



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a  
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

### OSASUN ZIENTZIAK

**Morfinak hipometilazio globala eragiten du mES zeluletan autoerregulazioa daukan demetilazio aktibo baten bidez**

*Manu Araolaza Lasa,  
Iraia Muñoa Hoyos,  
Ainize Odriozola Larrañaga,  
Irene Calzado Lopez,  
Malen Zabala Goikoetxea  
eta Nerea Subiran Ciudad*

167-174 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.04.21>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



## Morfinak hipometilazio globala eragiten du mES zeluletan autoerregulazioa daukan demetilazio aktibo baten bidez

Manu Araolaza, Iraia Muñoa-Hoyos, Ainize Odriozola, Irune Calzado, Malen Zabala, Nerea Subirán

*Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko Fisiologia Departamentua (UPV/EHU)*

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

### Laburpena

Ingurumen-faktoreek osasun-arazoak edota gaixotasunak sortzen dituzte, baina hori nola ematen den ezezaguna da. Orain arteko ikerketa gehienek adierazi dutenez, eraldaketa epigenetikoek funtzio gakoa bete dezakete prozesu horretan, bien arteko lotura puntua izanik. Morfinak, esaterako, plazenta-hesia modu erraz batean zeharkatu dezake, eta, ondorioz, enbrioiaren ohiko garapenean nabarmen eragiten du; hodi neurala, kortex frontala eta bizkarrezur-muinaren garapenak ukituta geratzen dira, nerbio-sistemaren garapen egokia oztopatuz. Hortaz, DNAREN metilazioa enbrioi-garapenean giltzarri den eraldaketa epigenetikoa dela aintzat hartuz, metilazioak morfinaren presentzian izan dezakeen eginkizuna argitzea da gure helburua nagusia, eta horretarako azken belaunaldiko teknikez baliatu gara.

Hitz gakoak: morfina, garapena, hipometilazio globala, autoerregulazio-mekanismoa.

### Abstract

*Environmental factors cause health problems and/or disease, but how it occurs is unknown. Most of the research carried out so far has indicated that epigenetic transformations can play a key role in this process, being the point of connection between both. Morphine, for example, can easily cross the placenta, which significantly affects the normal development of the embryo, affecting the development of the neural tube, frontal cortex and spinal cord, making it difficult for the proper development of the nervous system. Therefore, considering that DNA methylation is a key epigenetic transformation in embryonic development, our objective is to clarify the role that methylation can play in the presence of morphine, for which we have resorted to state-of-the-art techniques.*

*Keywords: morphine, development, global hypomethylation, self-regulation mechanism.*

### 1. Sarrera

Gaur egun, ingurumen-faktoreek gure osasunean eragin dezaketela ezaguna bada ere, bertan parte hartzen duten azpimekanismoen inguruan dagoen ezagutza oso txikia. Hori dela eta, biomedikuntzak duen erronka garrantzitsuenetako bat lotura horretan sakontzea da. Faktore horiek sor ditzaketen gaixotasunen artean nahaste autoimmuneak, neurogarapen-sindromeak, gaixotasun kardiobaskularrak eta tumore gehienak topatzen dira (Moosavi eta Ardekani, 2016). Jaio aurreko garapen-prozesua oso sentikorra da morfina bezalako substantzia kimikoekiko, toxikoekiko eta estresarekiko, eta horrek ingurumen-faktoreek enbrioi-garapenean arazoak eragin ditzaketela adierazten du (Ko, Hwang eta Choi, 2019).

Zenbait ikerketak frogatu dutenez morfinak erraz zeharkatu dezake plazenta-hesia, eta, ondorioz, enbrioiara iritsi (Kazemi et al., 2011; Levitt, et al., 1998). Morfina oso analgesiko ahaltzua da, eta gaur egungo osasun-sisteman haren erabilera oso ohikoa da, nahiz eta albo-ondorio fisiologiko ugari izan. Morfinak dituen albo-ondorio horiek aski ezagunak dira

(Nakatani, 2017), eta harrek dituen efektu kaltegarrien artean garrantzitsuena garapen neuronal normalean sortzen duen atzerapena da. Ikerketa ezberdinek frogatu dutenez, garapen prozesuan eratzten diren organoek pisu nabarmenki baxuagoa izaten dute. Arratoietan, esaterako, burmuinari, giltzurrunari eta gibelari eragiten die (Eriksson eta Ronnback, 1989), eta gainera, atzerapen esanguratsuak eragiten ditu nerbio-sisteman (Niknam et al., 2013). Gainera, umetokia morfinaren eraginpean egoteak alterazioak eragiten ditu ondorengoetan, antsietate moduko portaerak, analgesiaren tolerantzia, plastikotasun sinaptikoa eta egitura neuronalean aldaketak eraginez (Gapp et al, 2014; Byrnes et al., 2011). Hala ere, morfinak enbrioari nola eragiten dion ez da guztiz ezagutzen.

DNAREN metilazioa geneen adierazpena arautzeko gaitasuna izan dezakeen marka epigenetiko garrantzitsua da. DNAREN metilazioa zitosina-hondakinetan ematen da nagusiki, eta hori DNA metiltransferasen (DNMT) bidez katalizatzen da. Metiltransferasa horiek S-adenosil metionina taldea zitosina-hondakinetako 5. karbonora transferitzen dute, 5-metilzitosina (5mC) hondarra sortuz (Guo et al., 2015). Prozesu horretan sortzen den lotura, lotura kobalentea da, eta, ondorioz, marka erresistentetzat jotzen da. Eraldaketa horren mantenua DNMT1 entzimaren bidez gauzatzen da, eta *de novo* metilazioa, aldiz, DNMT3A eta DNMT3B metiltransferasen bidez (Li et al., 1992). Aipatu dugun moduan, metilazioa bizitza luzeko marka epigenetikotzat jotzen da. Hala ere, metilazio-patroiaren mantenua bermatuta ez badago (DNMT1 entzimaren absentiarengatik, esaterako) erreplikazio zikloetan zehar metilazio patroien galera pasiboa ematen da. Horrez gain, DNAREN demetilazio prozesua entzima jakinen bidez modu aktibo batean ere gertatu daiteke, eta hortaz arduratzen diren entzimak *ten-eleven translocation* (TET) bezala ezagutzen dira; TET1, TET2 eta TET3. Proteina horiek oxigenasa gisa funtzionatzen dute metilzitosina hidroximetilzitosina-hondarrean bilakatuz, eta, ondorioz, DNAREN demetilazio prozesuko lehen hondarra/bitartekaria sortuz (Ito et al., 2011).

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure ikerketa taldeak berriki deskribatu duenez, morfinaren tratamendu kronikoak H3K27me3 histonaren eraldaketak gidatutako asaldura transkripzionalak sortzen ditu saguetako ama-zelula enbrionarioetan (mES zelulak) (Muñoa-Hoyos et al., 2020). Emaitza horrek, aldaketa epigenetikoek enbrioaren garapen prozesuan eragin nabarmena izan dezaketela adierazten du. Hala ere, DNAREN metilazioak (beste aldaketa epigenetiko garrantzitsu bat) prozesu horretan duen eraginaren inguruan ez da gauza askorik ezagutzen. Literatura zientifikoa aztertuz gero, gaiaren inguruko informazio gehiena morfinak garuneko eremu espezifikotan sortzen dituen erregulazio-epigenetikoetan zentratu da, morfinaren erabilpena tolerantziarekin, menpekotasunarekin eta nahasmen psikiatrikoekin erlazionatuz (Browne et al 2020; Maze eta Nestler 2011). Gorputzeko beste organo eta aparatuetan zer gertatzen den, berriz, ez da ezagutzen. Horrenbestez, lan honen helburu nagusia morfinaren tratamendu kronikoak eragiten dituen aldaketa epigenetikoak aztertzea da, garapen prozesuan zehar morfinak eragiten dituen azpimekanismoekiko ezagutza handituz.

## 3. Ikerketaren muina

### 3.1. Metodologia

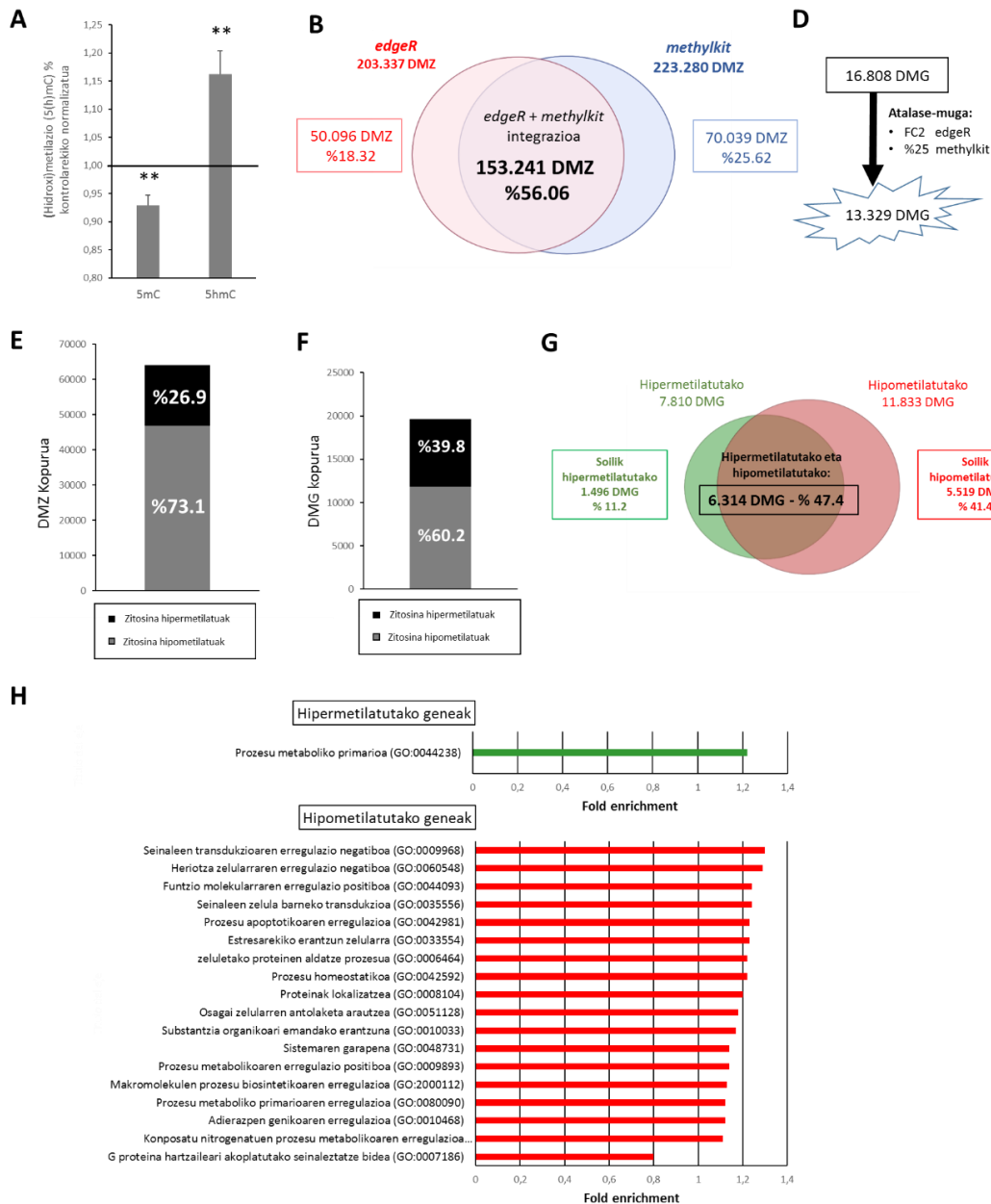
DNAREN metilazioak garapen prozesuan zehar eta morfinaren presentzian jasan ditzakeen gorabeherak aztertzeko saguen blastozistoetatik eratorritako ama zelulak erabili genituen (mES zelulak); eredu egokiak baitira enbrioaren garapen prozesu goiztiarra simulatzeko. Aukeratu genituen mES zelulak, zehazki, ES Oct-4+ zelula komertzialak izan ziren. Zelula horiei morfinaren (10  $\mu$ M) 24 orduko tratamendu kronikoa gauzatu zitzaion. Genomako metilazio- (5mC) eta hidroximetilazio- (5hmC) maila globalak neurtzeko Kromatografia Likidora akoplaturiko Masa Espektometria (LC-MS/MS) teknika erabili zen, N=5-eko laginekin.

Lorturiko datuak ehunekotan adierazi ditugu; neurtutako 5mC eta 5hmC hondakinen kopuruak zitosen (C) kopuru totalarekin zatitu ziren. *WGBS* (*Whole Genome Bisulfite Sequencing*) teknikaren bidez, genoma osoko zitosina guztien metilazio maila aztertu zen, banan-banan eta modu masiboan. Prozesu esperimental hori Bartzelonako CRG (Centro de Regulación Genómica) zentroarekin lankidetzan gauzatu genuen. Lortutako datu-gordinen analisi bioinformatikoa *Bismarck* programaren bidez burutu genuen, eta analisi estatistikoa, berriz, *edgeR* eta *MethylKit* programen bidez, uneoro kalitate-analisiak burutuz. Datuen integrazioa *Venny* erreminta informatikoaren bidez gauzatu genuen. Gure intereseko geneen inguruko ontologia analisia, aldiz, *Gene Ontology* tresna informatikoaren bidez gauzatu genuen. Intereseko geneen paisaia eskuratzeko *UCSC Genome Browser* zerbitzu informatikoaz baliatu ginen, bertan *WGBS* eta *RNAseq* tekniken bidez eskuraturiko eta trataturiko datuak elkartu genituen. Geneen adierazpen maila balioztatzeko, ostera, Polimerasaren Kate-Erreakzio kuantitatiboa Denbora Errealean (*RT-qPCR*) teknika erabili zen, N=3-ko laginekin. Horretarako, hasle espezifikoak (ingelesezko *primer*) erabili ziren, eta datuen normalizazioa burutzeko erreferentzia gene egonkorrenak aukeratu ziren (ingelesezko *housekeeping*). Lorturiko geneen adierazpenen kuantifikazio erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodoaren bidez aurkeztu ditugu. Azkenik, esperimentu horien bidez lortutako emaitzen analisi estatistikoa *Student*-en T proba (ingelesezko *Student's t-test*) erreminta bidez gauzatu genuen, emaitzen adierazgarritasun-maila hiru mailatan bereiziz: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0,01$  eta \*\*\* $p < 0,001$ .

### 3.2. Morfinarekin egindako tratamendu kronikoak hipometilazio globalaren egoera eragiten du OCT4 ES zeluletan

Lehenik eta behin, 24 orduko morfina-tratamendu kronikoak ES-OCT4 zeluletan epigenetikari dagokionez eragiten dituen aldaketak aztertu nahi izan genituen (hau da, metilazioa eta hidroximetilazioa). Masa-espektrometriak (*LC-MS/MS*) erakutsi zuenez, morfina mES zelulek duten metilazio- eta hidroximetilazio- maila globalei eragiten die; Metilazioa maila globalak murriztu egin ziren morfinarekin tratatuak izan ziren mES zeluletan, eta hidroximetilazio maila globalak, berriz, handitu (1.A. irudia). Emaitza horiek elkarlotuak daude; hidroximetilzitosinen igoera demetilazio prozesu aktiboarekin eta metilazio-mailen jaitsiera globalarekin erlazionatua baitago. Hidroximetilzitosina, demetilazio prozesu aktiboan sortzen den lehen hondarra da, demetilazio prozesua une horretan ematen ari dela adierazten duelarik. Emaitza horiek zehaztasun handiagoz aztertzeke, metilazio-aldaketa horiek *WGBS* bidez neurtu genituen. Bi tresna estatistiko independente horien (*edgeR* eta *MethylKit*) bidez identifikatu genituen zitosina metilatu amankomunak 153.241 izan ziren (DMZ; diferentzialki metilatutako zitosenak); hau da, kontrola eta morfinarekin tratatuak izan ziren laginen artean metilazio aldaketa bera aurkeztu zuten zitosina kopurua (1.B. irudia). Zitosina kopuru hori bi tresna estatistikoek identifikatu zituzten metilazio-aldaketa guztien %56-a da (1.B. irudia), eta ehuneko hori %90-era handitzen da geneen inguruan hitz egiten badugu (DMG; diferentzialki metilatutako geneak). Hortaz, masa-espektrometriak eta *WGBS* teknikak azalarazi zituzten emaitzak bat datoz, orain arteko emaitzak berretsita geratuz; hipometilazio orokorraren hazkundera.

*WGBSeq* teknikaren bidez eskuraturiko datu kopuru altua aintzat hartzen badugu, haren analisia oso korapilatsua dela ikusi dezakegu. Hortaz, datu kopurua murriztu, eta gainera haien adierazgarritasun maila handitzeko helburuarekin atalase-muga zorrotzagoak ezarri genituen (1.D. irudia). Ondorioz, 153.241 DMZ izatetik 13.329 DMZ izatera iragan ginen, kasurik adierazgarrienak aukeratuz; morfinarekiko sentikortasun handienak aurkezten dituzten zitosina-hondarrak. Jarraian, morfinarengatik eraginda topatzen diren geneak aztertzerira iragan ginen (1.H. irudia). Soilik hipermetilatuta topatu genituen geneen analisi ontologikoak gene horiek metabolismoarekin erlazionatuak zeudela azalarazi zuen. Metabolismoarekin erlazionatuak dauden gene horiek hipermetilatuta egotea bereziki interesgarria da; zitosina horiek demetilazio globaletik babestuta egoteaz gain, metilazio-maila are handiagoa erakusten dute. Beraz, morfina eragindako erantzun zelular eta fisiologikoan metabolismoa klabea izan daiteke, inongo zalantzarik gabe. Soilik hipometilatuta dauden geneei dagokienez, berriz, identifikatutako ziren funtzio biologikoak oso ezberdinak izan ziren.

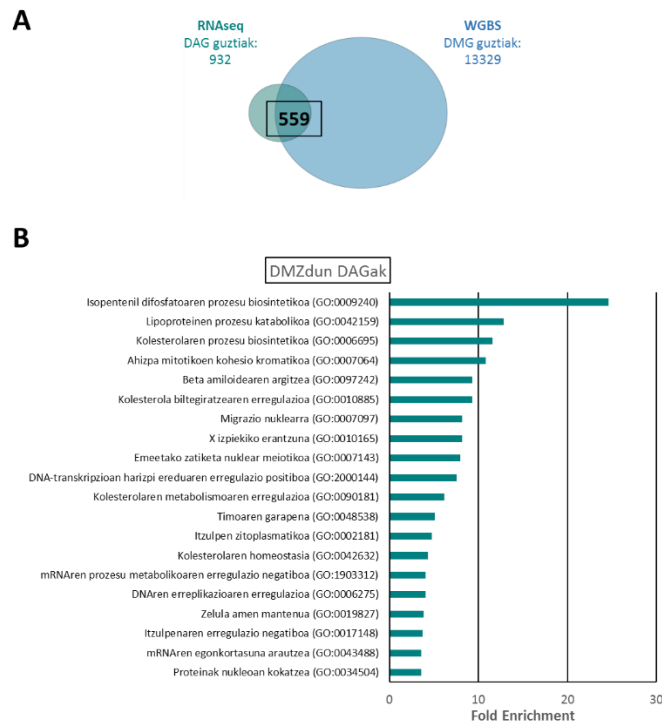


**1. irudia. Morfinaren eragina mES zeluletan DNAREN metilazioari dagokionez.** (A) Metilazio eta hidroximetilazio maila globalak neurtzeko gauzatutako LC-MS/MS teknika; (B) *edgeR* eta *methylkit* erreminta estatistikoen bidez eskuratutako WGBS datuen integrazioa; (D) Emaizten adierazgarritasuna handitzeko DMZ-ei ezarritako atalase mugak; (E) Identifikatutako DMZ kopurua; (F) Identifikatutako DMG kopurua; (G) Metilazioa aldatetako geneen karakterizazioa; eta (H), metilazioari dagokionez aldatetaren bat aurkeztu duten geneen ontologia analisia.

### 3.3. Morfinak mES zeluletan eragindako metilazio aldatetako geneen eragin erreala-aren identifikazioa orain arteko WGBS datuak RNAseq datuekin integratuz

Ondoren, morfinak sortutako aldaketa epigenetikoaren ondorio erreala aztertzeko asmoz eskuetan genituen emaitzak RNAseq datuekin aloratu genituen; transkripzio-mailan emandako aldaketa guztiak neurtzen dituen teknika. DNAREN metilazioak geneen adierazpena erregulatzeko ahalmena duenez, alde aurretik identifikatu genituen metilazio aldatetako geneen transkripzioa bait zituzten behatu nahi izan genuen. Ikerketa honetan erabilitako RNAseq datuak gure ikerketa-taldeak eskuratu zituen alde aurretik, eta bertan jarraitutako prozesu

esperimentalara bera izan zen (Geo: GSE151234). Datu horien integrazioak morfinarekiko sentikorrak diren 559 gene azaleratu zituen, bai metilazioari dagokionez bai transkripzioari dagokionez (2.A. irudia). Jarraian, morfinak erasandako gene horien funtzio biologikoak aztertzeraz iragan ginen, eta prozesu horretan mES zelulentzat funtzio kritikoa den “zelula-amen mantentze funtzioa” morfinarekiko sentikorra dela behatu genuen (2.B. irudia). Horrez gain, aipatzekoa da funtzio hori betetzen duten geneen artean *Tet1* genea topatu genuela; Gene horrek funtzio gakoa betetzen du metilazio-mailen erregulazioan, eta hori guztiz erlasionaturik dago ama zelulen mantentze prozesuarekin. Ordurarte bildutako emaitzek *Tet1* geneak morfinarekiko duen sentikortasuna hasieran antzeman genuen hipometilazio-egoera globalarekin eta ustezko demetilazio aktiboarekin zuzenean erlasionaturik egon daitekeela ondorioztatzera eramantzen gintuen.



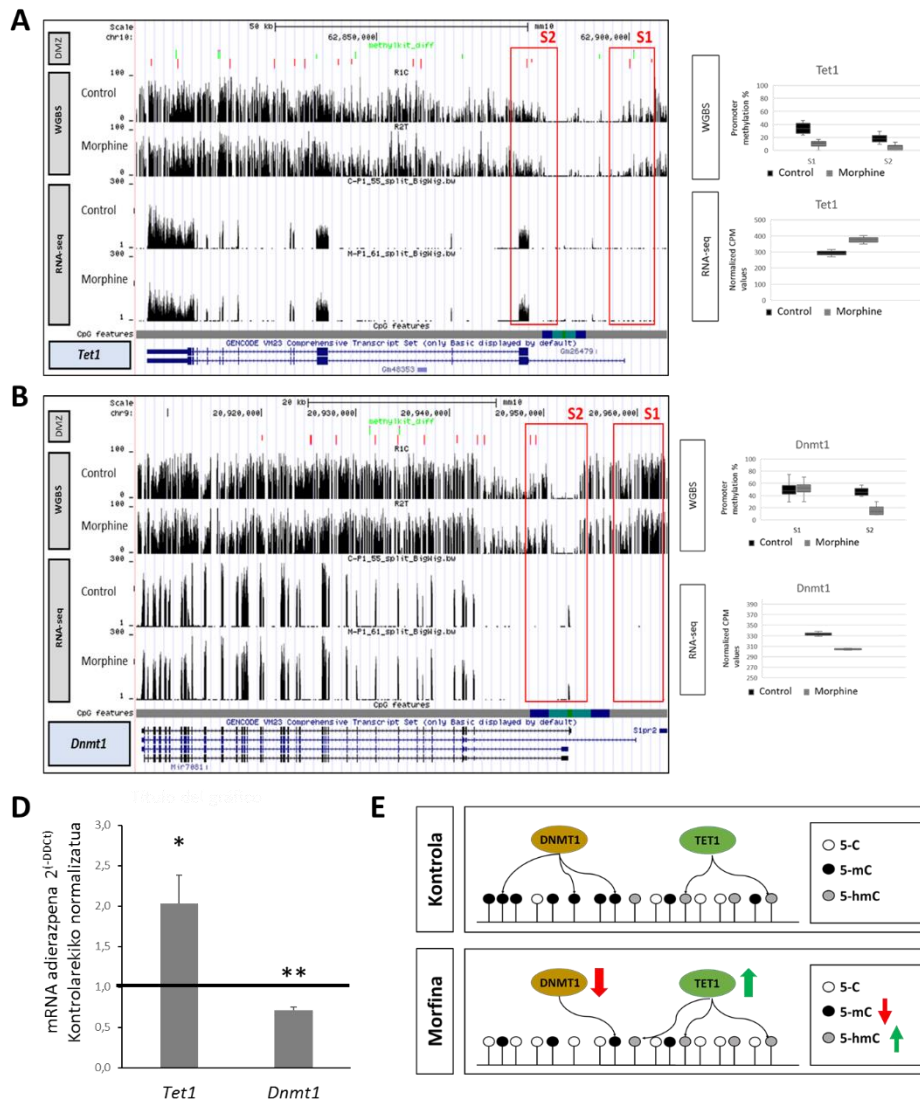
**2. irudia. Morfinak metilazioaren bidez mES zeluletan sortzen duen eragin erreala.** (A) *RNAseq* eta *WGBS* tekniken bidez eskuratutako datuen integrazio-analisia *Venny* erremintaren bidez; (B) Metilazioari eta adierazpen-transkripzionalari dagokionez aldaketa adierazgarri bat jasan duten 559 geneekin burututako ontologia analisia.

### 3.4. Morfinak handitu egiten du *Tet1* genearen adierazpena haren eskualde sustatzailean sortutako hipometilazioaren bidez, autoerregulazio-mekanismo positibo bat gauzatuz.

Amaitzeko, hurrengo pausua metilazio-mailak arautzen dituzten gene gakoak modu sakonago batean aztertzea izan zen. Analisi transkriptomikoaren arabera, *Dnmt1* mantentze-metilazaren adierazpena txikitu egin zen morfinaren ondorioz (3.B. irudia), eta *Tet1* demetilazaren adierazpena, berriz, handitu (3.A. irudia). *RNAseq* analisitik eskuratutako datu horiek *RT-qPCR* teknikaren bidez balioztatu genituen (3.D. irudia). *Dnmt1* genearen transkripzio jaitsierak eragin negatiboa izaten du metilazio-mailei dagokionez, eta, ondorioz, demetilazio-prozesu pasiboa martxan jartzen da. Aitzitik, demetilazio aktiboan parte hartzen duen geneak (*Tet1* esaterako) adierazpen handiagoa izateak nabarmen handitzen du hipometilazio globalaren igoera edota metilazio mailen jaitsiera globala. Beraz, emaitza horiek guztiz bat datoz orain arte lortutako emaitzekin.

Lanarekin amaitu baino lehen, azken pausua gene horiek euren eremu sustatzailean duten metilazio-mailak aztertzea izan zen. *Dnmt1* geneak ez zuen inongo aldaketa nabarmenik jasan

morfina ren presentzia n (3.B. irudia). *Tet1* genearen kasuan, aldiz, morfina k haren adierazpena erregulatzeko ahalmena izan dezakeen demetilazio prozesua gauzatzen du haren bi eremu sustatzaileetan, gune hori hipometilatuta utzirik (3.A. irudia). Dagoeneko aipatu dugun moduan, *RNASeq* eta *qRT-PCR* analisisiek, morfina ren presentzia n *Dnmt1* genearen adierazpena jaitasi eta *Tet1* genearen adierazpena handitu egiten dela frogatu zuten. Hortaz, *Tet1* genearen gune sustatzailean topatu genuen metilazio aldaketa zuzenean erlazio naturik egon daiteke haren adierazpenak jasandako aldaketarekin. Tet1 entzima demetilazioa bultzatzeko gaitasuna duela kontuan hartzen badugu, TET1 entzima haren genearen eremu sustatzaileko metilazio mailak jaisten egon daiteke, haren adierazpena handituz, eta, ondorioz, demetilazio prozesua bultzatuz, azteraelikadura positiboa aurkezten duen autoerregulazio mekanismo bat bultzatuz.



**3. irudia. Morfina ren eragina metilazioaren presentzia arautzen duten bi gene gakoek gain.** (A) *Tet1* genearen paisaiaren azterketa UCSC Genome Browser erreminta informatikoaren bidez; (B) *Dnmt1* genearen paisaiaren azterketa UCSC Genome Browser erreminta informatikoaren bidez; (D) *RNAseq* datuen balioztatzea *RT-qPCR* teknikaren bidez; (E) Morfina ren eragin molekularra irudikatzen duen irudi eskematikoa.

#### 4. Ondorioak

*LC-MS/MS* teknikarekin behatu dugunez, morfina ren tratamenduak hidroximetilzitosinen mailak modu adierazgarrian igotzen ditu. 5hmC hondarraren presentzia oso iragankorra denez,

morfinaren ondorioz mES zeluletan egoera are hipometilatuagoa sortzen duen mekanismo nagusia demetilazio-prozesua aktiboa da. Honen inguruan burututako ikerketa gehienak soilik DNAREN metilazioan zentratu direnez (DNAREN hidroximetilazioa kontuan hartu gabe), gure emaitzek orain arte kontuan hartu izan ez den informazio berria plazaratzen dute, informazio osagarria izanik.

Morfinak mES zeluletan eragiten duen DNA metilatuaren mailen jaitsierak eta hidroximetilazioaren igoerak inplikazio handia izan dezake enbrioaren garapen prozesuan, zelulen eta ehun guztien diferentziazioa edota garapena kaltetuz, eta, ondorioz, garapenean atzerapenak ekarri. Izan ere, sistema nerbiosoko zelulen desberdintze prozesuan morfinak duen eragina aztertzerakoan, adibidez, diferentziazio prozesu hori atzeratua geratzen dela behatu da (Jimenez-Gonzalez et al., 2018), eta hori bat dator gure emaitzarekin; morfinak zelulen pluripotentzia mantentzen du hipometilazioa induzituz. Enbrioaren garapeneko azken faseetan erutzen diren ehun nerbioso ezberdinetan, esaterako, morfinak arazoak eragiten ditu ehunaren garapen egokia oztopatuz (Niknam et al., 2013; Nasiraei-Moghadam et al., 2005).

Morfinak *Dnmt1* genearen adierazpena gutxitzea ekartzen du, entzimaren presentzia jaitsiz, eta, ondorioz, DNA metilatuaren mantentze lanak kolokan jarri (Wang et al., 2009; Chen & Riggs, 2011; He et al., 2017). Oxikodonarekin garunean burututako zenbait esperimenterik aditza eman dutenez, opioide horren erabilerak DNMT1 entzimaren azpierreulazioak bultzatutako egoera hipometilatu-orokorra sortzen du (Fan et al., 2021; Fan et al., 2019), eta hori gure emaitzekin bat dator. Mekanismo pasiboa garrantzitsu bada ere, demetilazio prozesuan mekanismo aktiboei duten eragina are garrantzitsuagoa da; demetilazio prozesu hori askoz bizkorrago ematen da, eta hori TET entzimen bidez gauzatzen da. Gure emaitzen arabera, TET1 demetilasa da morfinaren presentzian mES zeluletan prozesu aktibo hori gauzatzen duen hautagai nagusia; morfinak *Tet1* genearen adierazpen-igoera ekartzen du entzimaren presentzia handituz. Hori dela eta, metilazio mailak nabarmenki jaisten dira, eta genomako hidroximetilazio-maila globalak nabarmenki igotzen dira (Iyer et al., 2009; Tahiliani et al., 2009; Ito et al., 2010; Pastor et al., 2013; Wu & Zhang, 2017). Edonola ere, gure emaitza adierazgarrietako bat morfinak *Tet1* genearen adierazpena doitzeko autoerregulazio mekanismo bat duela da. TET1 entzimak haren genearen eremu sustatzaileko metilazio maila modulatu adierazpena autoerregulatzeko gai dela baieztatu duen ikerketak (Sun et al., 2013) gure emaitzak berresten ditu, gure hipotesia baieztatuz.

Horrenbestez, morfinaren tratamendu kronikoak genomaren estatus epigenetikoak aldatzen du, mES zelulen bereizgarria den genomaren egoera hipometilatu globala are gehiago emendatuz, eta horren atzean TET1 entzimak gauzatutako DNAREN demetilazio aktiboa dago. Gainera, demetilasa horren adierazpena emendatzen duen mekanismo nagusia, entzima berak duen atzeraelikadura positiboko autoerregulazio mekanismoa da. Edozein kasutan, mekanismo nagusia demetilazio aktibo hori dela azpimarratzen badugu ere, demetilazio pasiboa ere ematen da, eta horrek metilazio-maila globalen jaitsiera are gehiago indartzen du.

## 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunean gure ikerketa bidearekin jarraitzeko, modu sakonago batean aztertu nahi dugu WGBS eta RNAseq sekuentziazio tekniken bidez eskuraturiko datuak; izan ere, eskuetan dugun informazio maila oso handia da, eta datuak aztertzeko dauden aukerak ugariak dira oso. Horrez gain, gure ikerketa taldeak geneen adierazpena arautzeko gaitasun handia daukan H3K27me3 eraldaketa epigenetikoak morfinaren presentzian izandako aldaketen inguruko informazioa ere badu. Horregatik, gure hurrengo helburu nagusia datu guzti horiek elkartzea da.

## 6. Erreferentziak

Browne CJ, Godino A, Salery M, Nestler EJ. Epigenetic Mechanisms of Opioid Addiction. *Biol Psychiatry*. 87(1), 22-33 (2020).



- Byrnes JJ, Babb JA, Scanlan VF, Byrnes EM. 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 (2011).
- Chen Z eta Riggs AD. DNA Methylation and Demethylation in Mammals. *J. Biol. Chem.* 286, 18347–18353 (2011).
- Eriksson PS, Ronnback L. Effects of prenatal morphine treatment of rats on mortality, bodyweight and analgesic response in the offspring. *Drug Alcohol Depend.*, 24(3):187–94 (1989).
- Fan XY, Shi G, He XJ, Li XY, Wan YX, Jian LY. Oxytocin prevents cue-induced reinstatement of oxycodone seeking: Involvement of DNA methylation in the hippocampus. *Addict Biol.* 26(6), e13025 (2021).
- Fan XY, Shi G, Zhao P. Reversal of oxycodone conditioned place preference by oxytocin: Promoting global DNA methylation in the hippocampus. *Neuropharmacology.* 160, 107778 (2019).
- Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, et al. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. *Nat. Neurosci.* 17(5), 667-669 (2014).
- Guo X, Wang L, Li J, Ding Z, et al. Structural insight into autoinhibition and histone H3-induced activation of DNMT3A. *Nature* 517, 640-644 (2015).
- He S, Sun H, Lin L, Zhang Y, Chen J, Liang L, Li Y, Zhang M, Yang X, Wang X, Wang F, Zhu F, Chen J, Pei D, Zheng H. Passive DNA demethylation preferentially up-regulates pluripotency-related genes and facilitates the generation of induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem.* 292(45), 18542-18555 (2017).
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.* 466(7310), 1129-33 (2010).
- Ito S, Shen L, Dai Q, et al. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. *Science* 333, 1300–1303 (2011).
- Iyer LM, Tahiliani M, Rao A, Aravind L. Prediction of novel families of enzymes involved in oxidative and other complex modifications of bases in nucleic acids. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1698–1710 (2009).
- Jimenez-Gonzalez A, García-Concejo A, León-Lobera F, Rodriguez RE. Morphine delays neural stem cells differentiation by facilitating Nestin overexpression. *Biochim Biophys Acta Gen Subj. Mar;*1862(3):474-484 (2018).
- Kazemi M, Sahraei H, Azarnia M, Dehghani L, Bahadoran H, Tekieh E. The effect of morphine consumption on plasma corticosteron concentration and placenta development in pregnant rats. *Iran J Reprod Med.* 9(2):71–6 (2011).
- Ko EB, Hwang KA, Choi KC. Prenatal toxicity of the environmental pollutants on neuronal and cardiac development derived from embryonic stem cells. *Reprod Toxicol.* 90, 15-23 (2019).
- Levitt P. Prenatal effects of drugs of abuse on brain development. *Drug Alcohol Depend.* 51(1-2), 109-25 (1998).
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell.* 69(6), 915-26 (1992).
- Maze I, et al. Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3035-3040 (2011).
- Moosavi A eta Ardekani A. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran. Biomed. J.* 20, 246-258 (2016).
- Muñoz-Hoyos I, Halsall JA, Araolaza M, Ward C, Garcia I, Urizar-Arenaza I, Gianzo M, Garcia P, Turner B, Subirán N. Morphine leads to global genome changes in H3K27me3 levels via a Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) self-regulatory mechanism in mESCs. *Clin Epigenetics.* 12(1), 170 (2020).
- Nakatani T. Opioid therapy and management of side effects associated with opioids. *Gan To Kagaku Ryoho* 44 (4), 294–297 (2017).
- Nasiraei-Moghadam S, Sahraei H, Bahadoran H, Sadooghi M, Salimi SH, Kaka GR, Imani H, Mahdavi-Nasab H, Dashtnavard H. Effects of maternal oral morphine consumption on neural tube development in Wistar rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 159(1), 12-7 (2005).
- Niknam NA, Azarnia M, Bahadoran H, Kazemi M, Tekieh E, Ranjbaran M, Sahraei H. Evaluating the effects of oral morphine on embryonic development of cerebellum in wistar rats. *Basic Clin Neurosci. Spring.* 4(2), 130-5 (2013).
- Niknam NA, Azarnia M, Bahadoran H, Kazemi M, Tekieh E, Ranjbaran M, Sahraei H. Evaluating the effects of oral morphine on embryonic development of cerebellum in wistar rats. *Basic Clin Neurosci.*, 4(2):130–5 (2013).
- Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 341–356 (2013).
- Sun M, Song CX, Huang H, Frankenberger CA, Sankarasharma D, Gomes S, Chen P, Chen J, Chada KK, He C, Rosner MR. HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(24), 9920-5 (2013).
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5- hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935 (2009).
- Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, Su H, Sun W, Chang H, Xu G, Gaudet F, Li E, Chen T. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet.* 41(1), 125-9 (2009).
- Wu X eta Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet.* 18(9), 517-534 (2017).

## 7. Eskerrak eta oharrak

Manu Araolazak Euskal Herriko Unibertsitatearen (UPV/EHU) burutu zuen doktoradutza erakunde berak eskainitako beka baten bidez. Horrez gain, proiektu hau ISCIII eta Osasun Ministerioak, eta Eusko Jaurlaritzako Osasun Departamentuak emandako diru laguntzen bidez gauzatu du.