



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera Licenciatura en Ciencias Biológicas

Factores Epigenéticos y de Transcripción
involucrados en la abstinencia a la nicotina en
el modelo de Pez cebra

N° 638

Antonella Pisera Fuster

Director: Dr. Ramón Bernabeu
Lugar de trabajo: Laboratorio de Neurociencias,
Facultad de Medicina, UBA

Departamento de Investigaciones
Junio 2014

Universidad de Belgrano
Zabala 1837 (C1426DQ6)
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533
e-mail: invest@ub.edu.ar
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>

RESUMEN

La nicotina, una droga de abuso clasificada como estimulante, posee la capacidad de generar, rápidamente, un síndrome de abstinencia cuando su consumo se ve interrumpido. Teniendo en cuenta que este síndrome y sus síntomas pueden extender su duración hasta un año, se ha consolidado como la mayor causa de reincidencia del hábito de fumar. Los cambios biológicos involucrados en el establecimiento de este síndrome deben contar con el potencial de mantenerse estables a largo plazo. La evidencia creciente sugiere que estos cambios estables de expresión génica en las neuronas están mediados en parte por mecanismos epigenéticos que alteran la estructura de la cromatina en los promotores de genes específicos.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar, por primera vez en un modelo de Pez cebra, el modo en que determinados factores epigenéticos (DNMT1, SIRT1 y TET1) y de transcripción (Pitx3 y Egr1) modifican sus patrones de expresión durante el periodo de abstinencia a la nicotina. Para esto se implementó una exposición crónica y otra intermitente durante 14 días y el análisis se llevo a cabo por PCR semicuantitativa, técnica puesta a punto en este trabajo.

Nuestros resultados muestran una expresión diferencial para todos los factores epigenéticos examinados tanto en relación al grupo control como entre ambos grupos de exposición a la droga. Por su parte los factores de transcripción no evidenciaron modificaciones detectables por esta técnica.

AGRADECIMIENTOS

A mi director el Dr. Ramón Bernabeu por recibirme en su espacio, brindarme su conocimiento y guiarme a lo largo de todas las etapas de realización de esta tesina, y, a través de él, también, a la Dra. Maria Paula Faillace por su tiempo y consejos...

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Matías Medrano y a Sofía Otero, por toda la ayuda, apoyo y compañía durante estos meses de trabajo conjunto...

A mi familia, mis padres, hermanos, tíos y abuela, por acompañarme incondicionalmente siempre...

A mis amigas, Georgina Gennaccaro, Jesica Romero y Lucina Larrosa, por todos los momentos compartidos, los consejos brindados y la buena onda, pero especialmente a Fiorella Spinelli por ser la única aguantándome y acompañándome, a lo largo de todos estos años de carrera...

...GRACIAS

INDICE

<u>Abreviaturas</u>	8
<u>Introducción</u>	9
1. La adicción y dependencia a sustancias de abuso	9
1.1. Las drogas de abuso	10
1.2. El sustrato neurobiológico de la dependencia	10
2. Nicotina	11
2.1. Estructura, Clasificación y Distribución de los nAChRs	11
2.2. Mecanismo de acción.	
2.2.1. Factores que participan en la vía de la dependencia a la Nicotina	12
2.2.1.1. Los Factores Epigenéticos	12
2.2.1.2. Los Factores de Transcripción	14
2.3. La dependencia a la Nicotina	14
2.4. El Síndrome de Abstinencia a la Nicotina	14
3. El pez cebra como modelo para el estudio del efecto neurobiológico de las drogas de abuso .	15
3.1. El pez cebra como modelo experimental	15
3.1.1. El pez cebra en el estudio de la adicción a nicotina	16
<u>Objetivos</u>	17
1. Objetivos Generales.....	17
2. Objetivos Específicos	17
<u>Materiales y Métodos</u>	18
1. Animales	18
2. Condicionamiento de Preferencia al Lugar – CPP.....	18
3. Administración de Nicotina y Tratamiento.....	18
4. Extracción de ARN	19
5. Síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa	19
6. PCR estándar	20
7. Electroforesis	20
8. PCR semicuantitativa.....	21
9. qPCR	21
10. Análisis de los datos provistos por qPCR	21
11. Primers utilizados	23
12. Análisis Estadístico	24
<u>Resultados</u>	25
1. Exposición a Nicotina	25
2. Diseño y Comprobación de Primers	27
3. Elección del tipo de electroforesis a utilizar para resolver los productos de la PCR semicuantitativa.....	28
4. PCR semicuantitativa	29
5. PCR cuantitativa o qPCR	32
<u>Discusión</u>	35
<u>Bibliografía</u>	38

ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
CPP	Conditioned Place Preference – Condicionamiento de Preferencia al Lugar
DNMT	ADN metiltransferasa
dSTR	Cuerpo Estriado Dorsal
HAT	Histona Acetiltransferasa
HDAC	Histona Desacetilasa
HMT	Histona Metiltransferasa
Hpf	Horas post-fecundación
MPTs	Modificaciones Postraduccionales
NAc	Núcleo Accumbens
nAChR	Receptor de Acetilcolina Nicotínico
PFC	Corteza Prefrontal
PPT	Núcleo TegmentalPedunculo pontino
SN	Sustancia Nigra
SNC	Sistema Nervioso Central
VTA	AreaTegmental Ventral
GABA	Acido γ -aminobutírico

INTRODUCCIÓN

1.- La adicción y la dependencia a sustancias de abuso

Mientras que la Real Academia de Lengua Española define el término adicción como el hábito de quien se deja dominar por el uso de alguna o algunas drogas tóxicas, o por la afición desmedida a ciertos juegos, la Asociación Americana de Psiquiatría define a la adicción, como “una enfermedad crónica del cerebro, que lleva al consumo compulsivo de una sustancia, a pesar de sus consecuencias perjudiciales”.

Independientemente de que definición se adopte, resulta importante resaltar que la existencia de abuso de sustancias no implica necesariamente que vaya a desarrollarse una adicción (Anthony y col., 1994.; O’ Brien y Anthony, 2005.; Wagner y Anthony, 2002.; WorldHealthOrganization 2010). De hecho, el consumo de sustancias puede clasificarse dependiendo del patrón de consumo en: 1) uso social, ocasional o controlado; 2) abuso o uso perjudicial; y 3) adicción o dependencia.

Tal como esquematiza la Figura 1, el consumo de una droga de abuso comienza inevitablemente a partir del uso casual, en un entorno social determinado, generándose un refuerzo agudo. Frecuentemente, cambia el patrón de consumo y el uso ocasional deja de serlo para pasar a ser de tipo compulsivo. En este momento, se pierde el control sobre la toma de drogas, dándose lugar a la dependencia. Una vez establecido este fenómeno, si se suspende el consumo de la droga, comienzan a aparecer estados emocionales negativos que componen el síndrome de abstinencia (ver 1.2.1) el cual puede conducir al restablecimiento del consumo o recaída (Le Moal y Koob, 2007).

De hecho, actualmente, uno de los objetivos más importantes de la investigación en esta área es identificar los mecanismos neurobiológicos responsables de la transición desde el consumo ocasional al proceso adictivo.

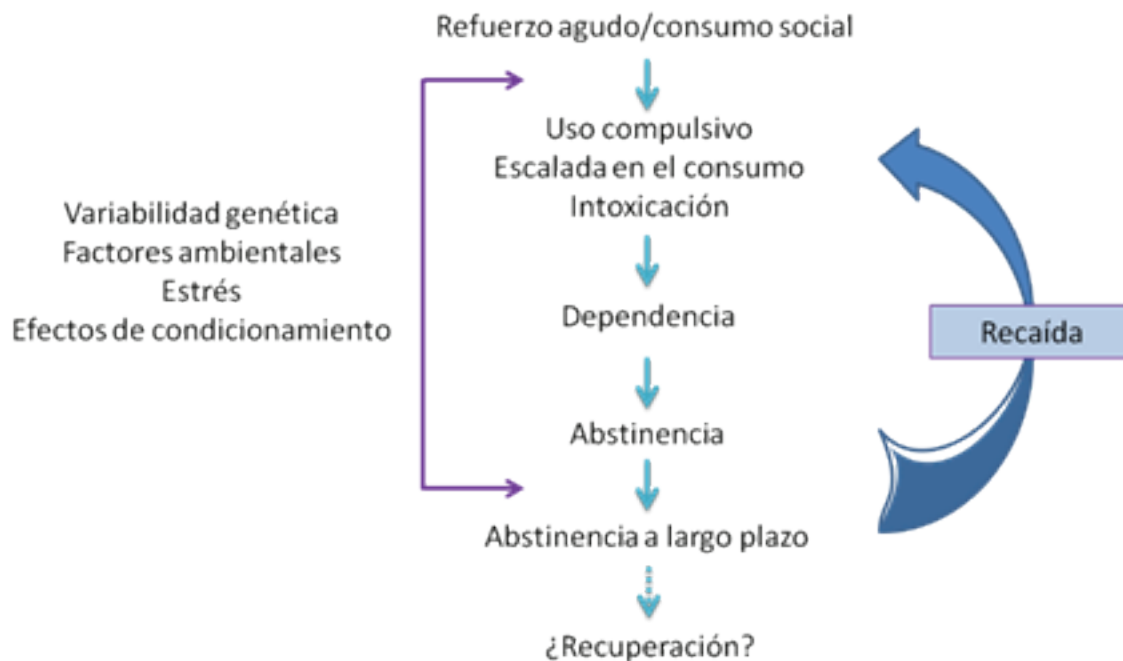


Figura 1. Estadios de la adicción a las drogas de abuso. Modificado de LeMoal y Koob, 2007.

1.1.- Las Drogas de Abuso

Según la página web el Instituto Internacional de Drogas de Abuso (<http://www.nida.nih.gov/nidahome.html>) a modo general las drogas de abuso pueden ser clasificadas en:

- Estimulantes: cocaína, anfetaminas, nicotina, cafeína, esteroides.
- Sedantes: barbitúricos, benzodiacepinas, alcohol, γ -hidroxibutirato, marihuana.
- Alucinógenos: LSD (ácido lisérgico), ketamina, fenilciclidina, MDMA (éxtasis).
- Opiáceos: heroína, morfina y sus derivados.
- Inhalantes: nitrito de amilo, tolueno, xileno, acetona.

Aunque las drogas de abuso presentan una gran diversidad respecto a sus efectos y mecanismos de acción, todas ellas tienen en común la capacidad de producir efectos reforzantes del comportamiento consumatorio activando el sistema de refuerzo fisiológico del organismo (Pontieri y col., 1996).

Llegados a este punto, resulta necesario introducir el concepto de “reforzamiento”, un reforzador es definido operacionalmente como “cualquier evento que incremente la probabilidad de una respuesta” y frecuentemente es usado indistintamente con el concepto de “recompensa”. Sin embargo, se debe tener en cuenta que “recompensa” normalmente implica un valor adicional de carácter emotivo, como puede ser el placer.

Las drogas que generan dependencia, en general ejercen dos efectos principales que contribuyen a su capacidad adictiva. Por un lado, desencadenan efectos reforzantes o de recompensa, que generan deseos muy poderosos de volver a experimentar los efectos (craving) de la droga. Por otro lado, la privación a menudo causa un síndrome de abstinencia que desencadena trastornos tanto emocionales como fisiológicos cuando la droga no está disponible.

1.2.- El sustrato Neurobiológico de la dependencia

Durante las últimas dos décadas, la hipótesis de la dependencia generada por la activación del sistema mesolímbicodopaminérgico o “vía de la recompensa” ha dominado el pensamiento en relación con los mecanismos neurobiológicos que subyacen a la adicción a las drogas de abuso (Wise, 1996).

Este sistema dopaminérgico está integrado por 3 vías diferentes: (1) La vía dopaminérgicanigroestriatal que parte de la sustancia nigra (SN), se proyecta al cuerpo estriado dorsal (dSTR), y regula y coordina principalmente los programas motores; (2) la vía tuberoinfundibular que cuenta con proyecciones desde el hipotálamo al infundíbulo y a la hipófisis anterior y controla la liberación de prolactina (Koob y Le Moal, 2001); y (3) la vía dopaminérgicamesocortico límbica que se compone básicamente de proyecciones que van desde el área tegmental ventral (VTA) al núcleo accumbens (NAc), hipocampo, tubérculo olfatorio, amígdala, corteza prefrontal (PFC) y septum. Esta vía participa fisiológicamente en la creación de hábitos de conducta frente a reforzadores naturales como son la comida, la ingesta hídrica o el sexo, modulando el circuito córtico-estriado-palidal donde se generan los patrones motores (Koob y Le Moal, 2005). Se estableció, entonces, al sistema dopaminérgicomesolímbico como el sistema de recompensa común a todas las drogas de abuso (Wise, 1996), además, de ser un sistema sumamente conservado a lo largo del grupo de los vertebrados.

Durante el consumo crónico de una droga de abuso, en el cerebro ocurren fenómenos plásticos con el objetivo de establecer un cambio homeostático generado por la presencia continua de la droga. Estos procesos de plasticidad sináptica son considerados como un paso inicial fundamental en la adicción (Everitt y Wolf, 2002) ya que contribuyen al deseo, al consumo y a la búsqueda de la droga (Hyman y Malenka, 2001).

Además, se ha visto, que las drogas de abuso producen una liberación dopaminérgica alterada en la PFC, más concretamente en la región orbito-frontal, zona donde se postula que se integra y procesa la información emocional y motivacional. Esta estructura participa en la toma de decisiones y valoración de los estímulos, dos características asociadas a las drogas de abuso. De hecho, se ha observado en animales de experimentación que la destrucción de la PFC facilita la búsqueda compulsiva de la droga (Weissenborn y col., 1997).

2.- Nicotina

La nicotina es una amina terciaria, más exactamente una β -piridil- α -N-metil-pirrolidina (Figura 2), cuya fórmula empírica es $C_{10}H_{14}N_2$ y su peso molecular es 162.23. Posee dos formas isoméricas, pero el tabaco contiene sólo la forma farmacológicamente más activa, el isómero L-nicotina.

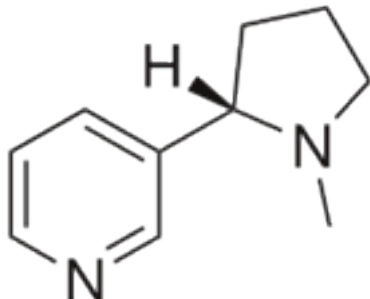


Figura 2. Estructura Química de la Nicotina

Es soluble en agua, incolora, de sabor amargo y una base débil con un pKa de 8.5, se absorbe en los pulmones (de un 79 a un 90 %), y en menor medida a través de la mucosa bucal, plexos sublinguales y piel (Koob y Le Moal, 2006). Una vez absorbida, la nicotina entra en la circulación arterial y se distribuye rápidamente por los tejidos del cuerpo, llegando hasta el cerebro en segundos, donde ejerce su acción psicoactiva a través de la unión y activación de los nAChRs (Receptor de Acetilcolina Nicotínico) (Benowitz, 2010).

2.1.- Estructura, Clasificación y Distribución de los nAChRs

Los nAChRs pertenecen a la superfamilia de los receptores ionotrópicos activables por ligando, siendo la acetilcolina (ACh) su ligando endógeno. Pueden existir en diversos estados conformacionales: en reposo; activo (el canal está abierto); desensibilizado (el canal está cerrado y el agonista unido a éste con gran afinidad); o inactivo (desensibilizado a largo plazo). La probabilidad de que los nAChR permanezcan en una u otra conformación depende de la concentración del agonista (Changeux y col., 1998.; Dani y De Biasi, 2001.; Barik y Wonnacott, 2009).

En cuanto a su estructura molecular, los nAChR están compuestos por 5 subunidades polipeptídicas; y de su combinación surgen los distintos tipos de receptores, cada uno con características particulares. Como se observa en la Figura 5, las 5 subunidades se agrupan formando un poro que atraviesa la membrana plasmática (el canal iónico).

Los receptores pueden ser homoméricos o heteroméricos, dependiendo de las subunidades que los componen. Hasta el momento, se conocen diez subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), tres subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$), una γ y una δ (subunidades de la placa neuromuscular). Las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ forman los subtipos de nAChRs $\alpha\beta$ heteroméricos y las subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 9$, forman receptores homoméricos (Dani y De Biasi, 2001.; Gotti y col., 2006).

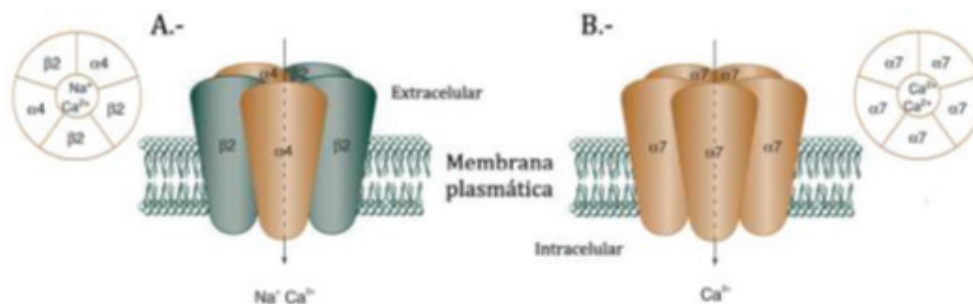


Figura 3. Representación esquemática de los principales nAChRs ensamblados en la membrana plasmática. Los círculos representan el esquema de un corte sagital de los receptores neuronales heteromérico (A) y homomérico (B) donde se evidencia la composición de subunidades y la permeabilidad a cationes (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA)).

En el SNC, los nAChRs se encuentran localizados preferentemente a nivel presináptico, donde modulan específicamente la liberación de diferentes neurotransmisores; mientras que con menor frecuencia se encuentran en cuerpos celulares o dendritas, fundamentalmente las subunidades $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ (Gotti y Clementi, 2004). La composición de subunidades es célula y región específica de acuerdo con la extensa localización de las vías colinérgicas mencionada anteriormente (Gotti y Clementi, 2004).

El subtipo $\alpha 4\beta 2$ constituye el 90 % de los nAChRs neuronales de alta afinidad en el cerebro de mamífero y es el principal subtipo localizado en el SNC. Por otra lado, los receptores formados por las combinaciones de las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 6$, $\beta 3$ ó $\beta 4$ tienen una baja distribución en el cerebro (Gotti y col., 2006). Por su parte los nAChRs $\alpha 7$ homoméricos presinápticos están presentes en las terminaciones glutamatérgicas y facilitan la liberación del glutamato en varias regiones cerebrales, incluida la VTA (área fundamental para desarrollar una adicción). Además se encontró expresado, en forma particularmente alta, en el hipocampo (área fundamental para la formación de memorias) (Mansvelter y McGehee, 2000.; Jones y Wonnacott, 2004.; Patti y col., 2006).

Los nAChRs se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso y varios tejidos y órganos (Gotti y Clementi, 2004.; Gahring y Rogers, 2006).

2.2.-Mecanismo de Acción de la Nicotina

La nicotina al unirse a los nAChR abre el canal iónico activando señales de segundos mensajeros intracelulares. Existen dos vías mayores de proyecciones colinérgicas. Una de ellas se origina en las neuronas de los núcleos tegmental pedúnculo-pontino (PPT) y tegmental pontinolaterodorsal, inervando principalmente al tálamo, al cerebro medio que incluye la SN y la VTA, y al tallo encefálico. La otra, se origina en el prosencéfalo basal, que incluye: el cuerpo estriado ventral (NAc y bulbo olfatorio), núcleos de la base (pálido ventral y sustancia innominata), banda diagonal de Broca y núcleo septal medial; y se proyectan principalmente a la corteza y el hipocampo (Woolf, 1991.; Dani y Bertrand, 2007).

2.2.1.- Factores que participan en la vía de la dependencia a la Nicotina

Tal como hemos establecido con anterioridad, la acción de la nicotina, desencadenada a partir de su unión con los receptores colinérgicos, implica la activación de segundos mensajeros que podrán intervenir en la regulación de la expresión génica actuando sobre los dos factores principales involucrados en ella, los factores epigenéticos y los factores de transcripción, los primeros de los cuales serán capaces, además, de regular la accesibilidad de los segundos al genoma.

2.2.1.1.- Los factores epigenéticos

La palabra 'epigenética' históricamente hace referencia a un fenotipo hereditario no codificado por el ADN en sí, sino por un proceso celular "por encima del genoma" (Feinberg AP, 2007).

Los procesos epigenéticos pueden ser divididos en tres etapas secuenciales: 1°, la vía intracelular que es desencadenada por el estímulo extracelular. Esta etapa es transiente e involucra todo aquello que ocurre antes del primer evento en la cromatina. 2°, la activación de factores que dirigen la información generada al sitio preciso en la cromatina. Estos factores epigenéticos poseen como característica algún tipo de reconocimiento de secuencias específicas de ADN (por ej. proteínas de unión al ADN, ARN no codificante, etc.) y en general también poseen algún mecanismo de retroalimentación positiva. 3°, la modificación que se produce en la cromatina que permite mantener la característica epigenética.

Las modificaciones epigenéticas se refieren a los cambios que ocurren en la tercer etapa del proceso de epigenesis e involucran vías muy diversas que pueden ser agrupadas en dos categorías: las "modificaciones de la cromatina", que incluyen, entre otras, la metilación del ADN (en la citosina de los dinucleótidos citosina-guanina CpG) y las modificaciones postraduccionales (MPTs) de las histonas comprendiendo la acetilación, fosforilación, ubiquitinación y la metilación de las mismas (Gräf y Mansuy, 2008). La otra categoría se denomina "remodelado de la cromatina" y se refiere a cambios en el posicionamiento del

nucleosoma y la incorporación de isoformas de las histonas (Berger y col., 2009). La comprensión de, particularmente, la primera de estas categorías es la que resultará de utilidad para esta tesina.

Las modificaciones del ADN y de las histonas son controladas por enzimas específicas denominadas en su conjunto “modificadores de la cromatina”, que incluyen, entre otras, las ADN metiltransferasas (DNMTs), las histonas acetiltransferasas (HAT), las histonas deacetilasas (HDACs), las histonas metiltransferasas (HMT), las histonas demetilasas, las proteínas kinasa y fosfatasa de histonas, (Kouzarides, 2007). De todas estas centraremos nuestro estudio en DNMT1, la metiltransferasa denominada de mantenimiento por su capacidad de mantener el diseño original de metilación de un linaje celular (Li y col., 1992), TET1, una enzima con actividad antagonica a las DNMTs asociada a la demetilación del ADN, y SIRT1, una histona deacetilasa.

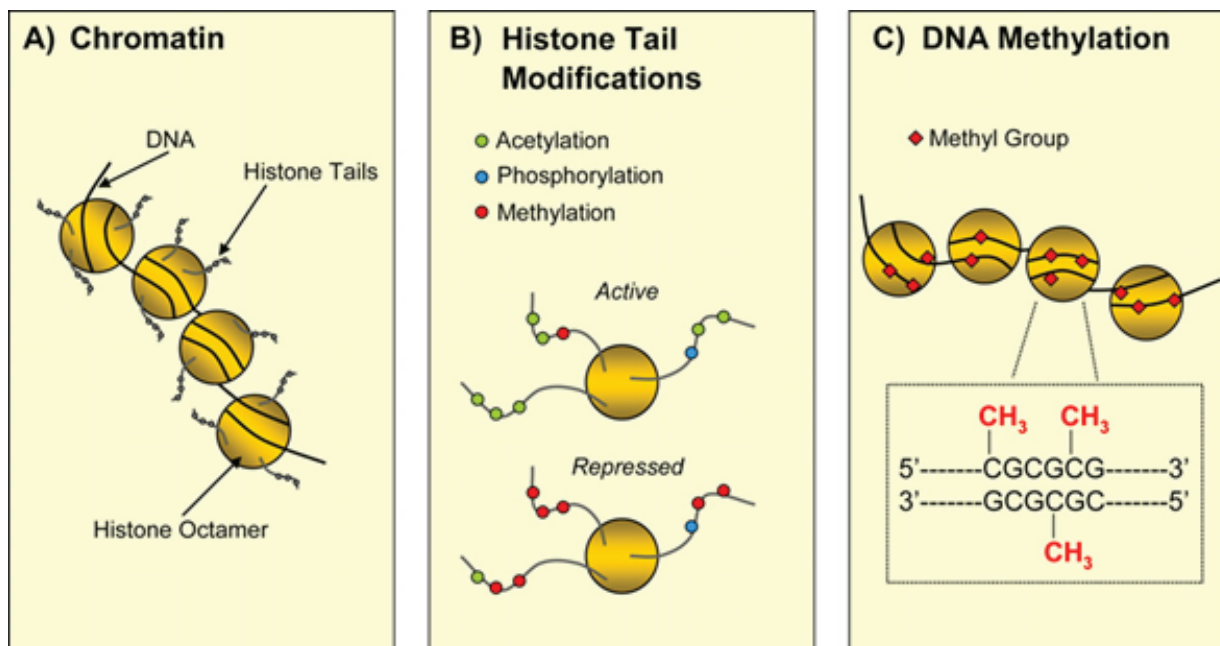


Figura 4. Representación esquemática de las modificaciones epigenéticas. (Jiang y col., 2008)

A partir de sus propiedades fisicoquímicas, las modificaciones provocadas por estas enzimas influyen en la condensación-relajación de la cromatina y por ende modulan la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al ADN (factores de transcripción, cofactores, ARN polimerasas), desempeñando un papel muy importante en la regulación de la transcripción de los genes sin alterar su secuencia nucleotídica (Brownell y Allis, 1996.; Hsieh y Gage, 2005.; Kuo y col., 1998).

En el sistema nervioso, los cambios epigenéticos son decisivos para el desarrollo de procesos celulares básicos como la plasticidad sináptica, y para comportamientos complejos como el aprendizaje y la memoria (Gräf y Mansuy, 2008). Asimismo, en los últimos años, ha aumentado la evidencia que apoya la hipótesis de que estos mecanismos de regulación epigenética se ven directamente afectados por las drogas de abuso, y que tales adaptaciones son uno de los principales procesos por los cuales las drogas inducen cambios de gran estabilidad en el cerebro que median en el fenotipo adicto (Nestler, 2008).

Si bien, el aumento del número de nAChRs en la dependencia a la nicotina se encuentra bien documentado y podría contribuir a la neuroadaptación asociada con la administración crónica de nicotina, otro mecanismo neuroadaptativo que puede tener consecuencias en los mecanismos a largo plazo desencadenados por la nicotina, es la alteración de la transcripción génica a través de cambios en los niveles de factores epigenéticos, como ha sido observado previamente con otras drogas de abuso, principalmente, en modelos de roedores (Renthal y Nestler, 2008.; Pastor y col., 2011).

2.2.1.2.- Los factores de transcripción

La transcripción es el proceso por el cual la maquinaria celular sintetiza ARN, el cual será traducido a proteína, a partir del ADN genómico. Los denominados factores de transcripción poseen la capacidad de regular la transcripción de diversos genes, uniéndose, en forma directa o indirecta, a un gen en una región del ADN particular, conocida como región cis-reguladora la cual se encuentra localizada flanqueando la región promotora 5' del gen. A partir de su unión a la región cis-reguladora, estos factores, son capaces de alterar la iniciación del proceso de transcripción, probablemente, a través de una interacción directa con el complejo de la ARN-polimerasa. Dado que, una secuencia cis-reguladora particular puede presentarse en múltiples genes, la activación de un único factor de transcripción cuenta con la capacidad de alterar la expresión de múltiples genes blanco, pudiendo aumentar o disminuir la transcripción de diferentes genes.

Existe una gran variedad de factores de transcripción que se agrupan de acuerdo a similitudes en las características de sus secuencias proteicas o de sus dominios de unión a DNA. Para este trabajo resultan particularmente de interés los factores de transcripción denominados Pitx3 y Egr1. Pitx3, es un regulador transcripcional importante para la diferenciación y mantenimiento de las neuronas mesolímbico-dopaminérgicas (mdDA), mientras que Egr1 o Zif268, es un regulador transcripcional asociado a la actividad neuronal, la diferenciación y la mitogénesis, con un rol preponderante, también, en la plasticidad neuronal y que ha sido asociado con el proceso de generación de una adicción a la cocaína en roedores (Everitt B J y Wolf M E., 2002).

2.3.- La dependencia a la nicotina

La nicotina es un estimulante psicoactivo, una de las drogas más poderosamente adictivas del mundo (Stoehr, 2006) y según la Organización Mundial de la Salud (2010), también, una de las drogas más consumidas. De entre todos los compuestos químicos presentes en los cigarrillos, es considerada el principal alcaloide responsable de su efecto adictivo y de la alta tasa de recaída (Stolerman y Jarvis, 1995.; Domino, 1998.; Benowitz y col., 2010).

Diferentes experimentos conductuales realizados con animales de laboratorio, sobre todo con roedores, sugieren que las propiedades psicoestimulante de la nicotina se asemejan a las de las anfetaminas y la cocaína, particularmente, cuando el fármaco se administra repetidamente (Balfour y col., 1998). Estos estudios muestran, además, que la nicotina es un reforzante relativamente débil en comparación con otros fármacos que generan dependencia, como pueden ser, las ya mencionadas, anfetamina y cocaína o incluso la morfina (Caggiula y col., 2001.; Donny y col., 2003). Por lo que, las propiedades reforzantes de la nicotina en sí no parecen ofrecer una explicación totalmente adecuada de las poderosas propiedades adictivas de la droga. Esto ha llevado a inferir que los estímulos ambientales asociados con la exposición a la nicotina desempeña un papel crítico en el mantenimiento de uso de las drogas y en la promoción de la recaída (Balfour, 2004). Además, la nicotina posee propiedades de reforzador secundario a través de sus efectos facilitadores sobre los sistemas de neurotransmisión colinérgico y noradrenérgico (Carmody, 1989).

Por otra parte, se ha observado que, además de sus propiedades intrínsecas de refuerzo, la nicotina es, también, particularmente eficaz en el establecimiento o aumento de estímulos asociados, como la predicción visual y/o auditiva reforzada en animales de experimentación, o el sabor y el olor del humo del tabaco para los fumadores (Balfour y col., 2000.; Goldberg y Henningfield, 1988.; Rose y Corrigall, 1997.; Rose y Levin, 1991).

2.4.- El síndrome de abstinencia a la nicotina

Cuando un cuerpo está expuesto periódicamente a una sustancia adictiva, la retirada puede causar síntomas que duran desde unos pocos días a un mes generando, además, sensaciones desagradables (Curtis y Lehart, 2008). Este espectro de síntomas físicos y del comportamiento tras el cese del uso continuo de una droga de abuso es conocido como el síndrome de abstinencia.

La mayoría de los efectos de la abstinencia de nicotina comienzan entre 6 y 12 horas después de la interrupción del consumo, observándose un pico entre los días 1 y 3 (Gross y Stitzer, 1989.; Hughes,

1992a). Sin embargo, el craving persiste por más de 6 meses, del mismo modo que la ansiedad y el aumento de peso (Hughes y col., 1990.; Hughes, 1992b).

Los efectos de la nicotina en el cerebro son mediados a través de una neuromodulación, en la cual la nicotina potencia la liberación de diversos neurotransmisores incluyendo la acetilcolina, la dopamina, el glutamato, el GABA, la norepinefrina y la serotonina (Picciotto y col., 1998.; Koob y Le Moal, 2005, 2006). Por lo tanto, mediante la activación o el bloqueo selectivo de estos neurotransmisores, uno puede ser capaz de regular algunos de los efectos de la nicotina.

El estudio del síndrome de abstinencia de diversas drogas, incluida la nicotina, requiere de modelos animales, hasta ahora los más utilizados han sido, ampliamente, los roedores. Se ha podido observar que en los modelos no-humanos, el cese de la exposición crónica a la nicotina, al igual que en los modelos humanos, cambia varios parámetros bioquímicos y fisiológicos (Badawy y Evans, 1983.; Morrison, 1974) produciendo cambios de comportamiento, tales como el aumento de la ingesta diaria (Grunberg, 1990) o la disminución de la actividad motora (Malin y col., 1992).

En 1992, Malin y colaboradores publicaron que la suspensión de la administración crónica de nicotina en ratas evidenció un síndrome de abstinencia física caracterizado por castaño de dientes, masticación, jadeos, temblores, sacudidas, ptosis y bostezos. Estos efectos fueron abruptamente revertidos por la administración de nicotina. Además de la abstinencia espontánea, observada por el cese de la administración de nicotina en ratas que reciben una infusión crónica de nicotina, la abstinencia puede ser precipitada por la administración de antagonistas de la nicotina, como son la mecamilamina y la di-hidro- β -eritroidina (DH β E) (Hildebrand y col., 1997.; Malin y col., 1994 y 1998).

Por otro lado, existe un fenómeno de desensibilización de los nAChRs debido a su activación repetida durante el consumo sostenido, que se traduce en una hipofunción de los sistemas dopaminérgico y noradrenérgico durante la abstinencia del alcaloide (Court y col., 1998). Y de hecho, se ha observado que, este estado hipofuncionante de dichos sistemas se relaciona estrechamente con la aparición de diferentes signos y síntomas del síndrome de abstinencia de nicotina, responsables de la conducta de mantenimiento de la adicción (Markou y col., 1998).

3.- El pez cebra como modelo para el estudio del efecto neurobiológico de las drogas de abuso.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez tropical de agua dulce y de pequeño tamaño (de 4 cm de largo) perteneciente a la familia Cyprinidae (Nelson, 2006). Durante la evolución de los peces con aletas radiadas, grupo que incluye al pez cebra, se produjo un evento de duplicación del genoma, lo que resulta en un genoma con secuencia redundante (Meyer y Van de Peer, 2005).

3.1.- El pez cebra como modelo experimental

Tradicionalmente, las ratas y los ratones han sido los animales de laboratorio elegidos mayoritariamente como modelos animales de estudio, principalmente debido a la homología anatómica, biológica y genómica observada entre roedores y humanos (Lieschke y Currie, 2007). Sin embargo, el uso de este modelo se ve obstaculizado por una serie de cuestiones que incluyen el alto costo, la cría difícil, los largos períodos de desarrollo, y la ineficiencia en técnicas de alto rendimiento.

Por su parte, el pez cebra (*Danio rerio*), que ha sido propuesto como una alternativa a los modelos de mamíferos en varios campos, incluyendo la neurociencia, la biología del desarrollo y la genética (Darland y col, 2001;. Gerlai, 2000;. Klee, 2012.), es capaz de compensar estos inconvenientes. Aunque hay un grado de disparidad fisiológica y filogenética entre peces y mamíferos, los órganos de pez cebra son funcional y morfológicamente similares al de estos últimos y el sistema nervioso central (SNC) se desarrolla y está organizado de una manera semejante, incluso se ha identificado su circuito análogo la vía de la recompensa (Pista y Wullimann, 2002), colocándose fisiológica y anatómicamente entre los mamíferos y los insectos (*Drosophila melanogaster*) y los gusanos (*C. Elegans*), muy utilizados últimamente en investigación.

Además, su genoma ha sido completamente secuenciado (Postlethwait y col., 1998; Woods y col., 2000) permitiendo la aplicación de un gran número de herramientas genéticas para la investigación (Dooley y Zon, 2000.; Rinkwitzet y col., 2011). Asimismo, el modelo del pez cebra permite estudios de alto rendimiento de los efectos in vivo de nuevos fármacos a un costo relativamente bajo y en menor tiempo.

Durante las últimas tres décadas, el pez cebra ha sido cada vez más importante en la investigación biomédica (Dooley y Zon, 2000.; Shin y Fishman, 2002, Lieschke y Currie., 2007). Sobre todo como modelo de enfermedades humanas (Berghmans y col., 2005.; Guyon y col., 2006) y como modelo para la detección de drogas terapéuticas (Rubinstein, 2003, 2006). Además, la creciente evidencia sugiere que resulta un modelo ideal para el análisis de los mecanismos genéticos y de comportamiento de la adicción a las drogas, ya que son sensibles a las propiedades gratificantes de las drogas de abuso (López - Patiño y col., 2007).

3.1.1.- El pez cebra en el estudio de la adicción a la nicotina

Si bien los estudios de la acción de la nicotina empleando al pez cebra como modelo son actualmente escasos, diversas publicaciones han evidenciado que el pez cebra es capaz de experimentar muchos de los síntomas relacionados con la abstinencia a las drogas de abuso, por ejemplo puede manifestar formas representativas de tensión y ansiedad, por lo que ha demostrado ser un modelo viable para el estudio de la adicción a las mismas. De hecho, las respuestas que muestra el pez cebra ante un CPP (Conditioned Place Preference – Condicionamiento de Preferencia al Lugar) inducido por cocaína (Darland y Dowling, 2001), anfetaminas (Ninkovic y Bally - Cuif, 2006), opiáceos (Bretaude y col., 2007) y nicotina (Kily y col., 2009; Kedikian y col., 2013) son respuesta impulsadas por modificaciones en las vías conocidas para influir en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Ninkovic y col., 2006). Estos resultados demuestran la existencia de una vía de “recompensa” o “refuerzo” conservada que responde a distintas drogas, y sugiere que este modelo puede mostrar cambios adaptativos y correlatos conductuales de la adicción después de la exposición prolongada a drogas adictivas.

La literatura publicada apoya el uso del modelo de pez cebra para explorar los efectos de la nicotina en el sistema nervioso central y en los nAChR. De hecho, se ha podido establecer que el tratamiento crónico con etanol y nicotina altera la expresión de múltiples genes del SNC de este animal, algunos de los cuales han sido identificados como componentes de las vías de adicción en los mamíferos (Kily LJ y col., 2008). Por otra parte, recientemente se ha demostrado que la nicotina provoca un CPP muy robusto, el cual se halla asociado al aumento de la fosforilación de CREB y al aumento en la expresión de las subunidades $\alpha 7$, y $\alpha 6$ (Kedikian y col., 2013).

Con respecto a esto último, resulta importante señalar que, el paradigma del CPP es un modelo clásico de condicionamiento Pavloviano que se utiliza ampliamente para investigar los mecanismos asociados a las drogas de abuso. El condicionamiento implica un animal que es expuesto repetitivamente al estímulo apetitivo de interés, en este caso la nicotina, en un contexto determinado. Después del condicionamiento los animales son sometidos a un examen de opción, en el cual son expuestos sin restricciones a dos contextos en la ausencia del estímulo. Un aumento en el tiempo de permanencia en el contexto emparejado con el estímulo en relación a un valor de control se toma como evidencia de que el estímulo resultó gratificante (Calcagnetti y Schecter, 1994.; Brielmaier y col., 2008.; Le Foll y col., 2005).

Un factor importante a considerar en el CPP es la elección del diseño de la experiencia. Este puede ser sesgado o imparcial. Un experimento sesgado es uno en el que los animales muestran una preferencia significativa por uno de los compartimento sobre el otro antes del condicionamiento. En un cuadro imparcial, por el contrario, los animales no muestran una preferencia por un compartimento sobre el otro.

OBJETIVOS

Objetivos Generales

Dado que la interrupción del hábito de fumar conduce a síntomas de abstinencia y, como ha sido previamente establecido, estos síntomas juegan un rol central en el mantenimiento de la dependencia a la nicotina, decidimos evaluar esta etapa del consumo de nicotina. El objetivo general del presente trabajo de tesina consiste entonces en evaluar cómo se modifican, durante el periodo de abstinencia a esta droga, los patrones de expresión de determinados factores epigenéticos y transcripcionales, con la finalidad última de aportar nuevos conceptos que favorezcan la comprensión de los procesos que derivan en la recaída al consumo de esta droga de abuso, aportando información con posible aplicación en futuras intervenciones.

Objetivos Específicos

Con el propósito de alcanzar el objetivo general que nos hemos propuesto se establecen los siguientes objetivos específicos a desarrollarse:

1. Establecer el modelo de exposición a nicotina que resulte más adecuado en el modelo animal de peces cebra.
2. Poner a punto la técnica de PCR semicuantitativa como metodología seleccionada para determinar los patrones de cambio en los factores, epigenéticos y de transcripción, de interés y establecer su límite de detección y sensibilidad en comparación con la técnica de PCR cuantitativa o qPCR.
3. Evaluar, por medio de reacciones de PCR semicuantitativa, el modo en que se modifican los patrones de expresión de DNMT1, SIRT1, TET1, Ptx3 y Egr1.
4. Analizar, con herramientas estadísticas, la significancia de los resultados obtenidos de las técnicas aplicadas y determinar su importancia en función del objetivo general previamente planteado.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Para este estudio se utilizaron Peces Cebra adultos (Daniorerio), de aproximadamente 3 meses de edad, obtenidos por medio de un distribuidor comercial local. Se mantuvieron de acuerdo a los procedimientos estándar (Westerfield, M. 2007), en un tanque de 100 a 28°C L con un ciclo luz/oscuridad de 14/10 h constante y fueron alimentados dos veces al día con Artemiasp. y alimentos secos. Se les dio por lo menos 14 días para aclimatarse a las instalaciones del laboratorio y, posteriormente, los animales, fueron trasladados a la sala de comportamiento y alojados en peceras de 23 cm de altura, 35 cm de largo y 23 cm de ancho en 3 grupos de 9 peces cada uno.

Todos los protocolos para el uso, alojamiento y atención de los animales empleados fueron aprobados por la Comisión de Investigación con Animales de la Universidad de Buenos Aires.

2. Condicionamiento de Preferencia al Lugar - CPP

El experimento se realizó con 9 peces, 4 de los cuales pertenecían al grupo control o salino, siendo los 5 restantes los expuestos a la nicotina. Todas las pruebas fueron llevadas a cabo entre las 09:00 hs. y las 16:00 hs.

Aparato: Nuestro tanque de comportamiento fue diseñado, con algunas modificaciones, de acuerdo a Ninkovic y Bally – Cuif (Ninkovic J. y Bally-Cuif L., 2006). El tanque de pruebas posee 26,5 cm de longitud, 20 cm de ancho y 20 cm de profundidad, con señales visuales distintas que lo dividen en dos mitades: una de color rojo y la otra de color verde, ambas recibían la luz desde la parte inferior del tanque y reflejaban el color a través de una lamina transparente de color roja o verde respectivamente. Estas láminas fueron diseñadas de manera tal que permitieran invertir, en un solo movimiento, el color que le correspondía, en un principio, a cada mitad. El nivel del agua se mantuvo a 13 cm desde la base del tanque para minimizar el estrés.

Pre-test: El primer día, cada pez fue asignado aleatoriamente a uno de los dos grupos de tratamiento y después de un período de habituación inicial de 5 minutos en el tanque de CPP, se ensayó para determinar el lugar de preferencia mediante la cuantificación del tiempo empleado en un lado determinado de la cisterna durante un período de 5 min. El compartimento preferido se define como el compartimento en el que un pez pasa la mayor parte del tiempo durante la prueba preliminar (Kily LJ. y col., 2008)

Condicionamiento: Un día después de la prueba preliminar, todos los peces del grupo nicotina se restringieron por primera vez en el lado preferido, aunque esta preferencia no haya sido significativa, por 20 min (lado rojo) y luego en el lado verde, donde fue expuesto a la nicotina (30 µM) también durante 20 min. Los peces del grupo salino fueron expuestos durante los tres días de acondicionamiento a ambos lados alternativamente, 20 min en cada compartimento, sin nicotina. El acondicionamiento se realizó durante tres días consecutivos.

Test: En el día 5, el CPP de cada pez se puso a prueba en un ambiente libre de drogas como en el pre-test. En este punto, se le permitió al pez nadar libremente entre compartimentos y después de un período de habituación 5 minutos, se determinó el porcentaje de tiempo dedicado a cada lado del tanque durante 5 minutos (sesión de prueba), después de los cuales se invirtió la coloración de los compartimentos y se determinó el porcentaje de tiempo empleado en cada lado por 2 minutos más. Durante el análisis de los resultados, se compararon los datos obtenidos durante el pre-test y la sesión de prueba para evaluar los cambios de preferencia entre ambas sesiones.

3. Administración de Nicotina y Tratamiento

El ditartrato de nicotina se administró en forma de alícuotas tomadas de una solución madre, directamente, en el agua de dos de las cuatro peceras para alcanzar en cada una de ellas una concentración

finalde nicotina de 15 μ M. Esta dosis de nicotina se calculó en función del peso de la sal de ditartrato, teniendo en cuenta que solo el 35% de este peso corresponde, efectivamente, a nicotina pura.

La pecera en la que se mantuvieron los peces del primero de los tres grupos fue llenada con 10L de agua, sin la incorporación de ninguna droga (grupo control), el segundo grupo permaneció, desde el primer día, de forma crónica e ininterrumpida en 10L agua con nicotina durante 14 días. Finalmente, los animales pertenecientes al último de los grupos fueron mantenidos en una pecera con 10L de agua con nicotina durante el día (ciclo de luz: 14 horas) y fueron trasladados a una pecera idéntica y adyacente pero en ausencia de nicotina durante la noche (ciclo de oscuridad: 10 horas), durante el mismo periodo de 14 días. A lo largo de este lapso la mitad del contenido de cada pecera fue renovado a diario incluyendo, siempre, donde correspondía, la dosis de nicotina para mantener constante su concentración.

Todos los animales fueron sacrificados el día 16, después de haber sido sometidos a un periodo de abstinencia de, al menos, 24 horas. Se les extrajo el cerebro y se formaron tres pules con tres animales cada una por cada grupo de tratamiento.

4. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, se utilizó el método de Chomcsynski (Chomczynski, P., 1993), según el cual, en primera instancia el tejido disecado fue tratado con el reactivo TRIzol (Life Technologies) para ser homogenizado inmediatamente después utilizando palillos autoclavables e incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, a cada tubo se le incorporó 0,2mL de cloroformo, se agitó manualmente por inversión y se incubó, nuevamente, a temperatura ambiente por 3 minutos. Centrifugando a 12.000rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C se consiguió separar las muestras en una fase acuosa (conteniendo el ARN) que se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, una interface y una fase orgánica que fueron descartadas.

Con el objetivo de precipitar el ARN, se agregaron 0,5ml de isopropanol 100% y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas, una vez más, a 12.000rpm, esta vez, durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue descartado conservando, solo, el pellet de ARN. Este se lavó utilizando 1ml de etanol 75%, se agitó utilizando un vórtex y luego se centrifugó a 7.500g durante 5 minutos, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se secó durante 10 minutos, dejando los tubos abiertos para permitir la evaporación del etanol. Finalmente, el ARN se resuspendió en agua libre de ARNasas.

Luego de obtener el ARN, se procedió a la determinación de su pureza del mismo mediante la utilización del espectrofotómetro NanoDrop 1000 y se realizó un tratamiento con ADNasa I, para evitar las posibles contaminaciones con ADN genómico.

5. Síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa

El ARN purificado durante la extracción se retrotranscribió a ADNc mediante la utilización de reactivos comerciales (5x FS buffer, DTT, dNTPs, RNaseOUT y la enzima transcriptasa reversa MMLV).

En un tubo eppendorf, previamente autoclavado, se agregaron, en primera instancia, 2 μ l Cebadores al Azar(RandomPrimers), 2 μ l dNTPs Mix 10mM y 44 μ l ARN. Esta mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y, luego, se colocó rápidamente en hielo por otros 5 minutos. Posteriormente se sometió a una centrifugación rápida y se le incorporó 16 μ l 5x FS Buffer, 4 μ l RNaseOUT y 8 μ l DTT 0.1M. El contenido del tubo se mezcló y se incubó a 37°C por 2 minutos. Luego, se le añadió 4 μ l de MMLV, se mezcló por pipeteo y se incubó, primero a 25°C por 10 minutos, después, a 37°C por 50 minutos, y, por último, se inactivó la reacción calentando a 70°C por 15 minutos.

El producto de esta reacción se denominó RT. Paralelamente, se realizó un control negativo o No-RT, en el cual se omitió la enzima MMLV en la reacción de transcripción reversa. Este control negativo también fue utilizado, posteriormente, en la reacción de amplificación (PCR cuantitativa).

Se separó una alícuota de la muestra RT para ser utilizada en la cuantificación y determinación de la pureza del ADNc, empleando el NanoDrop, como se mencionó más arriba.

6. PCR estándar

Para esta amplificación se emplearon primers específicos correspondientes a genes de interés (factores de transcripción y factores epigenéticos), reactivos comerciales conteniendo la enzima Taq ADN polimerasa con su respectivo buffer y los desoxirribonucleótidos (dNTPs) además del templado de ADNc. Se utilizó en todos los casos 1µg de ADNc (o una masa equivalente de ARN de las muestras No-RT).

Los parámetros bajo los que se realizaron estas amplificaciones fueron:

- Número de ciclos: 45
- Desnaturalización inicial: 2 minutos a 95°C
- Desnaturalización: 30 segundos a 95°C
- Hibridación o "Annealing": 30 segundos a 58°C
- Elongación: 30 segundo a 72°C
- Elongación final: 5 minutos a 72°C

Tubo	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
Condición	Sin ADNc	Sin Primer	Control Positivo	DNMT1	SIRT1	TET1	Pitx3	Egr1
Agua (µL)	27.25	27.97	25.47	25.47	25.47	25.47	25.47	25.47
Primer mix (µL)	2.5	-----	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
ADNc (µL)	-----	1.78	1.78	1.78	1.78	1.78	1.78	1.78
Master mix (µL)	20.25	20.25	20.25	20.25	20.25	20.25	20.25	20.25
Volumen Final (µL)	50	50	50	50	50	50	50	50

Tabla 1. Detalle del contenido de cada tubo sometido a la reacción de PCR estándar. Las Primer mix fueron preparadas incorporando 5µL de los primers sentido y antisentido, correspondientes, a 40µL de agua. La Master mix consiste de 10µL de 5X GoTaq Buffer, 10µL de dNTP mix y 0,25MI de GoTaq ADN Polimerasa por cada tubo.

7. Electroforesis

Con los productos de las reacciones de PCR estándar se realizó, con el fin de escoger el método más adecuado, por un lado, una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en presencia de bromuro de etidio 0,5 µg/mL en buffer TBE, se corrió a voltaje constante durante 1:30 hs. y las bandas (amplicones) obtenidas, correspondientes a cada par de primers, en el gel se fotografiaron, por medio del equipo de detección G-Box (Syngene). Por otro lado, se realizó, también, una electroforesis, pero en este caso con un método poco convencional y poco utilizado, en gel de poliácridamida al 10%, revelándose las bandas por precipitación con Nitrato de Plata según procedimiento descrito por Sanguinetti y col., 1994, en el cual se sumerge el gel en solución fijadora (10 % de etanol y 0.5 % de ácido acético glacial, en agua) durante 5-15 min con agitación, luego se remueve el fijador y se sumerge en solución de plata (0.2 % de AgNO₃ en solución fijadora) por 10 min, también con agitación. Esta solución de plata se retira para exponer, a continuación, el gel a una solución reveladora (3 % NaOH y 0.33 % formaldehído) hasta que se observan las bandas. Finalmente se lo traslada a la solución fijadora, una vez más, para detener el revelado y conservar. En este último caso, los patrones de bandas obtenidos se digitalizaron, también, con el sistema de documentación de geles G-Box.

8. PCR semicuantitativa

Para estas reacciones de amplificación, también, se emplearon, al igual que con la reacción estándar, primers específicos correspondientes a genes de interés (factores de transcripción y factores epigenéticos), reactivos comerciales conteniendo la enzima Taq ADN polimerasa con su respectivo buffer y los desoxirribonucleótidos (dNTPs) además del templado de ADNc. Pero en este caso se utilizó para cada tubo 0,5µg de ADNc.

Dado que para la aplicación de esta técnica resulta importante seleccionar el número apropiado de ciclos, de modo que el producto de amplificación sea claramente visible en un gel y se pueda cuantificar, pero al mismo tiempo la amplificación esté en el intervalo exponencial y no haya alcanzado una meseta todavía, hemos construido una curva por cada par de primers para poder determinarlos de manera adecuada. Para esto se realizaron 4 PCRs estándar, para cada par de primers según los parámetros descritos anteriormente, en las cuales se varió únicamente el número de ciclos: 17 primero, luego 23 y 29 y por último 35 ciclos.

Finalmente, todos los primers fueron ensayados para los tres grupos de tratamiento en una reacción de amplificación con el número de ciclos previamente determinado y en las condiciones ya especificadas con anterioridad. Con sus productos se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y las bandas se revelaron por precipitación con Plata. La densidad de las bandas fue cuantificada con el programa Gel-Pro Anlizer.

9. qPCR

En este caso también, al igual que en la PCR estándar, se utilizó 1 µg de ADNc, producto de la reacción de RT. El ADNc de las muestras junto a los primers específicos (en tubos de PCR separados y por duplicado) se incubó con una mezcla comercial (Mezcla Real) conteniendo Taq ADN Polimerasa, dNTPs, Mg²⁺, buffer y un fluoróforo verde denominado *cybergreen*. El *cybergreen* intercala en el ADN, y es necesario para cuantificar los incrementos de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación del ADN, en el que se basa esta metodología. El equipo termociclador para PCR en tiempo real y software que se utilizó para este fin fue el AppliedBiosystem 7500 (ININFA, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA).

10. Análisis de los datos provistos por qPCR

Con el *software* del equipo utilizado se construyó una curva de fluorescencia relativa en función de los ciclos de amplificación para cada una de las muestras (en cada tubo de reacción), determinando la fluorescencia emitida al final de cada ciclo.

Se determinó un ciclo umbral (CT) de detección de fluorescencia específica de la muestra, que representa el número de ciclos necesario para detectar un valor de fluorescencia distinto del ruido (*background*). Este ciclo se selecciona en la parte exponencial de la curva de amplificación obtenida. Luego de algunos (pocos) ciclos la curva se hace más lenta y ese valor ya no es útil para cuantificar el nivel inicial de ADNc presente en cada muestra. Un valor de CT más bajo indica que una muestra contiene mayor cantidad de ADNc inicial que una muestra con un valor de CT más alto, siempre y cuando las eficiencias de amplificación en ambas muestras sean equivalentes (ver Figura 10.1).

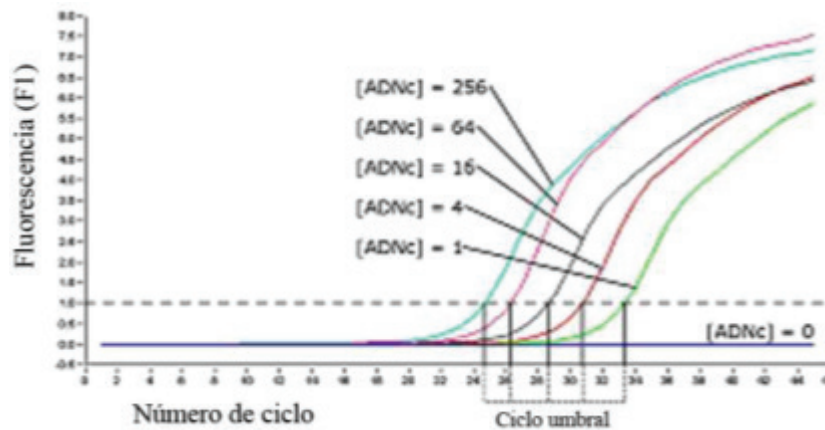


Figura 10.1. Ejemplo de un gráfico estándar de fluorescencia en función del número de ciclo. En este caso se utilizaron distintas diluciones de ADNc con la misma pareja de primers.

Para determinar la existencia de un cambio relativo en la expresión de los ARN mensajeros se utilizó el método denominado “Gene expression’s CT Difference” (GED) descrito en detalle por Schefe y colaboradores en el 2006. Este método compara los valores de CT de una, o varias, muestra de interés (SOI) con respecto a una muestra calibradora (Cal S), teniendo en cuenta las eficiencias individuales de cada curva de amplificación en cada tubo.

Se considera que la amplificación en tiempo real debe darse entre 8 y 35 ciclos para ser considerada amplificación específica.

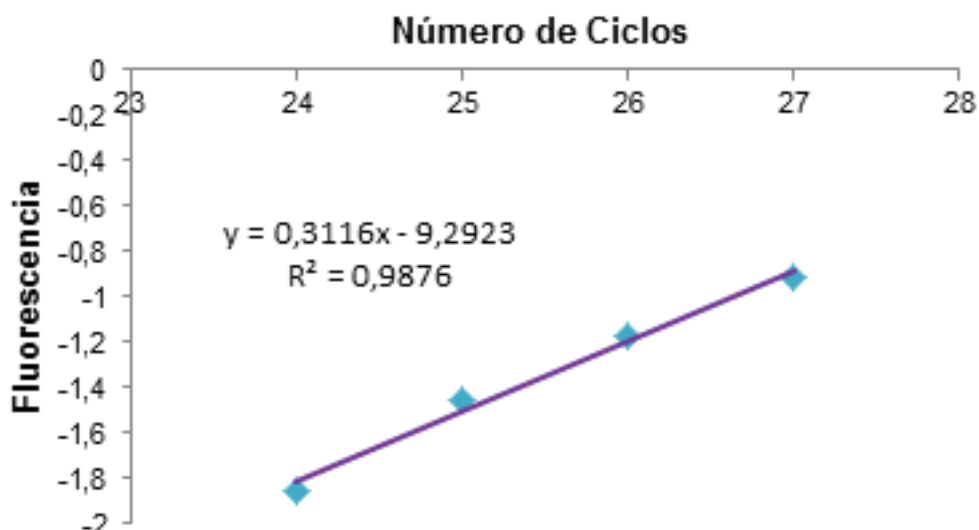
Para obtener los valores de eficiencia de amplificación de las diferentes curvas, se procedió de la siguiente manera:

1) Se calcularon las pendientes de las curvas cinéticas de la qPCR, obtenidas como el logaritmo de la cantidad de fluorescencia normalizada después de n ciclos (Rn) graficado en función del número de ciclos (n). Estas curvas fueron obtenidas para cada gen y para cada duplicado. La ecuación 2 describe el rango lineal en la fase exponencial de la curva cinética:

$$\log R_n = \log (1+E) n + \log R_0 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Ro: cantidad de fluorescencia inicial
E: eficiencia de amplificación.

2) Dentro del rango lineal de la curva, se definió una recta de 4 ó 5 puntos de cada curva, con la mejor pendiente posible y el mayor coeficiente de correlación, y se calculó la eficiencia para cada reacción ($E=10^{\text{slope}-1}$).



Se determinó un rango de eficiencias de amplificación de entre 0,86 y 1,2 (Scheffe y col, 2006). Las muestras que presentaron valores de eficiencia en este rango se consideraron muestras aceptables. Las muestras cuyas eficiencias de amplificación estuvieron fuera de este rango fueron consideradas “outliers” y no se consideraron en el análisis.

Para obtener los valores de CT se eliminó la información correspondiente a los 10-15 primeros ciclos, donde hay emisión de fluorescencia background, y se trazó un umbral de fluorescencia relativa arbitrario de 0,05 para cada una de las amplificaciones realizadas. Este valor umbral fue seleccionado ya que corresponde a la región media de la pendiente de la parte exponencial de la curva cuyos valores fueron expresados como fluorescencia relativa. Este valor umbral seleccionado arbitrariamente se utilizó con todas las amplificaciones realizadas en este trabajo.

Las muestras correspondientes al tratamiento control fueron elegidas como muestra calibradora, mientras que las muestras de los distintos tratamientos con nicotina (Crónico y D/N) fueron elegidas como muestras de interés. El resultado final se expresa como veces de cambio de una muestra de interés con respecto a una muestra calibradora, usando la siguiente fórmula:

$$rER = R_{norm} (SOI) / R_{norm} (Cal S)$$

$$rER = \frac{[(1 + E (ref. gene; SOI)) CT (ref. gene; SOI) / (1 + E (targ. gene; SOI)) CT (targ. gene; SOI)] \cdot [(1 + E (ref. gene; Cal S.)) - CT (ref. gene; Cal S) / (1 + E (targ. gene; Cal S)) - CT (targ. gene; Cal S)]}{(Ecuación 2)}$$

rER: cociente de expresión relativa
SOI: muestra de interés
Cal S: muestra calibradora

R_{norm} (SOI) y R_{norm} (Cal S): cantidad inicial de fluorescencia en la muestra de interés (SOI) y en la muestra calibradora (Cal S), respectivamente.

La eficiencia E fue calculada por separado para cada duplicado. Luego los valores fueron promediados antes de aplicarse la Ecuación 2. Los valores de CT también fueron promediados previamente a la aplicación de dicha fórmula.

Condición	18S-Salinos	18S-Cronicos	18S-D/N	DNMT1-Salinos	DNMT1-Cronicos	DNMT1-D/N	SIRT1-Salinos	SIRT1-Cronicos	SIRT1-D/N
Mezcla	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Real (µL)									
cDNA (µL)	4,94	4,44	5,62	4,94	4,44	5,62	4,94	4,44	5,62
Primer Mix (µL)	5	5	5	5	5	5	5	5	5
CXR 30µM (µL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Agua (µL)	1,56	2,06	0,88	1,56	2,06	0,88	1,56	2,06	0,88

Tabla 2. Detalle del contenido de cada tubo sometido a la reacción de PCR cuantitativa. Las Primer mix fueron preparadas a partir de 7µL de una solución stock 10µM llevados a 35µL con agua destilada estéril. CXR es un fluorocromo de referencia requerido por los equipos AppliedBiosystem para normalizar el ruido de fondo.

11. Primers Utilizados

Los primers específicos fueron seleccionados mediante el uso de Primer-Blast a partir del genoma del pez cebra aportado por la base de datos Ensembl. Los primers diseñados tienen alrededor de 20 pares de bases (pb) de largo, aproximadamente 50 % de GC, temperatura de hibridación (T_m) alrededor de 60 °C, generan amplicones de un tamaño entre 70 y 120 pb y se utilizaron exones distintos para los primers forward (F 5'→3') y reverse (R 3'→5'). En la tabla 2 se detalla la información para cada uno de los genes.

Gen	Sentido	TM (°C)	Secuencia Primers (5'→3')	Tamaño (pb)
DNMT1	F	59.68	GGAGGCAGTGGCAGAAGTAA	88
	R	55.83	CCATGTTCTCATCATCCTCAG	
SIRT1	F	60.11	TTCAGTGCCACGGGTCTTTT	118
	R	60.04	GGACACCTGGGACAATGAGG	
TET1	F	60.18	TTCATCAACACCCCCTCCA	109
	R	59.67	GCCAGATCCAAGGTGAGTGT	
Pitx3	F	60.11	GAATGTAAGCCCGCTGTCCT	70
	R	60.03	GGCCATGTTTCATGGAAGGGA	
Egr1	F	60.81	AACGCCACAGCACCTGAAG	86
	R	59.18	TCTGAAAGCGTATCTCCAGCA	
18S	F	57.30	ACCCTCGCCAGTACAAAATCC	137
	R	56.80	CCTGATCTTCTTCAGCCTCTCC	

Tabla 2. Listado de los primers utilizados en los ensayos de PCR estándar y qPCR para cada gen.

12. Análisis Estadístico

En primera instancia, los resultados arrojados por el Pre-test y el Test se analizaron estadísticamente mediante el uso de ANOVA de dos vías (twoway ANOVA). Todos los datos restantes, la cuantificación de las bandas de la PCR semicuantitativa y los productos de la qPCR, fueron analizados estadísticamente aplicando ANOVA de una vía (oneway ANOVA) seguido por el test de Dunnet para comparar las muestras de interés en relación a la muestra control o salina. Los datos en todos los casos se presentaron como la media \pm el desvío estándar (Mean \pm SD) con una significancia de $P < 0,05$. Todo el análisis de los datos se calculó utilizando el software GraphPad.

RESULTADOS

1. Exposición a Nicotina

En primera instancia, decidimos probar como modelo de exposición a nicotina un Condicionamiento de Preferencia al Lugar o CPP en peces cebra. Si bien el laboratorio cuenta con experiencia en torno a esta metodología (Kedikian y col., 2013), en este caso particular optamos por ensayar una nueva forma de la misma en la cual el tanque de prueba se encuentra dividido en dos mitades, una color rojo y la otra color verde. Esta coloración se obtuvo a partir de láminas transparentes de ambos colores iluminadas desde la parte inferior del tanque y unidas de manera tal que permitieran invertir, en un solo movimiento, el color que le correspondía, en un principio, a cada mitad. Se sabe además, que ambos colores no resultan aversivos para los peces.

Con la aplicación de esta nueva forma de CPP, en los peces cebra, buscamos no solo obtener un cambio en el lugar de preferencia, emparejando la droga con el color del compartimento en que menos tiempo permanecieron los peces durante el pre-test, si no también obtener una manera medir la fuerza del CPP alcanzado, invirtiendo los colores de los compartimentos (a los 5 minutos del testeo) de modo que si el de la izquierda era color rojo, luego de la inversión pasó a ser verde y viceversa para el compartimento de la derecha. Con esta metodología de conseguirse un CPP fuerte, los peces expuestos a nicotina en un determinado color seguirían prefiriéndolo sobre el otro aun después de la inversión.

Con la idea de determinar el color menos preferido y por lo tanto en el que los peces del grupo nicotina serán expuestos a la droga, siguiendo el procedimiento que hemos explicado en detalle en Materiales y Métodos, luego de un periodo de habituación de 5 minutos, analizamos para el total de los peces el tiempo medio de permanencia en cada compartimento durante los 5 min en el pre-test. Los resultados se muestran en la Figura 1.1.

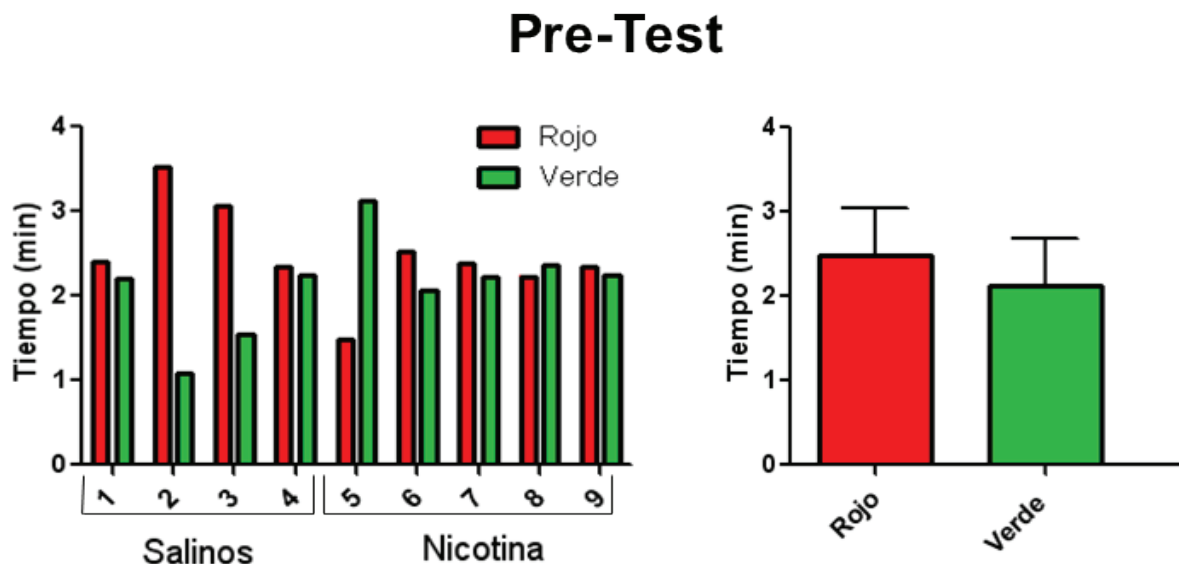


Figura 1.1. En el panel de la izquierda se muestra por separado el tiempo que cada uno de los peces permaneció en el compartimento rojo o en el verde. El panel de la derecha representa el tiempo medio que ambos grupos, en conjunto, se mantuvieron en cada uno de los compartimentos. Salinos n: 4; nicotina n: 5.

El análisis de los datos obtenidos reveló que los animales no mostraron ninguna preferencia estadísticamente significativa por ninguno de los compartimentos, en concordancia con estudios previos. A pesar de esto, se escogió emparejar a la nicotina con el compartimento verde debido a que se observó una levetendencia de preferencia por el rojo. En la Figura 1.2 se presentan los resultados extraídos de la sesión de prueba, luego de los 3 días de condicionamiento en los cuales solo los animales de grupo Nicotina fueron expuestos a la droga únicamente en el compartimento verde. El análisis estadístico no

evidenció diferencias significativas entre los grupos Salino y Nicotina ni entre la sesión de pre-test y la de prueba para cada grupo, lo que implica que el CPP no pudo consolidarse.

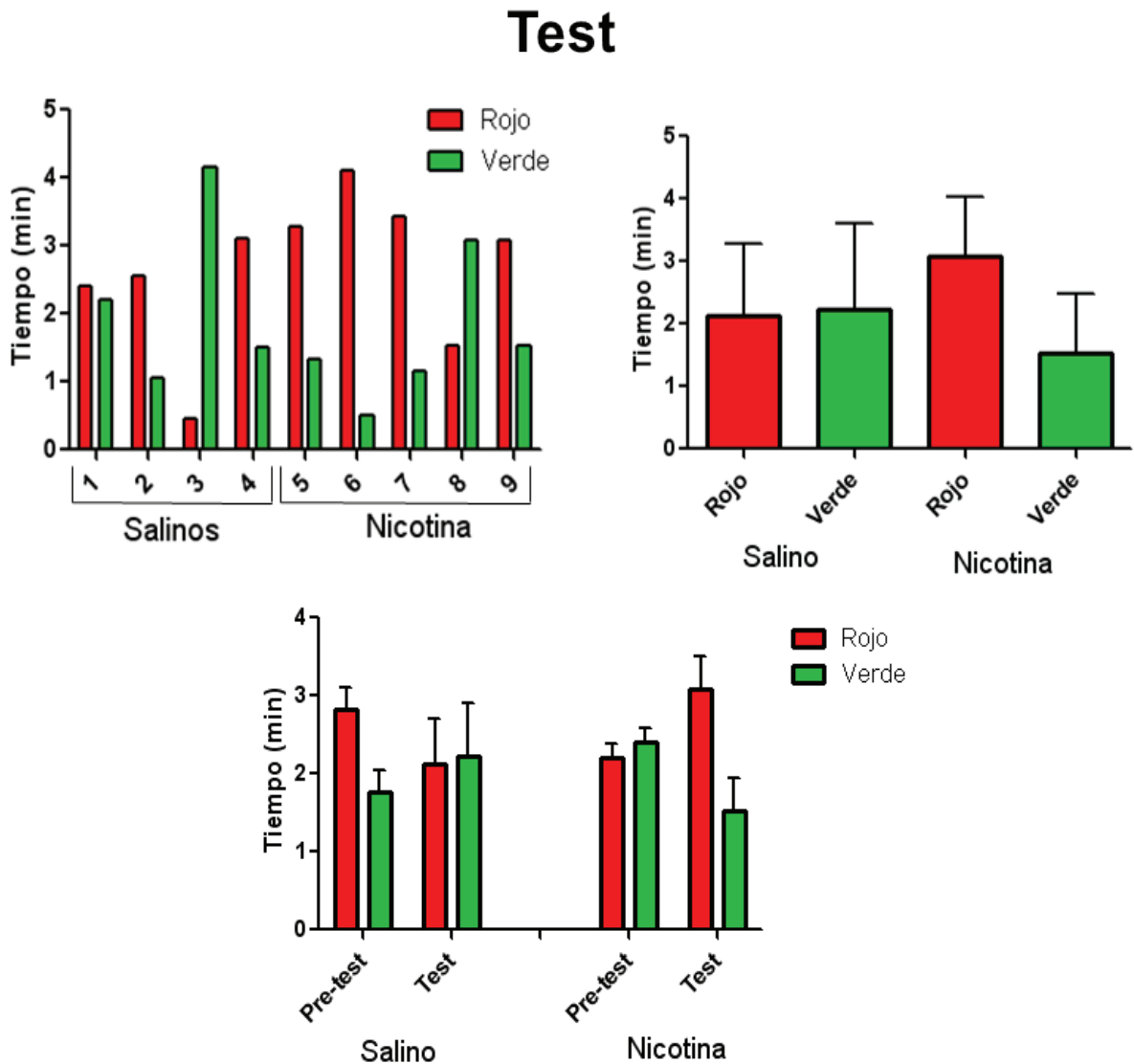


Figura 1.2. En el panel superior izquierdo se muestra el tiempo que cada animal permaneció en ambos compartimentos por separado durante la sesión de prueba. Por su parte el panel superior derecho representa el tiempo medio en que cada grupo, como conjunto, se mantuvo en un compartimento o el otro. Finalmente, el panel inferior expone la comparación del tiempo medio de permanencia en cada compartimento durante el pre-test y el test para ambos grupos por separado.

Una vez finalizados los 5 minutos de la sesión de prueba se procedió a invertir los colores de las cisternas y se evaluó la forma en que respondieron los peces pertenecientes a cada grupo durante los 2 minutos posteriores (ver Figura 1.3). El análisis de estos datos, mostró, al igual que el de los obtenidos durante la sesión de prueba, que los peces no desarrollaron preferencia alguna por el compartimento emparejado con la nicotina.

Inversión de Color

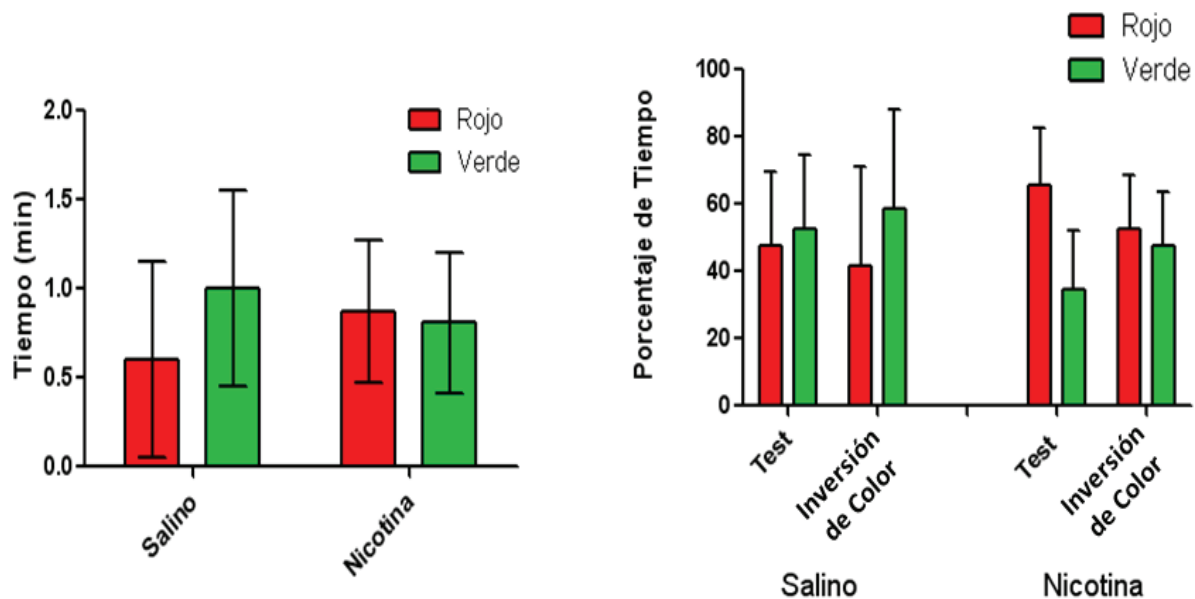


Figura 1.3. El panel de la izquierda muestra el tiempo medio que ambos grupo por separado permaneció en cada uno de los compartimentos después de la inversión de color. En el panel de la derecha se puede observar la comparación del tiempo promedio, representado como porcentaje, que cada grupo pasó a un lado y al otro del tanque durante el test y durante los 2 minutos posteriores a la inversión de colores.

Teniendo en cuenta los resultados hasta ahora expuestos y dado que no pudimos obtener un CPP satisfactorio con esta metodología y considerando que para poner a punto un CPP como el que habíamos diseñado se necesitarían varios meses, decidimos optar por otro tipo de pregunta, no ahora encarada hacia la adicción, sino hacia la abstinencia que puede generar la nicotina. En esta segunda ocasión nos inclinamos por una exposición crónica durante 14 días, (Hernandez& Terry, 2005), y le sumamos como punto novedoso una exposición intermitente (día/noche; D/N) en la cual los animales fueron puestos en contacto con la droga solo durante las horas de luz del ciclo de luz/oscuridad (14hs/10hs). La finalidad de la aplicación de esta última forma de exposición fue alcanzar un modelo de administración más parecido al modo de consumo de nicotina humano y comparar estos resultados con los obtenidos con el modelo de exposición crónica comúnmente empleado.

2. Diseño y Comprobación de los Primers

El diseño de primers es un parte fundamental del análisis cuando se emplea la técnica de PCR en cualquiera de sus formas y se llevó a cabo según el genoma aportado por la base de datos Ensembl utilizando Primer-Blast. Durante este proceso se intentó conseguir los primers más adecuados para cada gen de interés por lo que se puso particular cuidado en la elección de la secuencia a utilizarse. Esta secuencia debía estar presente en todas las isoformas del transcripto, en caso de poseer más de una, como DNMT1 o TET1, e incluir, siempre que fuera posible, dos exones diferentes separados por un intron de al menos 500pb para evitar la contaminación con ADN genómico.

Resulta importante resaltar que una vez recibidos los primers y antes de poder iniciar con las reacciones de PCR tanto cuantitativa como semicuantitativa es necesario corroborar que fueron diseñados correctamente y, por lo tanto, se unen específicamente al amplicon de interés. Para esto se realiza una PCR estándar, según lo previamente explicado en Materiales y Métodos, utilizando como templado de ADNc material extraído de animales que no fueron sometidos a ningún tratamiento. Los productos obte-

nidos se resuelven en una electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de Bromuro de etidio. Tal como se muestra en la figura 2.1. se obtuvieron las bandas esperadas para todos los pares de cebadores salvo para los correspondientes a TET1.

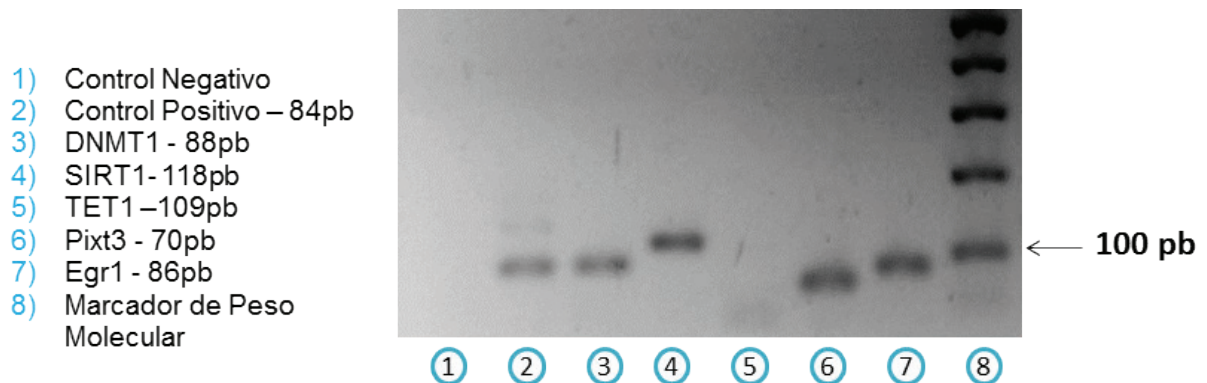


Figura 2.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la PCR estándar.

Teniendo en cuenta que una mayor expresión de TET1 se ha encontrado, sobre todo, en células poco diferenciadas, se probó este primer en una nueva PCR estándar con ADNc extraído de un tejido con mayor tasa de regeneración como es la retina del pez cebra. De esta manera pudimos corroborar que el cebador estaría funcionando correctamente (ver Figura 2.2) por lo que la ausencia de banda en el caso anterior podría deberse a que TET1 no se estaría expresando en el cerebro del pez cebra adulto o que esta expresión es demasiado baja para ser detectada con este método bajo las condiciones empleadas.

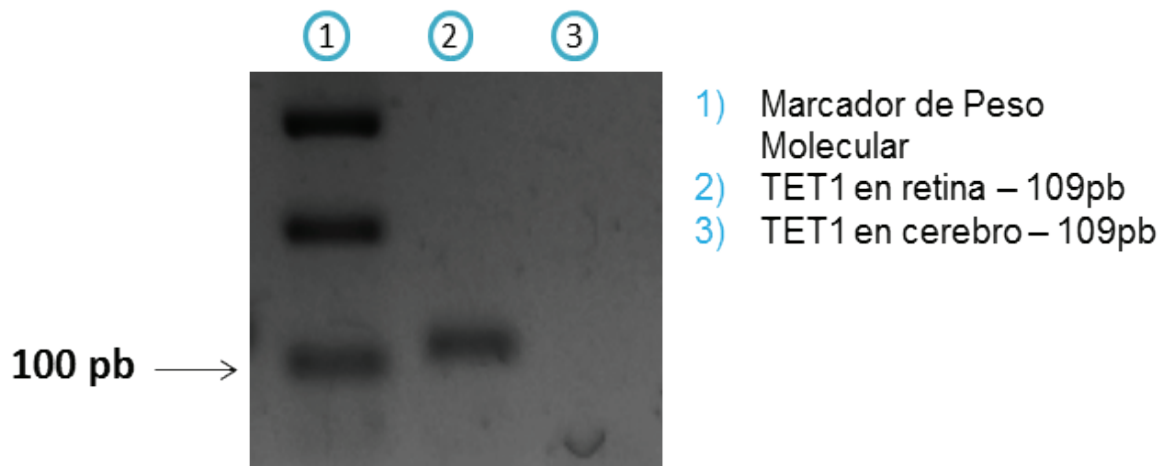


Figura 2.2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos de la segunda PCR estándar que se realizó solo con los primers correspondientes a TET1 tanto en tejido cerebral como en retina del pez cebra.

3. Elección del tipo de electroforesis a utilizar para resolver los productos de la PCR semicuantitativa.

Una vez corroborados los primers y tal como se mencionó anteriormente, en materiales y métodos, para resolver los productos de las PCR semicuantitativa se pusieron a prueba dos tipos de electroforesis, una en gel de agarosa al 2% en presencia de Bromuro de Etidio y otra en gel de poliacrilamida al 10%, en esta ultima las bandas se revelaron por precipitación con Nitrato de Plata (AgNO_3) según el procedimiento descrito por Sanguinetti y col., 1994. En ambos casos se sembraron los productos de una PCR estándar realizada, previamente, para todos los primers de interés con solo 0,5 μg ADNc extraído de animales sin tratamiento alguno. La PCR se corrió a 35 ciclos, el número máximo de ciclos que se empleara, luego, para las curvas de las PCRsemicuantitativas.

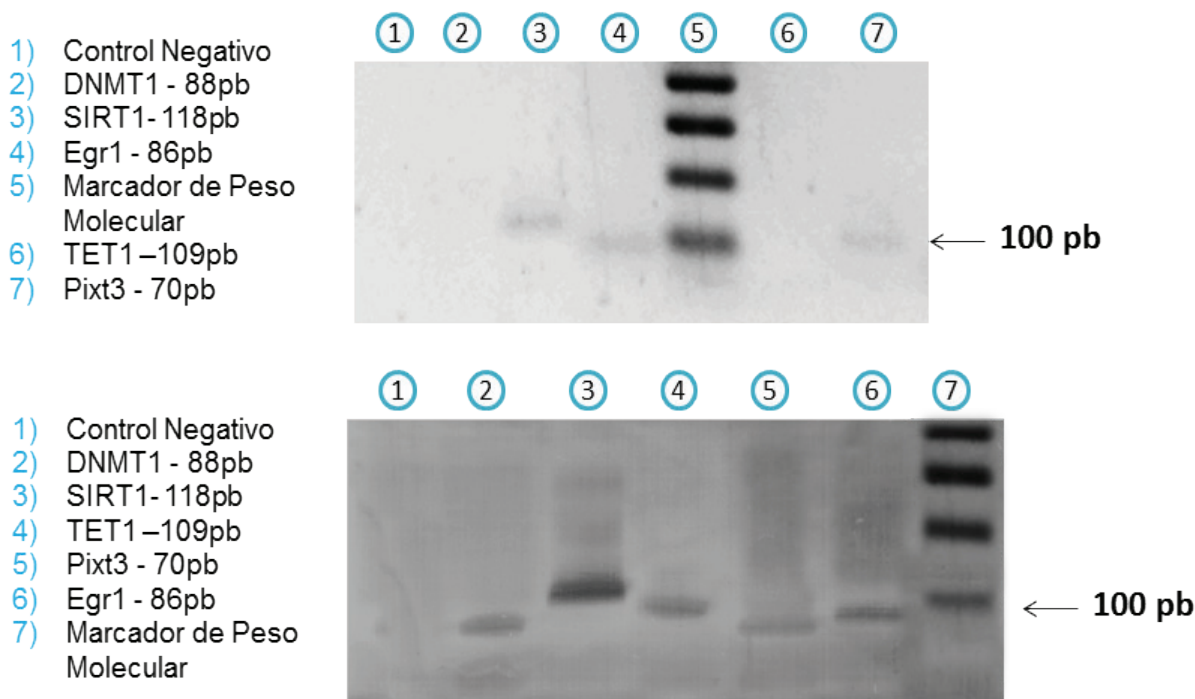


Figura 3. El panel superior corresponde a una electroforesis en gel de agarosa al 2% en presencia de Bromuro de Etidio y el panel inferior a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% revelada con Nitrato de Plata. En ambos casos se sembraron los productos de una PCR estándar de 35 ciclos para todos los primers de interés.

Como puede verse en la Figura 3, la electroforesis en gel de agarosa al 2% resultó no ser lo suficientemente sensible para poder detectar estas concentraciones de ADNc. Por su parte, la electroforesis en gel de poliacrilamida seguida por la tinción con nitrato de plata como método de revelado permitió observar las bandas correspondientes a todos los pares de primers por lo que fue escogida como la electroforesis a utilizar para resolver los productos de PCR y su subsiguiente cuantificación. Además, es interesante resaltar que empleando esta técnica se hizo visible la banda correspondiente al primer de TET1 lo que nos confirma que su ausencia en el gel de poliacrilamida utilizado para la comprobación del diseño de los primers se debía, principalmente, a la baja sensibilidad de la técnica y posiblemente a su tenue expresión.

4. PCR semicuantitativa

Habiendo seleccionado el tipo de electroforesis a utilizar para la cuantificación, el siguiente paso para llevar a cabo la técnica de PCR semicuantitativa consistió en determinar cuál es el número de ciclos que se va a utilizar en la reacción de PCR para cada par de primers de manera que la amplificación resulte suficiente para ser detectada en un gel de poliacrilamida al 10%, pero que no alcance la saturación para que la expresión pueda ser comparada. Para esto se procede, como se detalla en Materiales y Métodos, realizando PCRs de 17, 23, 29 y 35 ciclos y construyendo curvas sigmoideas de la densidad de la banda observada en el gel de poliacrilamida en función al número de ciclos empleados durante la reacción. Las curvas obtenidas, junto con cada gel, para todos los pares de primers se pueden observar en la Figura 4.1.

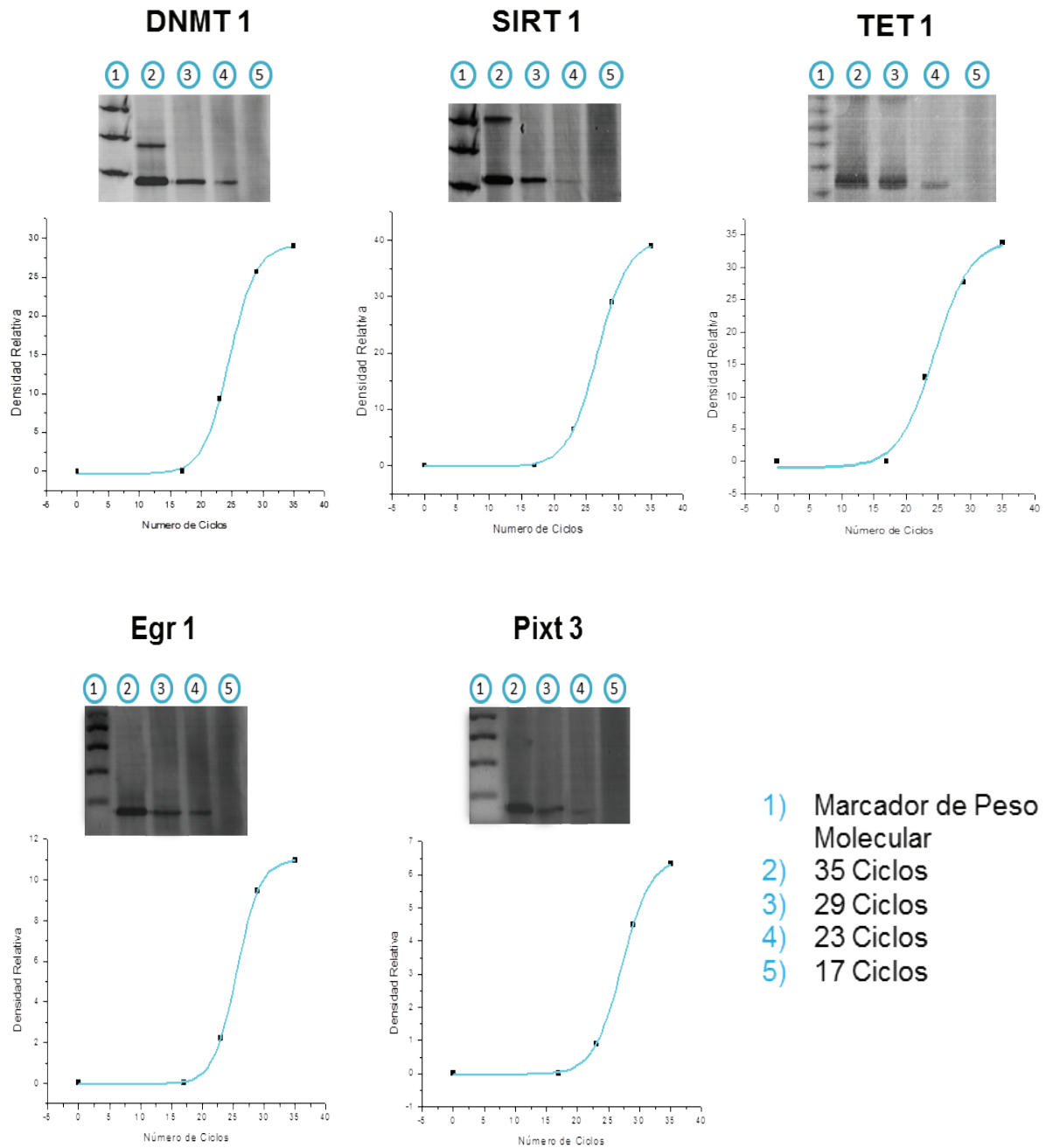


Figura 4.1. Para cada par de cebadores se muestran los geles de poliacrilamida al 10% revelados con plata y las curvas construidas a partir de la densitometría de los mismos.

Teniendo en cuenta las curvas obtenidas y por razones prácticas, se decidió, en todos los casos, que 26 ciclos resultaba el número más adecuado para realizar la PCR, debido a que esta cantidad aún mantiene la amplificación en la zona de crecimiento exponencial de la curva para todos los cebadores permitiendo así, no solo que las diferencias en los patrones de expresión puedan ser comparativas si no, también, realizar todas las reacciones en la misma corrida al mismo tiempo.

Llegado este punto, resulta relevante aclarar que las muestras sometidas al análisis por PCR semi-cuantitativa fueron aquellas obtenidas por la administración de nicotina definida en el 3er punto de la sección Materiales y Métodos, esto es, aquellas extraídas de los tres grupos de animales: el grupo Salino o control que no recibió ningún tratamiento, el grupo Crónico que fue expuesto a nicotina en el agua 24hs

al día durante dos semanas y el grupo Intermitente o D/N en el cual los peces fueron expuestos a la droga solo durante las horas de luz del ciclo luz/oscuridad (14hs/10hs) y privados de la misma durante las horas nocturnas, al igual que los crónicos, durante dos semanas. Los gels de poliacrilamida obtenidos durante dicho análisis con los productos de la reacción de PCR de 26 ciclos y los gráficos derivados de los mismos que se muestran en la Figura 4.2.

La cuantificación de la densidad de las bandas realizada con el programa Gel-Pro Analyzer señaló que no se habrían producido cambios en los patrones de expresión de los primers correspondientes a Puxt3 y Egr1, al menos cambios que fueran detectables con esta técnica, mientras que en el caso de DNMT1 los animales pertenecientes al grupo de exposición crónica han reducido su expresión y los miembros del grupo de exposición interrumpida (D/N) la han aumentado, en ambos casos en relación a los niveles observados en el grupo salino. Por su parte los patrones de SIRT1 muestran la misma tendencia de cambio que los de DNMT1 pero con menor significancia estadística en la diferencia exhibida por el grupo D/N en función al grupo salino. Finalmente, en el caso de TET1, se observa un aumento de su expresión en ambos grupos expuestos a la nicotina, aumento que es aún más significativo para el grupo D/N.

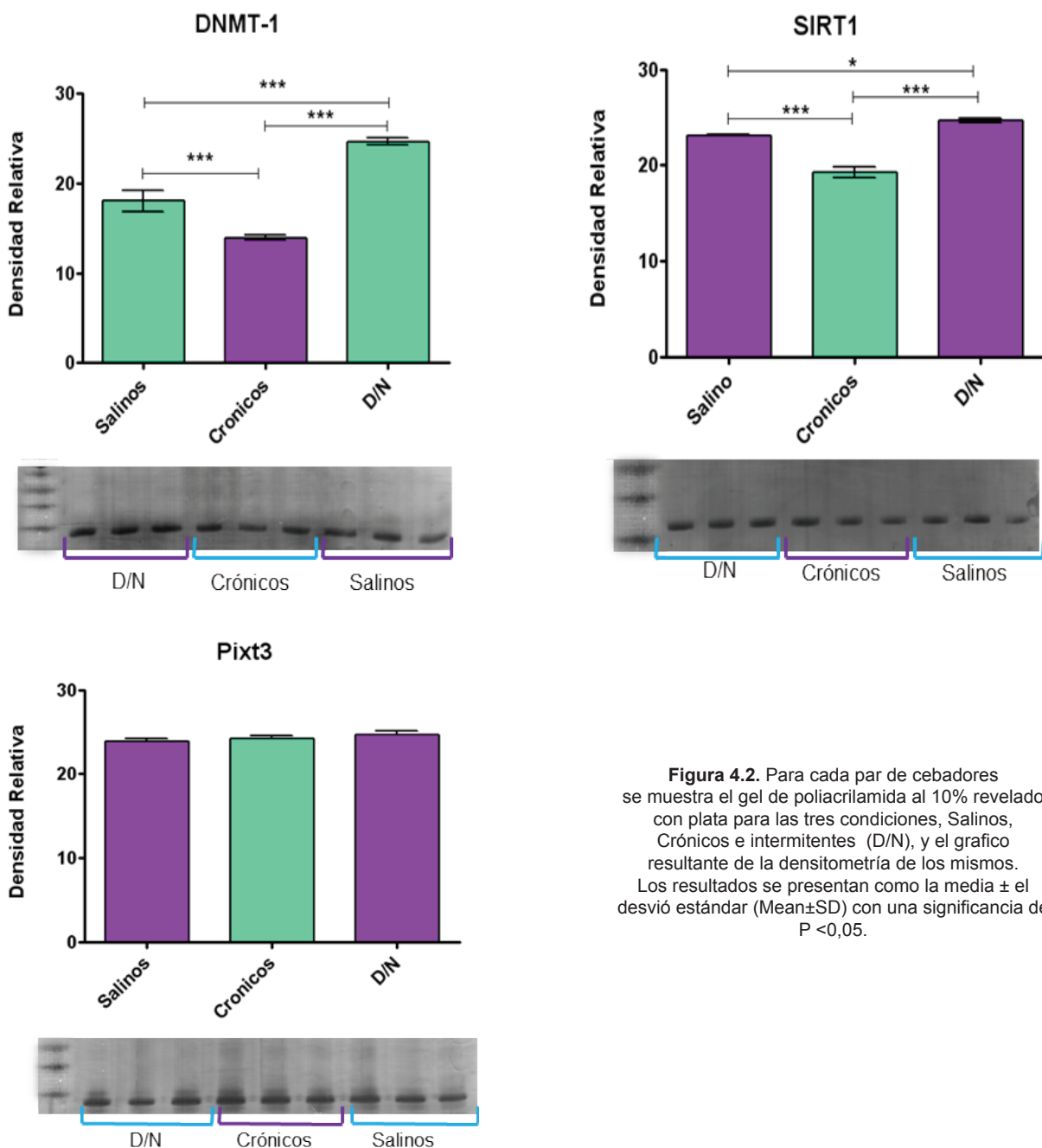
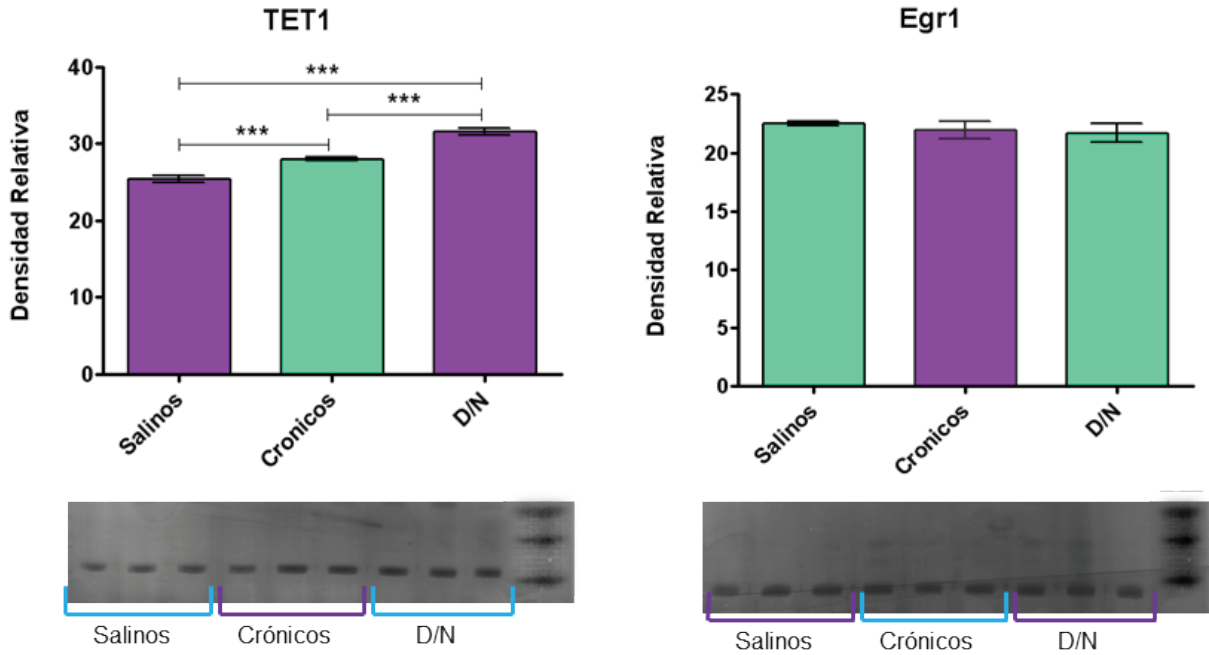


Figura 4.2. Para cada par de cebadores se muestra el gel de poliacrilamida al 10% revelado con plata para las tres condiciones, Salinos, Crónicos e intermitentes (D/N), y el gráfico resultante de la densitometría de los mismos. Los resultados se presentan como la media ± el desvío estándar (Mean±SD) con una significancia de P <0,05.



5. PCR cuantitativa o qPCR

Una vez puesta a punto la técnica de PCR semicuantitativa y finalizado el análisis, por medio de ésta, del modo en que varían los patrones de expresión de DNMT1, SIRT1, TET1, Pitx3 y Egr1 en los tres grupos de animales pertenecientes a la experiencia de exposición a nicotina se decidió evaluar, de manera representativa, los cambios en los patrones de DNMT1 y SIRT1 por qPCR con la finalidad de confirmar las tendencias observadas por el método semicuantitativo y determinar, además, su sensibilidad y límite de detección. Elegimos emplear estos dos genes por el patrón de cambios observados, en el caso de DNMT1 porque resultaron bien marcados para los tres grupos y en el caso de SIRT1 debido a la significancia estadística mínima en la modificación mostrada por los peces del grupo D/N.

En la siguiente tabla se pueden observar todos los datos de Eficiencia y Ct (ciclo umbral) para cada par de primers, por duplicado, arrojados por el equipo de PCR en Tiempo Real que fueron utilizados, luego, para el cálculo del cambio de expresión relativa mediante la ecuación 3 que se encuentra desarrollada en detalle en la sección Materiales y Métodos.

Muestra	Ct	Eficiencia	Promedio Ct	Promedio Eficiencia
18S-Salinos	30.36	0,97651448	30,18	0,99234114
	30.00	1,0081678		
18S-Cronicos	30.56	0,9842665	30,705	0,9867826
	30.85	0,98929871		
18S-D/N	30.88	0,95343966	30,76	0,97548665
	30.64	0,99753365		
DNMT1-Salinos	22.44	1,04079791	22,585	1,06456605
	22.73	1,0883342		
DNMT1-Cronicos	26.15	1,09122133	26,07	1,06319404
	25.99	1,03516676		
DNMT1-D/N	20.53	0,97196862	20,585	0,98811676
	20.64	1,00426489		
SIRT1-Salinos	27.11	1,10184168	27,055	1,11916371
	27.00	1,13648575		
SIRT1-Cronicos	30.74	1,06395393	30,85	1,08313982
	30.96	1,1023257		
SIRT1-D/N	26.33	1,04927386	26,19	1,07386525
	26.05	1,09845664		

Para el análisis de estos datos, que nos permitieron determinar la existencia de un cambio relativo en la expresión de los ARN mensajeros, se utilizó el método denominado "Gene expression's CT Difference" (GED) descrito en detalle por Schefe y colaboradores en el 2006. Aplicando este método se comparan los valores de CT de una, o varias, muestra de interés (**SOI**), en nuestro caso de DNMT1 y SIRT1 para las dos condiciones de tratamiento que implicaron exposición a nicotina, con respecto a una muestra calibradora (**Cal S**), en este caso los mismos dos genes pero expresados en el grupo control o salinos, teniendo en cuenta las eficiencias individuales de cada curva de amplificación en cada tubo. Por su parte 18S, en cada una de las condiciones de tratamiento, fue empleado como gen de referencia y utilizado, por lo tanto, para normalizar los valores de las muestras de interés y calibradora respectivamente.

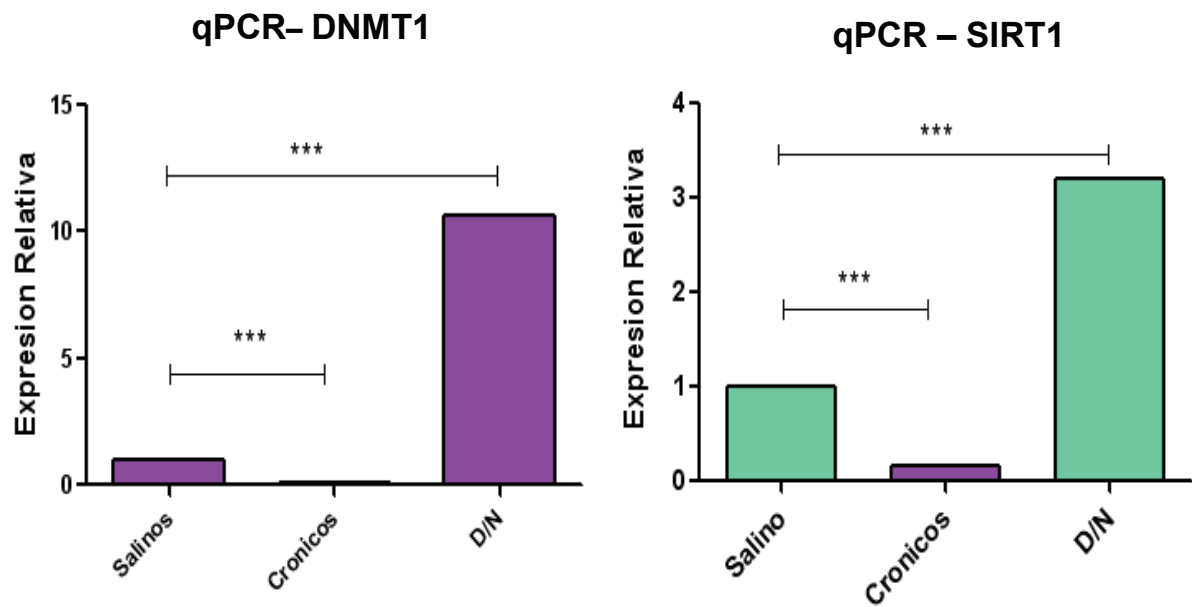


Figura 5. El panel de la izquierda representa los cambios en los patrones de expresión obtenidos por qPCR para el gen DNMT1 mientras que el de la derecha los muestra para SIRT1. En ambos casos los resultados se presentan como la media \pm el desvío estándar (Mean \pm SD) con una significancia de $P < 0,05$.

Finalmente, en la Figura 5 se muestran los cambios detectados con la aplicación de la técnica de qPCR para DNMT1 y SIRT1. Para ambos genes se observaron modificaciones significativas entre el grupo control y los dos grupos expuestos a nicotina y asimismo, también, entre el grupocrónico y el D/N.

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los pocos antecedentes en el estudio de las propiedades reforzantes con nicotina y los escasos estudios con un modelo animal como los peces cebra, en el presente trabajo hemos intentado la implementación de un nuevo método de CPP basándonos en el trabajo, con peces cebra, realizado por Valente y col. (2012). En dicho trabajo los peces habían asociado un piso con rayas con un shock eléctrico y un piso gris sin ningún tipo de asociación. Nosotros pretendimos hacer lo mismo con la nicotina asociándola con un color específico en una mitad de la base de la pecera de manera tal que si se cambiaba la posición del color el pez buscaría el área de la pecera con el color asociado a la droga.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en dicho procedimiento, posiblemente, porque para establecer una fuerte asociación nicotina-entorno de este tipo debería condicionarse al pez durante más días. En nuestro caso se utilizaron 3 días de condicionamiento ya que con un método estándar es suficiente para detectar preferencia (Kedikian y col. 2013). Otra razón por la cual el CPP no resultó podría radicar en la elección de colores, si bien fueron escogidos partiendo de la base de que ninguno resulta aversivo para el pez cebra (método no sesgado) (Avdesh y col., 2012) la selección de uno de los colores como aversivo podría haber arrojado otro tipo de resultados (método sesgado). Utilizamos el método no sesgado porque ha demostrado ser más eficiente para la nicotina. Finalmente, quizás la luz utilizada para reflejar los colores fuera un estímulo demasiado fuerte y por lo tanto aversivo, debido a la alta sensibilidad a la luz que poseen los peces, generándoles estrés y dificultando la asociación droga-entorno.

Entonces decidimos cambiar el tipo de estudio principalmente porque poner a punto un CPP de las características del que deseábamos utilizar podría demandar un tiempo demasiado extenso para realizar un trabajo de tesina. Otra pregunta que se desarrolla en el laboratorio es relativa al síndrome de abstinencia generado por la nicotina por lo que decidimos volcarnos a ella como objeto de estudio para el presente trabajo. La nicotina, como droga de abuso, posee la capacidad de generar síndrome de abstinencia poco tiempo después de que su consumo se ve interrumpido, lo que se ha consolidado en la actualidad como la mayor causa de reincidencia del hábito de fumar. La gran mayoría de los estudios realizados en torno a esto emplean como modelo roedores a los que se les administra la droga mediante bombas osmóticas (Ohmura y col., 2011). El problema con esta metodología es que los animales reciben continuamente la droga cambiando la homeostasis del individuo. Es decir, sirven para estudiar la abstinencia, pero tiene poco correlato con la abstinencia como fenómeno fisiológico. Teniendo en cuenta estos factores se decidió evaluar el síndrome de abstinencia a la nicotina en peces cebra, utilizando un protocolo estándar y un protocolo sin antecedentes consistente en una exposición intermitente.

En el estudio de la neurobiología de la nicotina, los trabajos que emplean al pez cebra como modelo son bastante escasos y de hecho, en la actualidad, no se cuenta con ningún antecedente en torno a la abstinencia que esta droga genera en dicho modelo. En nuestro laboratorio fue demostrado el efecto reforzador de la nicotina en peces (Kedikian y col. 2013). Partiendo de esta base, nos planteamos si el pez cebra podría ser utilizado como modelo de abstinencia teniendo en cuenta que como modelo experimental presenta varias ventajas: ha sido propuesto como una alternativa a modelos de mamíferos en varios campos, incluyendo las neurociencias (Guo S., 2004), puede desarrollar una variedad de comportamientos complejos como el aprendizaje, la adicción, la agresión, y así como la interacción social, es fácil de mantener y barato (William y Bally-Cuif, 2010).

Los síntomas asociados al período de abstinencia a la nicotina se pueden extender hasta un año o más, luego de la última exposición, por lo que resulta lógico suponer que los cambios biológicos involucrados en este periodo poseen en el potencial de mantenerse estables a largo plazo. Por esta razón los factores epigenéticos se han establecido como firmes candidatos para ser evaluados como un mecanismo interviniente en este proceso (Renthal y Nestler, 2008). Las señales gatilladas por la activación de segundos mensajeros en los procesos adictivos no pueden justificar la mantención de la actividad sináptica en los procesos de largo plazo involucrados en la adicción como la abstinencia. En la actualidad solo dos grupos (Pastor y col., 2011; Kily y col., 2008) han realizado trabajos en los que se examinan las modificaciones en ciertos factores epigenéticos luego de la exposición a nicotina y en ambos casos se emplearon roedores como modelo experimental y evaluaron las propiedades reforzantes de la droga.

Por otro lado, los factores de transcripción sirven como un mecanismo clave por el que la expresión de diferentes genes se pueda controlar, ya que se unen a secuencias reguladoras de ADN altamente específicas. Además, ya se ha visto que ciertos factores de transcripción se ven activados luego de la exposición a nicotina (Pascual y col., 2009) por lo que decidimos evaluar cómo se modifica, con la abstinencia generada por esta droga, un factor de transcripción muy estudiado como Egr1 que posee una expresión basal y en un factor que se expresa en las neuronas dopaminérgicas como es Pitx3 cuya transcripción aumenta cuando dicho tipo neuronal se activa.

Desde un punto de vista general nuestros resultados evidenciaron que no resulta equivalente exponer los animales a nicotina de forma crónica o de forma intermitente (día/noche) dado que, para todos los factores epigenéticos evaluados, los patrones de expresión variaron entre un modelo de exposición y el otro además de en función del grupo salino.

Particularmente centrándonos, de todos los factores evaluados, en las enzimas involucradas con la metilación del ADN, DNMT1 (metiltransferasa de mantenimiento) y TET1 (desmetilasa), se encontró que para el grupo de exposición crónica los niveles de DNMT1 disminuyen y los de TET1 aumentan mientras que para el grupo intermitente (D/N) aumentan su expresión ambas enzimas. Esto podría interpretarse como que cuando la nicotina es constante durante 14 días sería más significativa la desmetilación que la metilación del ADN, mientras que en el grupo día/noche ambos procesos estarían aumentados. En este segundo caso podría considerarse que los niveles generales de metilación no presentarían cambios pero podría estar ocurriendo la activación y el silenciamiento de genes diferentes. Este fenómeno aportaría mayor plasticidad al sistema, ya que existirían modulaciones negativas y positivas en la expresión de genes diferentes.

Por su parte, SIRT1 (una histona desacetilasa) muestra niveles aumentados para los peces del grupo D/N y disminuidos para los del grupo crónico lo que nos permite inferir que la exposición intermitente de la nicotina desencadena la activación de genes por desacetilación mientras que la exposición crónica deriva en una menor activación de genes por el mismo mecanismo. Esto podría estar directamente relacionado con los datos obtenidos con la expresión de las metilasas y desmetilasas.

En el caso de los dos factores de transcripción examinados, para ninguna de las condiciones de tratamiento se evidenciaron cambios en los patrones de expresión. Esto podría ser explicado por el periodo de 24hs entre la última exposición a la droga y el momento en que los animales fueron sacrificados ya que, en su carácter de factores de transcripción, ambos modifican sus niveles para gatillar una determinada reacción pero luego retornan rápidamente a sus niveles basales.

Asimismo, una parte importante de este trabajo consistió en poner a punto la técnica de PCR semicuantitativa y establecer su sensibilidad en función de la qPCR. Con respecto a esto, pudimos observar que para DNMT1 y SIRT1, los únicos dos genes sometidos a la cuantificación por qPCR, las tendencias obtenidas entre la PCR semicuantitativa y la cuantitativa se mantuvieron, es decir, en ambos casos, el grupo crónico mostró una disminución significativa en su expresión mientras que el grupo intermitente (D/N) expuso un aumento en la misma. Resulta interesante destacar que si bien, debido a la mayor sensibilidad de la técnica de qPCR por sobre la de PCR semicuantitativa, la modificación en la expresión de SIRT1 para los peces de exposición intermitente es de igual significancia estadística que la observada en el mismo grupo para DNMT1, si nos centramos en los números crudos, el cambio resulta ser de aproximadamente un tercio, lo que concuerda perfectamente con lo expuesto por la PCR semicuantitativa. Estos resultados sugieren que la PCR semicuantitativa es una herramienta confiable y menos costosa cuando se desea evaluar los niveles de expresión de los RNAm, por lo menos para ciertos factores epigenéticos y de transcripción. Es nuestra idea ampliar los estudios para verificar si puede ser utilizada con otros genes de segundos mensajeros, por ejemplo.

Si bien resta evaluar el modo en que se comportan muchos otros factores epigenéticos y de transcripción ante la exposición a nicotina y durante el periodo de abstinencia que esta genera, en este trabajo se abordó por primera vez este análisis en un modelo de pez cebra. Asimismo la implementación de la exposición intermitente que se propuso, mostró resultados diferenciales en relación a la exposición crónica empleada en la mayoría de los estudios de drogas de abuso por lo que la presente tesina aportó un modelo novedoso cuya aplicación permite alcanzar una mayor similitud fisiológica con lo que ocurre en el consumo humano de nicotina. Esto se basa en que ha sido demostrado que para que animales

de laboratorio se vuelvan adictos a una droga esta debe ser administrada en forma intermitente y no en forma continua. La forma continua puede servir como modelo de abstinencia, pero resulta ser menos fisiológico que los modelos intermitentes.

Nuestro próximo objetivo es evaluar el CPP de peces cebra luego de los 2 tratamientos con nicotina descritos aquí, y examinar el modo en que se comportan los patrones de expresión de estos factores de transcripción y epigenéticos. La comparación entre los niveles de expresión de los factores estudiados antes y después del CPP puede darnos una idea de la participación de estos factores en la formación de una preferencia por la nicotina. Además, se evaluará que ocurre con el CPP de los animales sometidos a los 2 tipos de pre- tratamientos con nicotina, tratando de evaluar si los factores analizados aquí influyen en dicho comportamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Anthony JC, Warner LA, Kessler RC (1994). *Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances and inhalants: basic findings from the National Comorbidity Study*. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*. 2, 244-268.
- Avdesh A., Martin-Iverson MT., Mondal A., Chen M., Askraba S., Morgan N., ... Martins RN. (2012). *Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory*. *Journal of Alzheimer's Disease*. 28, 459-469.
- Balfour DJ. (2004). *The neurobiology of tobacco dependence: a preclinical perspective on the role of the dopamine projections to the nucleus accumbens*. *Nicotine Tobacco Research*. 6, 899-912.
- Balfour, DJK., Benwell, MEM., Birrell, CE., Kelly, R.J., y Al-Aloul, M. (1998). *Sensitization of the mesoaccumbens dopamine response to nicotine*. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. 59, 1021-1030.
- Balfour, DJK., Wright, AE., Benwell, MEM., y Birrell, CE. (2000). *The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence*. *Behavioral and Brain Research*. 113, 73-83.
- Bandway, A y Evans, M. (1983). *Opposite effects of chronic administration and subsequent withdrawal of drugs of dependence on the metabolism and disposition of endogenous and exogenous tryptophan in the rat*. *Alcohol and Alcoholism*. 18, 369-382.
- Barik J, Wonnacott S. (2009). *Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS*. In *Nicotine Psychopharmacology* (pp. 173-207). Springer Berlin Heidelberg.
- Benowitz NL. (2010). *Nicotine Addiction*. *New England Journal of Medicine* 362, 2295-2303.
- Berger SL., Kouzarides T., Shiekhattar R., Shilatifard A. (2009). *An operational definition of epigenetics*. *Genes & development*. 23, 781-3.
- Berghmans S., Jette C., Langenau D., Hsu K., Stewart R., Look T., y Kanki JP. (2005). *Making waves in cancer research: new models in the zebrafish*. *Biotechniques*, 39, 227.
- Black YD., Maclaren FR., Naydenov AV., Carlezon W. A., Baxter MG., Konradi C. (2006). *Altered attention and prefrontal cortex gene expression in rats after binge-like exposure to cocaine during adolescence*. *The Journal of neuroscience*. 26, 9656-9665.
- Breitaud S., Li Q., Lockwood BL., Kobayashi K., Lin E., Guo S. (2007). *A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish*. *Neuroscience* 146, 1109-1116.
- Briellmaier JM., McDonald CG., Smith RF. (2008). *Nicotine place preference in a biased conditioned place preference design*. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 89, 94-100.
- Brownell JE., Allis CD. (1996). *Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation*. *Current Opinion Genetic & Development*. 6, 176-84.
- Caggiula AR., Donny EC., White AR., Chaudhri N., Booth S., Gharib M A., Hoffman A. (2001). *Cue dependency of nicotine self-administration and smoking*. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 70, 515-30.
- Calcagnetti DJ., Schechter MD. (1994). *Nicotine place preference using the biased method of conditioning*. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 18, 925-933.

Carlezon WA., Thome J., Olson VG., Lane-Ladd SB., Brodtkin E. S., Hiroi N., ... Nestler EJ. (1998). *Regulation of cocaine reward by CREB*. Science. 282, 2272-2275.

Carmody TP. (1989). *Affect regulation, nicotine addiction, and smoking cessation*. Journal of Psychoactive Drugs. 2, 331-342.

Changeux JP., Bertrand D., Corringier PJ., Dehaene S., Edelman S., Léna C., ... y Zoli M. (1998). *Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement*. Brain Research Reviews. 26, 198-216.

Chomczynski, P. (1993). *A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples*. Biotechniques.15, 532-4.

Court JA., Lloyd S., Thomas N., Piggott MA., Marshall EF., Morris CM., Lamb H., Perry RH., Johnson M., Perry EK. (1998). *Dopamine and nicotinic receptor binding and the levels of dopamine and homovanillic acid in human brain related to tobacco use*. Neuroscience. 87, 63-78.

Curtis J., Lehnert P. (2008). *Withdrawal from alcohol or drugs*. Healthwise, Inc.

Dani JA., Bertrand D. (2007). *Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system*. Annual review of pharmacology and toxicology. 47, 699-729.

Dani JA., De Biasi M. (2001). *Cellular mechanisms of nicotine addiction*. Pharmacology Biochemistry Behavior.70, 439-46.

Darland T., Dowling JE. (2001). *Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 98, 11691-11696.

Domino EF. (1998). *Tobacco Smoking and Nicotine Neuropsychopharmacology: Some Future Research Directions*. Neuropsychopharmacology. 18, 456-468.

Donny EC., Chaudhri N., Caggiula AR., Evans-Martin FF., Booth S., Gharib MA., Clements LA., Sved AF. (2003). *Operant responding for a visual reinforcer in rats is enhanced by noncontingent nicotine: implications for nicotine self-administration and reinforcement*. Psychopharmacology (Berlin). 169, 68-76.

Dooley K., Zon L. (2000). *Zebrafish: a model system for the study of human disease*. Current Opinion Genetic & Development. 10, 252-256.

Eberwine J. (1999). *Chapter 26: Transcriptional Factors in the Central Nervous System*. Siegel GJ. Agranoff BW., Fisher SK., Albers RW., & Uhler MD. (Eds.). Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Academic Press.

Everitt BJ., Wolf ME. (2002). *Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective*. The Journal of Neurosciences.22, 3312-20.

Feinberg AP. (2007). *Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease*. Nature 447, 433-440.

Gahring LC., Rogers SW. (2006). *Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells*. The AAPS Journal.7, 885-94.

Gerlai R., Lahav M., Guo S., Rosenthal A. (2000). *Drinks like a fish: zebrafish (Daniorerio) as a behavior genetic model to study alcohol effects*. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 67, 773-82.

Goldberg SR. y Henningfield JE. (1988). *Reinforcing effects of nicotine in humans and experimental animals responding under intermittent schedules of iv drug injection*. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 30, 227-234.

- Gotti C., Clementi F. (2004). *Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology*. Progress in neurobiology 74, 363-96.
- Gotti C., Riganti L., Vailati S., Clementi F. (2006). Brain neuronal nicotinic receptors as new targets for drug discovery. Current pharmaceutical design 12, 407-28.
- Gräff J., Mansuy I. (2008). *Epigenetic codes in cognition and behaviour*. Behavioral. Brain Research. 192, 70-87
- Groos J. y Stitzer ML. (1989). *Nicotine replacement: ten-week effects on tobacco withdrawal symptoms*. Psychopharmacology. 98, 331-334.
- Grunberg NE. (1990). *The inverse relationship between tobacco use and body weight*. Research Advances in Alcohol and Drug Problems 273.
- Guo S. (2004). *Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish?* Genes Brain Behav. 3, 63–74
- Guyon JR., Steffen LS., Howell MH., Pusack T.J., Lawrence C., y Kunkel L.M. (2006) *Modeling human muscle disease in zebrafish*. BiochimicaetBiophysicaActa(BBA)-Molecular Basis of Disease. 1772, 205-215.
- Hildebrand BE., Nomikos GG., Bondjers C., Nisell M., Svensson TH. (1997). *Behavioral manifestations of the nicotine abstinence syndrome in the rat: peripheral versus central mechanisms*. Psychopharmacology (Berlin). 129, 348-56.
- Hsieh J., Gage FH. (2005). *Chromatin remodeling in neural development and plasticity*. Current opinion in cell biology. 17, 664-71.
- Hughes JR. (1992a). *Tobacco withdrawal in self-quitters*. Journal of Consulting and Clinical Psychology. 60, 689-697.
- Hughes JR. (1992b). *The nicotine withdrawal syndrome: a brief review and update*. International Journal of Smoking Cessation. 1, 21-26.
- Hughes JR., Higgins ST. y Hatsukami DK. (1990). *Effects of abstinence from tobacco: a critical review*. Research Advances in Alcohol and Drug Problems 10, 317-398.
- Hyman SE. y Malenka RC. (2001). *Addiction and the brain: The neurobiology of compulsion and its persistence*. Nature Review. Neuroscience. 2, 695–703.
- Jiang Y., Langley B., Lubin FD., Renthal W., Wood MA., Yasui DH., ...Beckel-Mitchener AC. (2008). *Epigenetics in the nervous system*. The Journal of Neuroscience. 28, 11753-11759.
- Jones IW. y Wonnacott S. (2004). *Precise localization of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors on glutamatergic axon terminals in the rat ventral tegmental area*. Journal of Neuroscience. 24, 11244–11252.
- Kalda A., Heidmets LT., Shen HY., Zharkovsky A., y Chen, JF. (2007). *Histone deacetylase inhibitors modulates the induction and expression of amphetamine-induced behavioral sensitization partially through an associated learning of the environment in mice*. Behavioural brain research. 181, 76-84.
- Kedikian X., Faillace M. P., y Bernabeu R. (2013). *Behavioral and Molecular Analysis of Nicotine-Conditioned Place Preference in Zebrafish*. PloS one. 8, e69453.
- Kily LJ., Cowe YC., Hussain O., Patel S., McElwaine S., Cotter FE. (2008). *Gene expression changes in a zebrafish model of drug dependency suggest conservation of neuroadaptation pathways*. Journal of Experimental Biology. 211, 1623–34.

Klee EW., Schneider H., Clark KJ., Cousin MA., Ebbert JO., Hooten WM., ... y Ekker SC. (2012). *Zebrafish: a model for the study of addiction genetics*. Human genetics. 131, 977-1008.

Koob GF. y Le Moal M. (2001). *Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis*. Neuropsychopharmacology. 24, 97-129.

Koob GF. y Le Moal M. (2005). *Neurobiology of Addiction*. Academic Press.

Kouzarides T. (2007) *Chromatin Modifications and Their Function*. Cell. 128, 693-705.

Kumar A., Choi KH., Renthal W., Tsankova NM., Theobald DE., Truong HT., ... y Nestler EJ. (2005). *Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum*. Neuron. 48, 303-314.

Kuo MH. yAllis CD. (1998). *Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation*. Bioessays. 20, 615-26.

Le Foll B. y Goldberg SR. (2005). *Nicotine induces conditioned place preferences over a largerange of doses in rats*. Psychopharmacology (Berlin). 178, 481-492.

Le Moal M. y Koob GF. (2007). *Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives*. European Neuropsychopharmacology.17, 377-393.

Li B., Carey M. y Workman JL. (2007). *The role of chromatin during transcription*. Cell. 128, 707-719.

Li E., Bestor TH., Jaenisch R. (1992). *Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality*. Cell. 69, 915-926.

Lieschke JL. y Currie PD. (2007). *Animal models of human disease: zebrafish swim into view*. Nature Review Genetics. 8, 353-367.

Lopez-Patino MA., Yu L., Cabral H., Zhdanova IV. (2007). *Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish*. Physiology & Behavior. 93, 160-171.

Malin DH., Lake JR., Carter VA., Cunningham JS., Hebert KM., Conrad DL., Wilson OB. (1994). *The nicotinic antagonist mecamylamine precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat*. Psychopharmacology (Berlin).115, 180-4.

Malin DH., Lake JR., Newlin-Maultsby P., Roberts LK., Lanier JG., Carter VA., Cunningham JS., Wilson OB. (1992). *Rodent model of nicotine abstinence syndrome*. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 43, 779-784.

Malin DH., Lake JR., Upchurch TP., Shenoj M., Rajan N., Schweinle WE. (1998). *Nicotine abstinence syndrome precipitated by the competitive nicotinic antagonist dihydro-beta-erythroidine*. Pharmacology Biochemistry and Behavior.60, 609-13.

Mansvelder HD. y McGehee DS.(2000). *Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine*.Neuron.27,349-57.

Markou A., Kosten TR., Koob GF. (1998). *Neurobiological Similarities in Depression and Drug Dependence: A Self-Medication Hypothesis*. Neuropsychopharmacology. 18, 135-174.

McClung C A., Ulery PG., Perrotti LI., Zachariou V., Berton O. y Nestler EJ. (2004). *Δ FosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain*. Molecular Brain Research. 132, 146-154.

McClung CA. yNestler EJ. (2003). *Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and Δ FosB*. Nature neuroscience. 6, 1208-1215.

- Meyer, A. y Van de Peer Y. (2005). *From 2R to 3R: Evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD)*. *Bioessays*. 27, 937–945.
- Morrison CF. (1974). *Effects of nicotine and its withdrawal on the performance of rats on signaled and unsignaled avoidance schedules*. *Psychopharmacologia*. 38, 25-35.
- Nelson JS. (2006). *Fishes of the world*. 4thedn. Wiley, New York.
- Nestler EJ.(2008). *Review.Transcriptional mechanisms of addiction: Role of Delta FosB*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*. 363, 3245–3255.
- Ninkovic J. y Bally-Cuif L. (2006). *The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse*. *Methods*.39,262–74.
- O'Brien MS. y Anthony JC. (2005). *Risk of becoming cocaine dependent: epidemiological estimates for the United States, 2000-2001*. *Neuropsychopharmacology*. 30, 1006-1618
- Ohmura Y., Jutkiewicz EM., Yoshioka M., y Domino EF. (2011). *5-Hydroxytryptophan attenuates somatic signs of nicotine withdrawal*. *Journal of pharmacological sciences*. 117, 121-124.
- Pascual MM., Pastor V., Bernabeu RO. (2009). *Nicotine-conditioned place preference induced CREB phosphorylation and Fos expression in the adult rat brain*. *Psychopharmacology*. 207, 57-71.
- Pastor V., Host L., Zwiller J., Bernabeu R. (2011). *Histone deacetylase inhibition decreases preference without affecting aversion for nicotine*. *Journal of neurochemistry*.116, 636-45.
- Patti L., Raiteri L., Grilli M., Parodi M., Raiteri M., Marchi M. (2006). *P2X(7) receptors exert a permissive role on the activation of release-enhancing presynaptic alpha7 nicotinic receptors co-existing on rat neocortexglutamatergic terminals*. *Neuropharmacology*.50, 706.
- Picciotto MR., Zoli M., Rimondini R., Lena C., MarubioLM.,Pich EM., Fuxe K., Changeux JP. (1998). *Acetylcholine receptors containing the $\beta 2$ subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine*. *Nature*.391,173–177.
- Pokholok DK., Harbison CT., Levine S., Cole M., Hannett NM., Lee TI., ... y Young RA. (2005). *Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast*. *Cell*. 122, 517-527.
- Pontieri F., Tanda G., Orzi F., Di Chiara G. (1996) *Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs*. *Nature*.382, 255-7.
- Postlethwait J., Amores A., Force A., Yan YL. (2009). *Thezebrafish genome*. *Essential Zebrafish Methods: Genetics and Genomics: Genetics and Genomics*, 47.
- Renthal W., Nestler EJ.(2008). *Epigenetic mechanisms in drug addiction*. *Trends in molecular medicine*.14, 341-50.
- Rink E., Y Wullimann MF. (2002). *Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (Daniorerio) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost*. *Brain research bulletin*. 57, 385-387.
- Rinkwitz S., Mourrain P., Becker T. (2011). *Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences*. *Progress in neurobiology*. 93, 231-243.
- Rose JE., Levin ED. (1991). *Interrelationships between conditioned and primary reinforcement in the maintenance of cigarette smoking*. *British journal of addiction*. 86, 605-609.
- Rose JE., y Corrigan WA. (1997). *Nicotine self-administration in animals and humans: similarities and differences*. *Psychopharmacology (Berlin)*. 130, 28–40.

Rubinstein AL. (2003). *Zebrafish: from disease modeling to drug discovery*. Current Opinion in Drug Discovery Development. 6, 218-223.

Rubinstein AL. (2006). *Zebrafish assays for drug toxicity screening*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology. 2, 231-240.

Schefe JH., Lehmann KE., Buschmann IR., Unger T., Funke-Kaiser, H. (2006). *Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's C T difference" formula*. Journal of molecular medicine.84, 901-910.

Shin JT. y Fishman MC. (2002). *From zebrafish to human: modular medical models*. Annual review of genomics and human genetics. 3, 311-340.

Stoehr JD. (2006) *The Neurobiology of Addiction*. Philadelphia: Chelsea House

Stolerman IP. y Jarvis MJ. (1995). *The scientific case that nicotine is addictive*. Psychopharmacology (Berlin). 117, 2–10.

Tzschentke TM. (1998). *Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues*. Progress in neurobiology.56, 613-72.

Valente A., Huang KH.,Portugues R., Engert F. (2012). *Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish*. Learning & Memory. 19, 170-177.

Wagner FA., Anthony JC. (2002). *From first drug use to drug dependence; developmental periods of risk for dependence upon marijuana, cocaine, and alcohol*. Neuropsychopharmacology.26, 479– 488.

Weissenborn R., Robbins TW.,Everitt BJ. (1997). *Effects of medial prefrontal or anterior cingulate cortex lesions on responding for cocaine under fixed -ratio and second-order schedules of reinforcement in rats*. Psychopharmacology (Berlin).134, 242-57.

Westerfield M. (2007). *The Zebrafish Book.A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Daniorerio)*. 5th ed, Eugene: University of Oregon Press.

Wise RA.(1996.). *Neurobiology of addiction*. Current opinion in neurobiology. 6, 243-251.

Woods IG., Kelly PD., Chu F., Ngo-Hazelett P., Yan YL., Huang H. (2000). *A comparative map of the zebrafish genome*. Genome Research. 10, 1903–1914.

Woolf NJ. (1991). *Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord*. Progress in neurobiology. 37, 475-524.

