrunetan *Tet1*-en jaitsiera; bihotzean *Dnmt1* eta *Mbd1*-en igoera eta *Tet1/2/3*-en jaitsiera; eta birikan, *Mbd1* eta *Tet1/2/3*-en jaitsiera identifikatu ziren. Emeetan (2.e irudia) aldiz, gibelean *Tet3*-aren igoera; eta birikan, *Dnmt1* eta *Tet2/3*-ren igoera eta *Dnmt3a/b* eta *Mbd3*-aren jaitsiera hauteman ziren.

Erabilitako bi tekniken bidez lorturiko emaitzetan,aldi berean aldaketak agertutako organo bakarrak, sagu arretako giltzurrunak, bihotza eta birikak izan dira. Giltzurrunean ez dago korrelaziorik datuen artean; 5hmC mailak igo egiten badira ere, *Tet1* genea topatzen da. Bihotzean, *Tet*-etako datuak bat ez badatoz ere, *Dnmt1* eta *Mbd1*-en datuak metilazioen igoerarekin erlazionaturik daude. Biriken kasuan berriz, *Tet*-en adierazpen maila ez dator bat 5hmC-en mailekin, baina *Mbd1*-en jaitsiera, metilazioarenarekin erlazionaturik egon daiteke. Gainerako organoetan metilazio eta hidroximetilazio -mailei dagokionez, ez dira aldaketa esanguratsurik topatu edo ez dute aztertutako gene-erregulatzailen mailarekin zuzenean bat egiten. Horregatik, kasu hauetan morfinaren bidez eman daitezkeen aldaketen jatorria besteren bat izan litekeela pentsa genezake. Aipagarria da sexu organoek, bai testikuluak eta bai obarioak, metilazio maila globalen jaitsiera adierazgarriak jasan zituztela. Izan ere, morfinak organo hauetan eragin zuen efektu epigenetikoa antzekoa izan zen, gainerako organoetan gertatu ez zen moduan. Kointzidentzia honen arrazoiak ezezagunak baditugu ere, argi dago organo hauetan ematen diren aldaketa epigenetikoak hurrengo belaunaldietara heredatzeko duten potentzialtasuna ikaragarri handia dela (Gapp et al., 2014; Yohn et al., 2015). Horrez gain, lorturiko emaitzak kontuan hartuta, morfinaren *in vivo* tratamendu kronikoak, organo eta sistema biologiko ezberdinetan metilazio/hidroximetilazio aldaketak eragin ditzakeela baieztatu dezakegu, erlazionaturik dauden zenbait gene-erregulatzailen adierazpenarekin batera.



**2. irudia. Saguen organoetako metilazio eta hidroximetilazio maila globalak eta asoziaturiko gene-familien adierazpen mailaren neurketak.** Saguetako organo ezberdinetan neurturiko DNA-ren metilazio eta hidroximetilazio -maila globalak arretan (a) eta emectan (b) eta erregulazioan parte hartzen duten geneen adierazpen maila arretan (d) eta emectan (e). Aztertutako saguen organoak sei dira: testikulu/obarioak, gibela, pankrea, giltzurrunak, bihotza eta birikak, hurrenez hurren.

#### 4. Ondorioak

mESC zeluletan, morfinaeren tratamendu kronikoak, metilazio-mailaren jaitsiera eragiten du (1.a irudia; P1). Honek genomako gene kopuru zabalago bat adieraztea ekartzen du eta hau, zelularen pluripotentiaren emendio batekin erlazionatzen da (Aoki et al., 1997; Han et al., 2011). Ondorio hau, aurretik argitaratutako emaitzekin bat dator (Muñoa-Hoyos et al., 2020). Hortaz, pluripotentiaren emendioa ekartzen duen transkripzioaren igoera hau, morfinaeren ondoriozko H3K27me3 eraldaketak eta DNA-ren metilazioaren jaitsierak gidatzen duela esan dezakegu. Bestalde, morfinaeren tratamendu kronikoak DNA-ren metilazioaren bidez memoria epigenetikoak sortzen duela ere ondorioztatzen dugu (1.2 irudia; P1, P2 eta P3). Izan ere, 24 orduetara ikusten diren emaitzak bere horretan mantentzen ez badira ere, metilazio mailak eta gene-erregulatuzaileen adierazpenak desdoiturik jarraitzen dute denbora iragan ahala.

Bestalde, *in vivo* buruturiko morfinaeren tratamendu kronikoak, organo eta sistema biologiko ezberdinetan metilazio/hidroximetilazio aldaketa nabarmenak eragin ditzakeela frogatu dugu, prozesu horien gene-erregulatuzaileen adierazpena ere aldatuz. Aurkezturiko emaitza hauek ekarri dituzten ekarpenak garrantzitsuak dira oso. Lan hau orain arte egon diren ikerketen osagarria da, garunaren inguruan dagoen ezagutzari beste organoetan izan dezakeen eraginaren informazioa gehitzen duelako. Deskribatu ditugun morfinaeren eragin sistemikoak ondorio fisiologiko garrantzitsuak sortu ditzakete. Esaterako, zenbait ikerketek aditzera eman dutenez, morfina arazo kardiakoen eragile da (McCarthy et al., 2016) eta hori, guk deskribatutako bihotzeko metilazio mailaren igoerarekin erlazionatua egon daiteke. Hala ere, aldaketa epigenetiko hauen atzean egon daitezkeen mekanismo molekular eta erregulazio-prozesuak zeintzuk diren ezin izan dugu zehaztu. Lorturiko emaitzak mekanismo hauek ulertzeko interesgarriak badira ere, proba eta azterketa gehiago (proteinen presentzia, hauen aktibitate entzimatikoa, etab.) burutzea beharrezkoa da.

Amaitzeko, morfina metilazio eta hidroximetilazio mailan sortzen dituen efektuak sexuaren arabera erabat ezberdinak direla nabarmentzea ezinbestekoa egiten da. Ikus dezakegunez, morfina sortzen dituen aldaketa epigenetikoak sexuaren menpekoak dira eta hau bat dator beste ikerketa askok aipatzen dutenarekin (Pasternak, 1993; Cicero et al., 1996; Islam et al., 1993; Baamonde et al., 1989). Ezberdintasun hauen jatorria, bi sexuen artean  $\mu$  hartzaile-opioideak aurkezten duen barreiapen ezberdinean egon daiteke (Chakrabarti et al., 2012; Verzillo et al., 2014) eta hau, bi sexuen arteko dimorfismo sexualaren erakusgarria ere bada. Lorturiko emaitzek baieztatzen duten moduan, aldaketa hauek nabarmenagoak dira arretan emetan baino, arrek opioideekiko duten sentiberatasuna handiagoa delarik (Cicero et al., 1996; Islam et al., 1993; Baamonde et al., 1989; Kest et al., 2000). Sentikortasun handiago honen jatorria, arrek duten nozizeptzioaren ezaugarri nabariagoak edota bi sexuen artean dauden diferentzia hormonalak izan daitezke. Honen harira, aipatu beharra dago, metodologian zehar aldagai guztiak kontrolatzen eta estandarizatzen saiatu bagara ere, bien arteko egoera hormonalak ezberdina izaten jarraitzen duela, drogek izan ditzaketen efektuak ezberdinak direlarik. Beraz, gure emaitzak morfina sorturiko sexu menpeko efektuaren oinarriak ulertzeko baliagarriak izan daitezke eta gainera, bi sexuak independenteki aztertze beharra azpimarratzen dute, arren eta emeen artean efektu fisiologiko nabariak daudela berretsiz.

Azkenik, emaitzetan aipatu dugun moduan, morfinaeren tratamendu kronikoak bi ugaltze-organoeetan histonen metilazio aldaketa komunak aurkeztu dituzte. Honek morfina eragindako aldaketa epigenetikoek herentzia epigenetiko transgenerazionalen parte hartu dezaketela iradokitzen du. Izan ere, gametoetan ematen diren aldaketak heredatuak izateko aukera gehien duten hautagaiak dira.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan proposaturiko esperimientuen bidez, *in vitro* eta *in vivo* estrategiak erabili dira, morfinaeren tratamendu kronikoak eragiten dituen aldaketa epigenetikoak aztertze. Edonola ere, ikerturiko eraldaketa epigenetiko hauek maila global batean bakarrik aztertu dira. Baina egokia izango litzateke eraldaketa hauek modu zorrotzago batean aztertu ahal izatea, aldaketa espezifikoak identifikatuz, horietako bakoitzaren inplikazio zehatzagoa aztertuz eta era berean, gene-erregulatuzaile edo mekanismo berriak ikertuz. Hortaz, etorkizunerako planteatzen dugun pausua, modifikazio hauek nukleotido mailan antzemango dituen analisi bat gauzatzea da, *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS) teknika bidez. Teknika honek, jada identifikatu ditugun aldaketa globalak genomako zein puntutan ematen diren aztertze aukera eskainiko digu, oso informazio baliagarria eskainiz.

## 6. Erreferentziak

- Allis, C.D. eta Jenuwein, T. (2016), The molecular hallmarks of epigenetic control, *Nat. Rev. Genet.* 17(8), 487-500.
- Aoki, F., Worrada, D.M. eta Schultz, R.M. (1997), Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo, *Dev. Biol.* 181, 296–307.
- Baamonde, A.I., Hidalgo, A. eta Andrés-Trelles, F. (1989), Sex-related differences in the effects of morphine and stress on visceral pain, *Neuropharmacology* 28(9), 967-70.
- Baylin, S.B. eta Jones, P.A. (2016), Epigenetic Determinants of Cancer, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8, a019505.
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O.J. eta Macleod, D. (1985), A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA, *Cell* 40, 91–99.
- Browne, C.J., Godino, A., Sallery, M. eta Nestler, E.J. (2020), Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction, *Biol Psychiatry* 87, 22-33.
- Byrnes, J.J., Babb, J.A., Scanlan, V.F. eta Byrnes, E.M. (2011), Adolescent opioid exposure in female rats: transgenerational effects on morphine analgesia and anxiety-like behavior in adult offspring, *Behav. Brain Res.* 218(1), 200-205.
- Chakrabarti, S., Liu, N.J., Zadina, J.E., Sharma, T. eta Gintzler, A.R. (2012), Pleiotropic opioid regulation of spinal endomorphin 2 release and its adaptations to opioid withdrawal are sexually dimorphic, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 340(1), 56-63.
- Cicero, T.J., Nock, B. eta Meyer, E.R. (1996), Gender-related differences in the antinociceptive properties of morphine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279(2), 767-73.
- Crain, S.M. eta Shen, K.F. (1995), Ultra-low concentrations of naloxone selectively antagonize excitatory effects of morphine on sensory neurons, thereby increasing its antinociceptive potency and attenuating tolerance/dependence during chronic cotreatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(23), 10540-10544.
- 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.
- Gapp, K., Jawaid, A., Sarkies, P., et al. (2014), Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice, *Nat. Neurosci.* 17(5), 667-669.
- Gardiner-Garden, M. eta Frommer, M. (1987), CpG Islands in vertebrate genomes, *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.
- Gowher, H. eta Jeltsch, A. (2001), Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites, *J. Mol. Biol.* 309(5), 1201-8.
- Han, H. et al. (2011), DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter, *Hum. Mol. Genet.* 20, 4299–4310.
- Hendrich, B., Guy, J., Ramsahoye, B., Wilson, V.A. eta Bird, A. (2001), Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in mouse development, *Genes Dev.* 15(6), 710-23.
- Islam, A.K., Cooper, M.L. eta Bodnar, R.J. (1993), Interactions among aging, gender, and gonadectomy effects upon morphine antinociception in rats, *Physiol. Behav.* 54(1), 45-53.
- Ito, S., D'Alessio, A.C., Taranova, O.V., Hong, K., Sowers, L.C. eta Zhang, Y. (2010), Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification, *Nature* 466(7310), 1129-33.
- Jaenisch, R. eta Bird, A. (2003), Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat. Genet. Mar.* 33 Suppl., 245-254.
- Johnson, N.L., Carini, L., Schenk, M.E., et al. (2011), Adolescent opiate exposure in the female rat induces subtle alterations in maternal care and transgenerational effects on play behaviour, *Front. Psychiatry* 2, 29.
- 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.



- Kest, B., Palmese, C. eta Hopkins, E. (2000), A comparison of morphine analgesic tolerance in male and female mice, *Brain Res.* 879(1-2), 17-22.
- Kiefer, J.C. (2007), Epigenetics in development, *Dev. Dyn.* 236, 1144-1156.
- Lande-Diner, L. eta Cedar, H. (2005), Silence of the genes--mechanisms of long-term repression, *Nat. Rev. Genet.* 6, 648-654.
- Leitch, H.G., McEwen, K.R., Turp, A., et al. (2013), Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 311–316.
- 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.
- McCarthy, C.P., Mullins, K.V., Sidhu, S.S., Schulman, S.P. eta McEvoy, J.W. (2016), The on- and off-target effects of morphine in acute coronary syndrome: A narrative review, *Am. Heart J.* 176, 114-21.
- 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.
- Muñoa-Hoyos, I., Halsall, J.A., Araolaza, M. et al. (2020), Morphine leads to global genome changes in H3K27me3 levels via a Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) self-regulatory mechanism in mESCs, *Clin. Epigenet.* 12, 170.
- Ng, S.B., Bigham, A.W., Buckingham, K.J., et al. (2010), Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet.* 42, 790–793.
- Okano, M., Xie, S. eta Li, E. (1998), Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases, *Nat. Genet.* 19, 219-220.
- Pasternak, G.W. (1993), Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin. Neuropharmacol.* 16(1), 1-18.
- Smith, Z.D., Chan, M.M., Mikkelsen, T.S., et al. (2012), A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo, *Nature* 484, 339–344.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., et al. (2009), Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science* 324, 930-935.
- Vassoler, F.M., Byrnes, E.M. eta Pierce, R.C. (2014)a, The impact of exposure to addictive drugs on future generations: Physiological and behavioral effects, *Neuropharmacology* 76(Pt B), 269–275.
- Verzillo, V., Madia, P.A., Liu, N.J., Chakrabarti, S. eta Gintzler, A.R. (2014), Mu-opioid receptor splice variants: sex-dependent regulation by chronic morphine, *J. Neurochem.* 130(6), 790-796.
- Wade, P.A. (2001)a, Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation, *Oncogene* 20, 3166-3173.
- Waisman, A., Sevlever, F., Elías Costa, M., et al. (2019), Cell cycle dynamics of mouse embryonic stem cells in the ground state and during transition to formative pluripotency, *Sci. Rep.* 9, 8051.
- Whitelaw, N.C. eta Whitelaw, E. (2006), How lifetimes shape epigenotype within and across generations, *Hum. Mol. Genet.* 15(2), 131-7.
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D.D., Lay, F.D., Jones, P.A. eta Liang, G. (2014), Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer, *Cancer Cell* 26, 577-90.
- 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.

## 7. Eskerrak eta oharrak

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 Analisisirako Zerbitzu Zentralaren laguntzaz burutu dugu.