



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

MDe

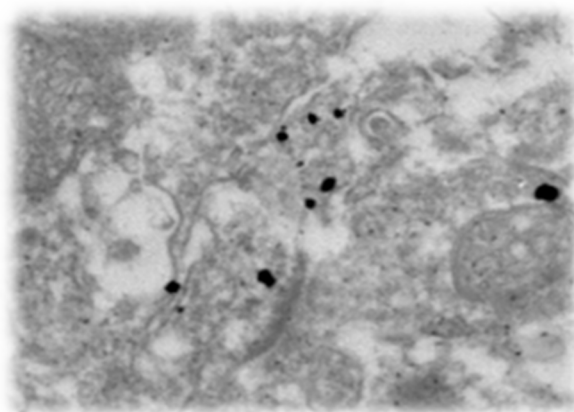
Master eta Doktorego Eskola
Escuela de Máster y Doctorado
Master and Doctoral School

MASTER AMAIERAKO LANA
NEUROZIENTZIEN MASTERRA

INGURUNE ABERASTUAREN ERAGINA C57BL6J SAGUEN CB_1 HARTZAILEETAN NERABEZAROAN BOTILOI OHITURAREN ONDOREN

Neurozientziak Saila, Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea,

Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)



EGILEA:

Maitane Serrano Murgia

ZUZENDARIAK:

Gontzal García del Caño

Irantzu Rico Barrio

AURKIBIDEA:

LABURPENA.....	5
SARRERA.....	6
MATERIALA ETA METODOA.....	8
EMAITZAK.....	13
EZTABAIDA.....	16
BIBLIOGRAFIA.....	18

LABURPENA:

Betekadan oinarritutako alkohol kontsumoa adingabeko gazteen artean ohikoa bilakatzen ari den ohitura kaltegarria da. Mundu mailan, batez beste, 15,3 urteko adinetik aurrera hasten da substantzia psikoaktibo honen kontsumoa, nerabezaroan hain zuzen ere. Garai horretan, garunaren garapena ez da oraindik bukatu; horrexegatik, alkohola nerabezaroan edateak epe laburreko eta epe luzeko ondorio sozial, fisiko eta psikiko larriak eragin ditzake. Saguekin egin diren ikerketatan ikusitako kalteak anitzak dira; besteak beste, garunaren hantura eta aktibazio-patroi atipikoak, disfuntzio sinaptikoa eta hipokampo bolumenaren murrizketa. Sistema endokannabinoiden CB_1 hartzaillearen dentsitatearen zein funtzionalitatearen murrizketa ikusi da. Ingurune aberastua (IA) garuneko egituretan eragin onuragarria duen paradigma esperimental da; izan ere, IAk alkoholak epe luzera eragindako hainbat kalte lehengora ditzake. Ikerketa honen bidez, ingurune aberastuak dakarren hobekuntzaren azpian sistema endokannabinoidak izan lezaken rola aztertu dugu. Horretarako, nerabezaroan, betekada gisako alkohol kontsumoak CB_1 hartzaillearen espresioan eragiten dituen epe luzerako aldaketak aztertu ditugu animalia-eredu baten hartz-bihurguneko sinapsietan, eta, halaber, ingurune aberastuak aldaketa horien gainean dituen ondorioak. Zehazki, lau talde esperimentaletako ([i] kontrol, [ii] alkohol, [iii] ingurune aberastua eta [iv] ingurune aberastua + alkohol) C57BL6J saguen hartz-bihurgunean, immunoelektroi-mikroskopia bidez, CB_1 partikula immunoerreaktiboaren dentsitatea aztertu dugu sinapsi inhibitzaile zein kitzikatzaileetan. Analisi estatistikoak desberdintasun esanguratsuak frogatu ditu sinapsi inhibitzaile zein kitzikatzaileetan ohiko laborategiko baldintzetan eta ingurune aberastuan barneratutako saguen artean. Horrez gainera lau talde esperimentalen hartz-bihurgunetik eta Ammon adarretik (CA1-CA3 eremua) isolatutako sinptosoma gordinen laginetan, immunoblot entseguak burutu ditugu. Hala, CB_1 hartzaillearen eta 2-arakidonilglicerol (2-AG) kannabinoide endogenoaren sintesi- eta degradazio-entzimen (diazilglicerol lipasa α -DAGL α - eta monoazilglicerol lipasa -MGL-, hurrenez hurren) espresioa semikuantitatiboki aztertu genuen. Gure behin-behineko datuek ez dute talde esperimentalen arteko desberdintasunik detektatu hartz-bihurguneko mintz sinaptiko gordinetan aztertutako hiru proteinetan. Ordez, CA1-CA3 eremuan, gora-erregulazio esanguratsua aurkitu genuen DAGL α -ren espresioan ingurune aberastua + alkohol taldean, kontrol alkoholiko taldearekiko. Hartz-bihurgunean Western blot bidez lortutako emaitzak, lan honetan elektroi-mikroskopiaz lortutakoekin eta aldeztatik taldean ondo sendotutako datu esperimentalekin kontraesankorrak dira. Azterketa motaren eta erabilitako laginen arteko desberdintasunak itxurazko desadostasun horiek azal ditzakete. Beraz, paradigma esperimental honetan, sistema endokannabinoiden osagaien erregulazioa aztertzeko ikerketa gehiago beharko dira.

SARRERA:

Alkohola mundu mailan gehien kontsumitzen den sustantzia psikoaktiboa da, izan ere, 15-64 urte bitarteko populazioaren %91,2k noizbait kontsumitu izan du⁽¹⁾. 15 urtetik gorako pertsonen artean alkohol puruaren kontsumoa 6,2 L/urtekoa da, hau da, 13,5 g/eguneko batez beste. Hala ere, desberdintasun nabarmenak daude munduko eskualde ezberdinen artean, eta azpimarratzekoa da garatutako herrialdeetan alkoholaren kontsumoa altuagoa dela. Munduko Osasun Erakundeak argitaratutako datuen arabera, alkoholak 3,3 milioi hildako eragiten ditu urtero; mundu osoko heriotza guztien %5,9 hain zuzen ere⁽²⁾.

Mundu mailan, alkoholaren kontsumoa 15,3 urterekin hasten da batez beste⁽²⁾, nerabezaroan alegia. Osasun sailaren 2017ko datuen arabera, 15-24 urte bitarteko nerabeen artean, %85,1k alkohola edan du noizbait, %76k azken 12 hilabeteetan, %59,7k azken 30 egunetan, eta, horietatik, %1,3k egunero azken hilabeteetan.

Azken urteotan, alkohol kontsumoaren joera egonkor mantentzen den arren, “binge drinking” (betekada) alkohol kontsumoa handituz joan da, non alkoholdun edari desberdinak (askotan, bost edo gehiago) bi orduko tartean edaten diren. Alkohol kontsumo modu hori nerabeek jarraitzen dute gehienbat. Izan ere, azken 30 egunetan alkohola kontsumitu duten nerabeen artean, %99,8k asteburuan egin du. Are gehiago, %23k astebururo edaten du. Larritzekoa da espainiar nerabeen erdiak uste izatea asteburuetan 5-6 kopa edateak osasun ondorioz ez duela⁽³⁾.

Alkohol kontsumoak nerabezaroan osasun ondorio larriak ditu, maila fisiko, psikiko zein sozialean. Garai horretan garun-garapena bukatu gabe dagoenez, patologiaren bat garatzeko arriskua handiagotzen da⁽⁴⁾, helduaroan alkoholarekiko mendekotasuna garatzeko probabilitatea barne^(3,4).

Nerabezaroa deritzon haurtzaroaren osteko garaian, heltze psikologikoa eta soziala gauzatzen da⁽⁵⁾. Prozesu horretan, aldaketa ugari gertatzen dira nerbio-sisteman; besteak beste, bekoki aurreko kortexa eta sistema limbikoko egituren nahiz substantzia zuriko asoziazio eta proiektzio zuntzen garapena deskribatu izan dira. Horri esker, funtzio kognitiboak (arazoei konponbide ematea, planifikazioa, lan-memoria) eta emozioen prozesatzea hobetzen dira⁽⁴⁾. Horrez gain, konexio kortikalak doitu egiten dira eta glia zelulen kopurua murrizten da; substantzia griseko bolumena nahiz lodiera murriztuz⁽⁶⁾. Gainera, neurotransmisore-sistemaren heltzea gertatzen da. Testuinguru horretan, dopamina eta sari sistemek aldaketak jasaten dituzte. Horiek estu lotuta daude alkohol eta beste drogen kontsumoarekin, eta, neurotransmisio inhibitzailean gertatzen diren hobekuntzak gaztaroan hain nabarmena den bulkaden prozesatze eta modulazioan eragiten dute⁽⁴⁾.

Hainbat ikerketek agerian jarri dutenez, nerabezaroan alkohola edateak hipokanpoaren, garuntxoaren eta bekoki aurreko lobuluaren bolumen murrizketa⁽⁷⁾ eragiten du eta bekoki eta pareta eskualdeen odol-oxigeno mailaren mendeko erantzunaren handipena⁽⁸⁾. Bestalde,

lan-memoria espaziala erabiltzean, bekoki eta garondoko atalen eta garuntxoaren erantzun maila murrizten da⁽⁹⁾. Horrez gain, aktibazio-patroi atipikoak sortzen dira garunean eta sustantzia zuriaren mikroegitura murrizten da^(7,8).

Sistema endokannabinoidea seinaleztapen-sistema neuromodulatzaile endogenoa da⁽¹⁰⁾. Sistema horretako CB₁ hartzailea estu lotuta dago alkoholaren inguruko portaerekin. Izan ere, CB₁ hartzailearen agonistek etanol kontsumoa bultzatzen dute; antagonistek, ordea, borondatezko alkohol kontsumoa murrizten dute⁽¹¹⁾.

Alkohol kontsumo kronikoak ere CB₁ hartzailearen espresioan eragiten du. Hala, CB₁ hartzailea kodetzen duen RNA mezulariaren maila jaisten du; astrozitoetan hartzaile horren dentsitatea eta funtzionalitatea murrizten da⁽¹²⁾, eta, bereziki, bukaera kitzikatzaileetan, iraupen luzeko depresioarekin erlazionatuta daudenak⁽¹³⁾. Bestalde, alkohol kontsumo kronikoak anandamida (AEA) eta 2-arakidonilglicerol (2-AG) endokannabinoideen aitzindari diren lipido poliasegabeen maila igotzen du⁽¹⁴⁾. Aldaketa horien ondorioz, plastikotasun sinaptikoa kaltetzen da eta funtzio neurokognitiboak murrizten dira⁽¹⁵⁾; hala nola, hitzezko eta ez-hitzezko informazioaren ikasketa, memoria, arazoei konponbide ematea⁽¹⁶⁾, arreta mantentzea, informazioaren prozesatzea eta planifikazio gaitasuna⁽¹⁷⁾. Are gehiago, kalte horietako batzuk helduaroan ere mantentzen direla frogatu egin da⁽¹⁸⁾.

Ingurune aberastua (IA) garunaren estimulazioa eragiten duen paradigma esperimental da. Horretarako, arruntak baino handiagoak diren kaiolak erabiltzen dira, eta, animalien arteko elkarrekintzak aberasteko, animalia gehiago bizi dira batera kaiola honetan. Gurpil bat eta aldapak ipintzen zaizkie animaliei jarduera fisikoa aberasteko, eta, kolore, tamaina eta ehundura ezberdineko hainbat objektu zentzumenak suspertzeko. Teknika horien bidez lortzen da kaiola horietan bizi diren animaliak baldintza estandarretan bizi direnak baino estimulu gehiago edukitzea⁽¹⁹⁾.

Ingurune aberastuak alkoholak eragindako kalteak hobetu edo leheneratu ditzake. Paradigma esperimental horrek, hipokanpoko bolumena handitzen du, eta baita kortexaren tamaina, lodiera eta pisua ere. Maila zelularrean, neuronon gorputza eta nukleoaren tamaina handitzen du, eta baita dendriten kopurua, dendriten tamaina eta arantza dendritikoen kopurua ere⁽²⁰⁾. Horrez gain, alkoholak glia zeluletan sortzen dituen asaldurak lehengoratzeko gai da⁽²¹⁾. Ingurune aberastuak neurogenesia, angiogenesisia, sinaptogenesisia eta faktore neurotrofikoaren espresioa bultzatzen du⁽¹⁹⁾. Garunean dituen eragin positibo anitzak direla eta, ingurune aberastua droga kontsumo eta gaixotasun neuropsikiatriko eta neurologiko ezberdinen tratamendurako lanabes aproposa izan daitekeela proposatu da.

Nerabeen eta alkoholaren arteko harremana gero eta kezkarriagoa da; izan ere, adingabeko gazteak oso goiz hasten dira edaten, eta, betekada gisako alkohol kontsumo patroia gero eta ohikoagoa da. Gure laborategian, dagoeneko frogatu da ohitura horiek garunean epe luzerako aldaketa kaltegarriak eragiten dituztela. Sagu-ereduetan ikusitakoaren arabera, nerabezaroan betekadan oinarritutako alkohol kontsumoak CB₁

- Kontrol taldea (**KE-H₂O**): Nerabezaroan (p32-p56 bitartean), ur tratamendua jaso zuten saguak. p56-p76 bitartean, animaliak bikoteka mantendu ziren kaiola arruntetan.
- Alkohol taldea (**KE-OH**): Nerabezaroan (p32-p56 bitartean), alkohol tratamendua jaso zuten saguak. Abstinentzia aldian, hau da, p56-p76 bitartean, animaliak bikoteka mantendu ziren kaiola arruntetan.
- Ingurune aberastuko ur taldea (**IA- H₂O**): Nerabezaroan (p32-p56 bitartean), ur tratamendua jaso zuten saguak. p56-p76 bitartean, talde honetako 8 animaliak ingurune aberastuko kaiola partekatuan mantendu ziren.
- Ingurune aberastuko alkohol taldea (**IA-OH**): Nerabezaroan (p32-p56 bitartean), alkohol tratamendua jaso zuten saguak. Abstinentzia aldian, hau da, p56-p76 bitartean, talde honetako 8 animaliak ingurune aberastuko kaiola partekatuan mantendu ziren.

Transmisio-mikroskopia elektronikoa:

·Garunaren erauzketa: Animaliak ketamina/xilazinaren bidez (80/10 mg/kg pisu) sakon anesthesiatu ondoren; lehenengoz, gatz fosfato tanpoiaz (PBS, 0,1M, pH 7,4) perfunditu genituen bihotz bidetik, eta, jarraian, fixatzaile nahasketa batean (300mL 4% paraformaldehido, %0,2 azido pikriko eta %0,1 glutaraldehido, fosfato tanpoian –PB, 0,1 M, pH 7,4-) murgildu ziren. Jarraian, garunak erauzi eta soluzio berdinean postfixatu genituen gau osoan zehar 4°C-tan. Gero, bibratomo bidez, 50 µm-ko ebaketa koronalak egin ziren.

·Immunozitokimika: Tindaketa immunozitokimikoa talde bakoitzeko hiru sagutan egin genuen. Lehenik eta behin, ebaketak blokeo soluzio batean (%10 behi-albumina serikoa, %0,02 saponina gatz-Tris-HCl pH 7,4 – TBS tanpoian) inkubatu genituen ordu erdiz eta giro tenperaturan. Ondoren, soluzio berean (baina %0,004 saponinarekin) diluitutako anti-CB₁ ahuntz antigorputz poliklonal primarioa (2 µg/mL, CB₁-Go-Af450, *Frontier Science Co*) inkubatu genituen 4°C-tan bi egunez. Hurrengo egunean, TBS tanpoian 10 minutuko hiru garbiketa egin ondoren, ebaketak urre partikula bati lotutako anti-ahuntz untxi G-immunoglobulina sekundarioan (1:00; Fab' fragmentua, Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA) inkubatu ziren 4 orduz giro tenperaturan. Ebaketak gau osoan zehar garbitu ziren 4°C-tan eta TBS tanpoian prestatutako %1 glutaraldehidoan fixatu ziren 10 minutuz. Ur ultrapuruan 3 aldiz garbitu ondoren, urre partikulak zilarrarekin intentsifikatu ziren 12 minutuz ilunpean, *HQ Silver kit*-a erabiliz (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, USA). Azkenik, ebaketak PB tanpoian garbitu ziren, eta, bukatzeko, osmifikatu, deshidratatu, erretxinan murgildu eta 60°C-tara berotuta labeaz sartu ziren.

·Mozketak: Behin immunozitokimika bukatzean, talde ezberdinetako saguen hiponkanpoak argi mikroskopioaren bidez behatu ziren. Mikroskopio bidezko behaketa eta analisisa hiponkanpoaren hortz-bihurguneko geruza molekularrean egin zen, beraz, atal hori identifika eta moztu egin genuen. Ondoren, garun-mozketak erretxinazko kapsuletan itsatsi ziren eta ultracut-a erabilita, erretxina moztu zen. Gero, 900 nm-tako laginak atera

ziren, eta Richardson tindatzailea erabilia tindatu ziren. Modu horretan, mikroskopioaren bidez ehuna zegoen ala ez behatu ahal izan genuen. Behin mikroskopio optikoaren bidez ehuna mozten hasi ginela ikustean, 50 nm-tako lagin ultrafinak moztu genituen.

·Kontrastea: Mozketa ultrafin horiek, nikel sareetan kokatu ziren. Azkenik, berun zitratoaren bidez sarean zeuden laginak kontrastatu egin ziren. Horretarako, lehendabizi, sare bakoitza berun zitratoko tanta batean kokatu behar izan zen 20 minutuz. Behin denbora hori igarota, sareak ur tantetan kokatu ziren eta hiru ur aldaketa egin ziren jarraian. Gero, berriro ura hiru alditan aldatu behar izan zen, baina, kasu honetan, aldaketen artean 10 minutu itxaron zen.

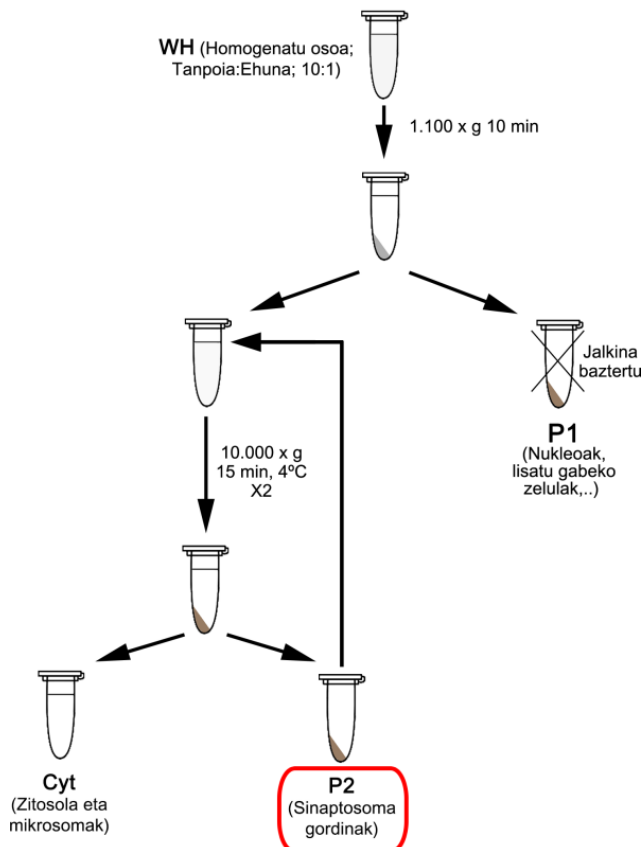
·Transmisio elektro-mikroskopioa: Laginak mikroskopioan behatu genituen; bikorgeruza erreferentzia gisa hartuta geruza molekularreko barneko herena analizatu genuen. Ikusitako CB₁+ ziren sinapsi kitzikatzaile nahiz inhibitzaileen argazkiak 12x handipenean atera genituen. Animalia bakoitzeko 4 x 4 argazkiz osatutako 15 mosaiko atera ziren.

·Estatistika: Argazkien analisia egiteko bi pausu burutu behar izan genituen. Lehenengo eta behin, Fiji programaren bidez argazki bakoitzeko CB₁ hartzaileen kontaketa totala eta sinapsi inhibitzaile eta kitzikatzaileetan kokatutako hartzaileen kontaketa egin behar izan zen. Behin hori eginda, bukaera inhibitzaile eta kitzikatzaileetan zegoen CB₁ kopurua (CB₁ partikulak/mm²) atera genituen, eta, datu horiek GraphPad programaren bidez estatistikoki analizatu ziren. Lehenengo eta behin, Sapiro-Wilk normality test-aren bidez datuen banaketa aztertu zen. Horren ondoren, bide bateko ANOVA testak egin ziren; datuak parametrikoki zirenez, *Bonferroni's* Konparaketa Anitzen testa erabili zen. Esangura estatistikoa esleitzeko, %95eko konfiantza tarte aintzat hartu genuen. Horrez gain, bi bidetako ANOVA testak egin genituen taldeen arteko ezberdintasunak zeuden analizatzeko.

Western blot protokoloa:

·Hortz-bihurgunearen disezioa: Animaliak anestesiapean lepo egin ondoren, 8 (KE-H₂O eta KE-OH taldeak), 4 (IA-H₂O taldea) eta 3 saguren (IA-OH taldea) garunak garezurretik erauzi ziren. Jarraian, alde aurretik deskribatutako prozeduraren bidez⁽²³⁾, hortz-bihurgunea eta Ammon adarra (CA1-CA3 eremua) disezionatu ziren. Labur, erauzitako garunetako bakoitza izotz txikituaren gainean bermatutako Petri plaka batea jarri eta arteka interhemisferikotik erdibanatu zen, bisturi bat erabiliz. Jarraian, garun kortex okzipitalaren atzetik ebaketa koronala egin eta entzefalo-enborra zein zerebeloa baztertu genituen. Lupa kirurgikoaren azpian, prozentzefalo erdien azal interhemisferikoa gorantz orientaturik jarri eta dientzefaloa erauzi genuen. Ondoren, hipokanpoa garun kortexetik banandu genuen eta bere barne azala gorantz orientatu genuen. Hor, hortz-bihurgunea Ammon adarretik mugatzen duten bi ildo arin bereiz zitezkeen ardatz septo-tenporalean. Xiringa-orratz hipodermiko bat erabiliz (27-gauge) hortz-bihurgunea Ammon adarretik banandu zen. Talde esperimental berdineko animalia guztien hortz-bihurguneak, batetik, eta Ammon adarrak, bestetik, ependorff tutuetan elkartu eta -80°C-tan gorde ziren frakzionamendu egunera arte.

Homogeneizazio Tanpoia: 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,32 M Sakarosa; 5 mM EGTA, proteasa inhibitzaileak.



3. Irudia. Frakzionamenduaren eskema.

·Frakzionamendua: Sinaptosoma gordinak (P2 frakzioa) isolatzeko (3. irudia), prozedura osoa 4°C-tan burutu genuen. Lehenik, laginak lisi-tanpoian (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 5 mM EDTA; 0,32 M sakarosa; proteasa inhibitzaileak) homogeneizatu (lagin pisu:tanpoi bolumen 1:10 proportzioan) eta 10 minutuz zentrifugatu genituen 1.100 x g abiaduran. Lortutako P1 jalkina (zelula gorpuzkiak, nukleoak, mitokondriak, etab.) baztertu eta gainjalkina (S1) berreskuratu genuen. Gainjalkin hori 15 minutuz zentrifugatu genuen 10.000 x g abiaduran eta, horrela, P2 jalkina (sinaptosoma gordinak) eta S2 gainjalkina (S2) banandu ziren. Zitoplasma kutsadura P2 jalkinetik erabat ezabatzeko, P2 jalkina lisi-tanpoian bersuspenditu eta bolumen berdineko (hots, P2 frakzioaren proteina kantitate berdineko) alikuotatan banatu genuen. Ondoren, alikuota horiek 15 minutuz zentrifugatu genituen 10.000 x g abiaduran. Gainjalkinak baztertu ziren eta P2 jalkinak pellet gisa gorde ziren -80°C-tan Western blot entseguak egin arte.

·Bradford metodoa: Sinaptosoma gordinetan (P2 frakzioan), proteina kantitatea estimatzeko erabili genuen. Patroi-zuzen bat sortzeko ura (zuri gisa), eta BSA proteinaren 8 kontzentrazio gorakor (0 eta 24 µg/µL bitartean) kargatu genuen 96 putzutako ELISA plaka batean (100 µL/kontzentrazio). P2 laginen proteina kantitatea estimatu ondoren (aurreko entseguen emaitzetan oinarrituta), laginak patroiaren antzera diluitu eta kontzentrazio gorakorretan kargatu genituen. Ondoren, patroi eta P2 laginei Bradford tindatzailea gehitu eta, 10-20 minutuz ingurumen tenperaturan inkubatu ondoren, absorbantzia neurtu genuen espektrofotometriaz 594 nm-ko uhin-luzeran.

·Immunoblota: Lehenik eta behin, UREA 1X desnaturalizazio-tanpoia prestatu genuen. Horretarako, aldeztu aurretik prestatutako UREA 4X tanpoia (300 mg urea; 50 mg SDS; 120 mg DTT; 500 µL 100 mM Tris-HCl; pH 8,0; 6 µL %1 bromofenol urdina) 4 aldiz diluitu

genuen glizerola zeraman ur distilatuarekin (glizerolaren kontzentrazio finala, %12,5 -v/v-). Ondoren, P2 pelletak UREA 1X tanpoian solubilizatu genituen, 1 µg/µL proteina kontzentrazioa lortzeko, eta 60°C-tan berotu genituen. Horrela desnaturalizatutako proteinak SDS-poliakrilamida gel elektroforesi (SDS-PAGE) bidez banandu genituen %10ko poliakrilamida geletan, 90 minutuz eta 100 V-tan. SDS-PAGE bidez banatutako proteinak, metanol osoan aktibatutako PVDF (*polyvinylidene fluoride*) mintzetara transferitu genituen 30 V-tan, gau osoan zehar eta 4°C-tan. Hurrengo egunean, mintzak ur distilatuarekin garbitu ondoren, guztiz lehortzen utzi genituen. P2 laginekin paraleloan kargatutako pisu molekular patroia erreferentzia gisa hartuta, mintzak hiru zatitan moztu ziren 75 kDa markatzailearen parean eta 35 kDa markatzailearen apur bat gainetik. Hala, DAGLα (110 kDa), CB₁ hartzailea (50 kDa) eta MGL (33 kDa) proteinei dagozkien bandak goiko, tarteko eta beheko mintz zatietan banatuta utzita, hurrenez hurren. Halaber, aktina (42 kDa) tarteko mintz zatian gelditu zen. Moztutako mintzak, metanol osoan aktibatu ondoren, metanol-azetiko (%10 metanol + %7 azido azetiko) nahasketa batean inkubatu genituen 30 minutuz eta giro-tenperaturan, transferitutako proteinak hobe finka zitezen. Ondoren, ur distilatuan, 10 minututako 3 garbiketa egin genizkien mintzei, eta, azkenik, PBS-T-tik (0,2 M PB; pH 7,5; %0,1 Tween-20) pasatu ondoren, blokeo tanpoian (0,2 M PB; pH 7,5; %0,2 Tween-20; %0,5 behi-albumina serikoa) inkubatu genituen, giro tenperaturan eta ordubetez. Behin hori eginda, mintzak blokeo-tanpoian diluitutako antigorputz primarioan (1. taula) inkubatu ziren 4°C-tan eta gau osoan zehar. Hurrengo egunean, mintzei 10 minutuko hiru garbiketa egin zitzaizkien PBS-T tanpoian eta, ondoren, errefau-peroxidasarekin (HRP) konjugatutako anti-untxi ahuntz IgG sekundarioan (1:4000 diluzioan, %1 kaltzio gabeko esne-hauts zeraman blokeo-tanpoian) inkubatu ziren 2 orduz giro tenperaturan. Proteina desberdinen banda espezifikoak agerian jartzeko, *Clarity Western ECL sistema* (BioRad) erabili genuen hornitzaileak emandako argibideen arabera. Sortutako kimioluminiszentzia seinalea detektatzeko eta digitalizatzeko Licor-D gailua erabili genuen Image Studio Digits software-aren kontrolpean.

Itua	Diluzioa WB	Ostalaria Klonalitatea	Isotipoa	Antigenoa	Erreferentzia
DAGLα	1:2000	Untxi- poliklonala	Sueroa	Sagu DAGLα karboxi muturreko 42 aminoazido (NM198114)	Frontier Institute Co., Ltd, DGLα-Rb-Af380
MGL	1:2000	Untxi-poliklonala	IgG	Sagu MGL entzimaren 1-35 aminoazidoak (NM011844)	Frontier Institute Co., Ltd, MGL-Rb-Af200
CB₁	1:2000	Untxi- poliklonala	IgG	Sagu CB ₁ hartzailearen karboxi muturreko 31 aminoazidoak (NM007726)	Frontier Institute Co., Ltd., CB ₁ -Rb-Af380
Aktina	1:40000	Untxi- poliklonala	IgG	Sagu aktinaren karboxi muturreko 11 aminoazidoak	Sigma Aldrich Co., LCC, A2066

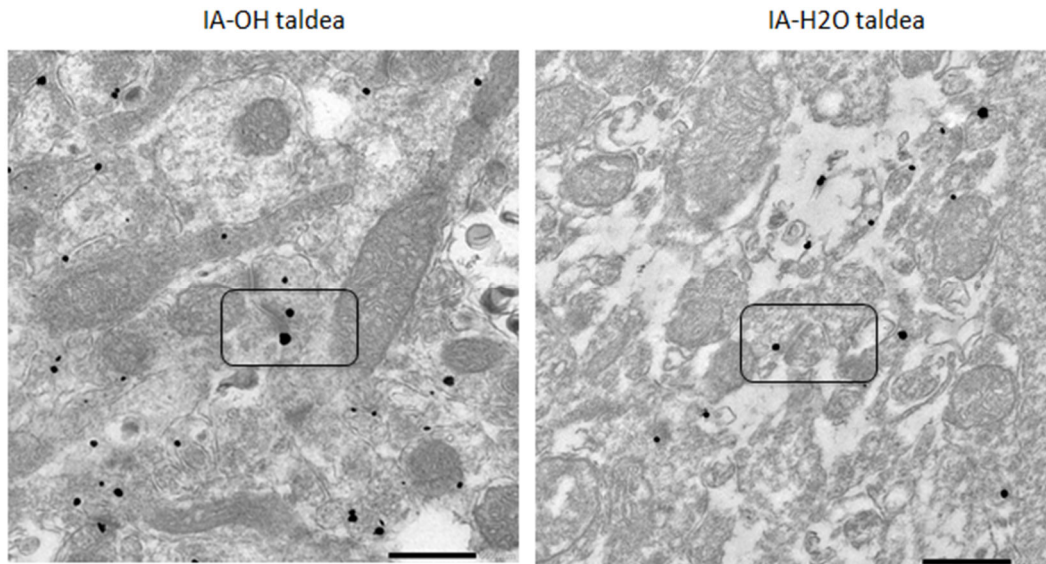
1. Taula. Erabilitako antigorputz primarioen ezaugarriak eta erabilitako diluzioak.

Estatistika: Banda espezifikoaren dentsitate optikoa ImageJ software-a erabiliz (NIH, Bethesda, MD, USA) neurtu ondoren, proteina guztien espresio erlatiboa kalkulatu zen (aktinarekiko zuzenduta) eta ehunekotan adierazi zen KE-H₂O taldea erreferentzia gisa hartuta. Horretarako, KE-H₂O laginetan lortutako dentsitate optiko balioen batez bestekoari %100 balioa esleitu zitzaion eta gainerako taldeetan lortutako dentsitate optikoko balioak

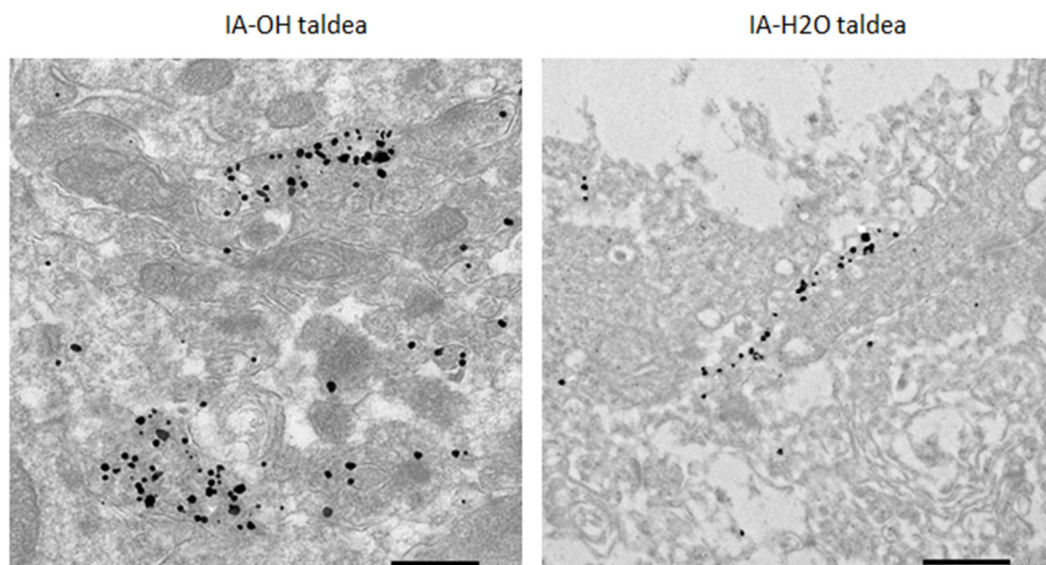
horrekiko normalizatu ziren. KE-H₂O, KE-OH, IA-H₂O, IA-OH taldeen arteko alderaketa estatistikoa egiteko, bide bakarreko ANOVA eta ondorengo Tukey analisisa erabili genuen. Esangura estatistikoa esleitzeko, %95eko konfiantza tartea aintzat hartu genuen.

EMAITZAK:

Elektroi-mikroskopia:



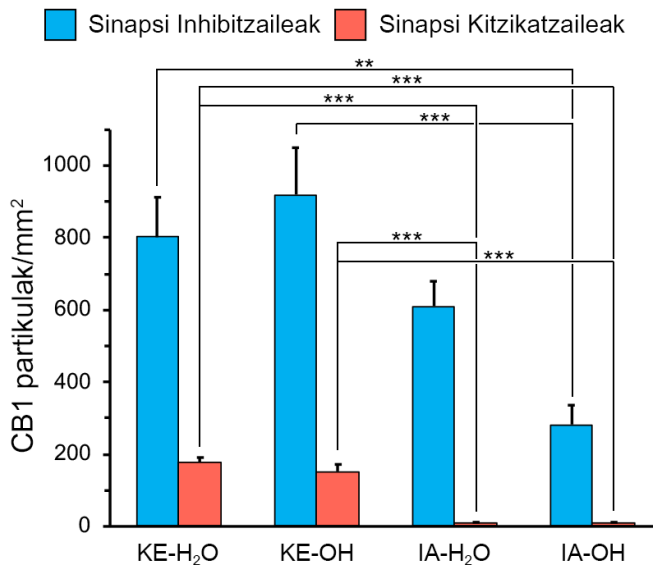
4. Irudia. Ingurune aberastuko saguen bukaera kitzikatzailen argazkiak. Eskala 2 μ m.



5. Irudia. Ingurune aberastuko saguen bukaera inhibitzaileen argazkiak. Eskala 2 μ m.

Mikroskopia elektronikoan ateratako bukaera kitzikatzailetan (4. Irudia) eta inhibitzaileetan (5. Irudia) zegoen CB₁ hartzailearen kontaketa egin, eta, ondoren, ateratako datuen analisi estatistikoa egin zen. Bide bateko ANOVA testa erabiliaz taldeen arteko konparaketak egin ziren (6. irudia). Bukaera inhibitzaileei dagokionez, KE-H₂O-ren eta IA-OH taldeen artean ezberdintasun esanguratsuak ($p < 0,01$) aurkitu dira. Horrez gain, KE-OH-ren eta IA-OH taldeen arteko ezberdintasun esanguratsuak ($p < 0,001$) frogatu dira baita ere. Bukaera kitzikatzailen kasuan, KE-H₂O taldearen eta ingurumen aberastuko taldeen (IA-H₂O eta IA-

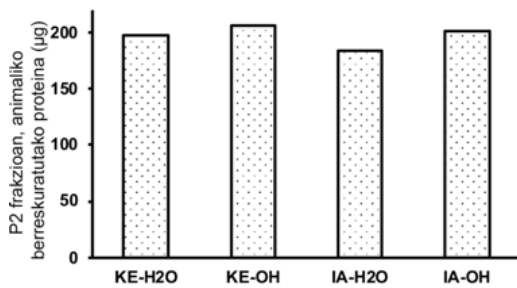
OH) artean ezberdintasun esanguratsua ($p < 0,001$) aurkitu dira. Kasu honetan, KE-OH taldearen eta IA-ko bi taldeen artean (IA-H₂O eta IA-OH) desberdintasun esanguratsua ($p < 0,001$) frogatu dira baita ere.



6. Irudia. CB₁ hartzailaren partikula kopurua mm²-ko bukaera inhibitzaileetan eta kitzikatzailetan. Grafiketan adierazitako balioak 3 (n=3; KE-H₂O, KE-OH eta IA-H₂O) edo 2 (n=2; IA-H₂O) esperimentu independenteren batez bestekoak ± SEM dira.

Horrez gain, bi bidetako ANOVA testa egin da, eta, horren bidez, frogatu egin da baldintzak, hau da, ohiko laborategiko karioletan (KE) biziak edo ingurune aberastuan (IA) murgiltzeak eragin esanguratsua ($p < 0,001$) duela, bai bukaera inhibitzaileak bai kitzikatzailak aztertzerakoan.

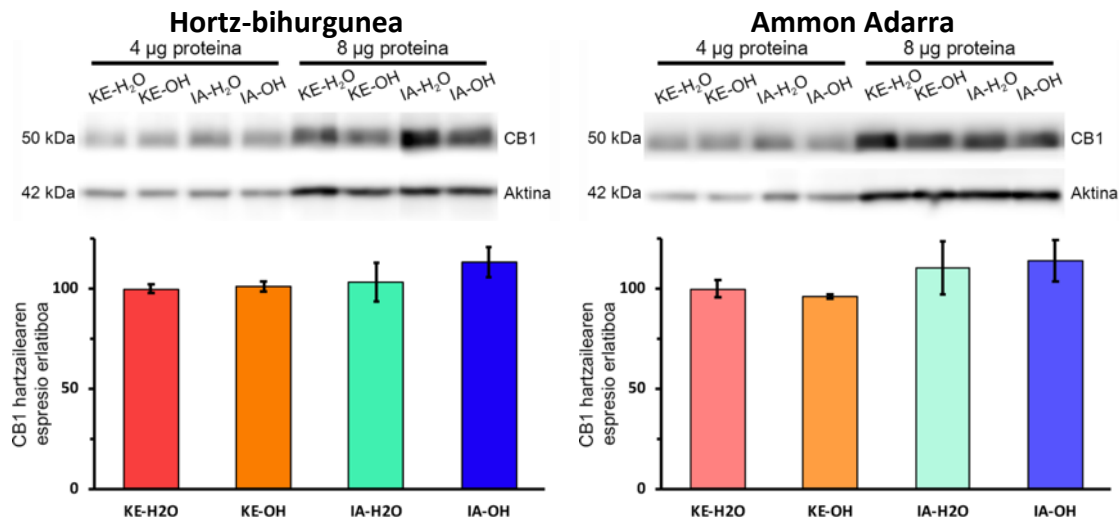
CB₁ hartzailaren, DAGL α -ren eta MGL-ren espresioa hipokanpoko hortz-bihurgunean eta Ammon adarrean:



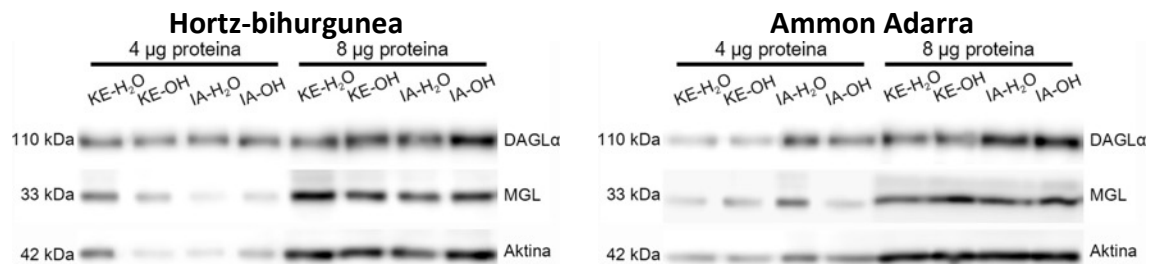
7. Irudia. P2 frakzioan, animaliko berreskuratutako proteina kantitatea talde esperimental desberdinetan.

Bradford metodoaren bidez egindako proteina neurketaren arabera, talde desberdinetan P2 frakzioan animalia bakoitzeko berreskuratutako proteina kantitatea oso antzekoa izan zen, 184 eta 206 µg bitartekoa (7. irudia). Datu honek, disezio bidez isolatutako hortz-bihurgune bolumenak berdintsuak zirela, eta, beraz, disezioa hortz-bihurguneko mugak zehatz jarraituta egin zela iradokitzen dute.

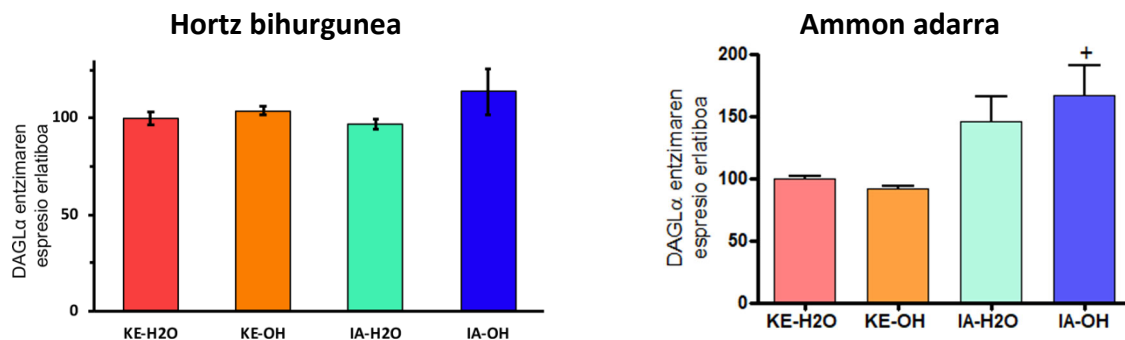
Western blot bidez aztertutako proteinen espresioaren datuek ez zuten desberdintasunik erakutsi CB₁ hartzailaren espresio mailan, ez hortz-bihurgunean ezta Ammon adarrean ere (8. Irudia). Halaber, ez zen aldaketarik ikusi DAGL α eta MGL entzimen espresioan hortz-bihurgunean. Seguruenik, errepikapen gehiago beharko dira desberdintasun estatistikoak aurkitzeko edo esangura estatistiko eza egiaztatzeko, MGL entzimaren azterketaren kasuan bi entsegu independenteetako datuak besterik ez baitziren erabili. Ammon adarrean, MGL immunoerreaktibitatea berdintsua zen talde guztietan. Ordez, DAGL α seinalea nabarmen igotzen zen ingurune aberastuko baldintzetan, izan ere, bide bakarreko ANOVA analisiak esangura estatistikoak detektatu zuen KE-OH eta IA-OH taldeen artean (9.-11. Irudiak).



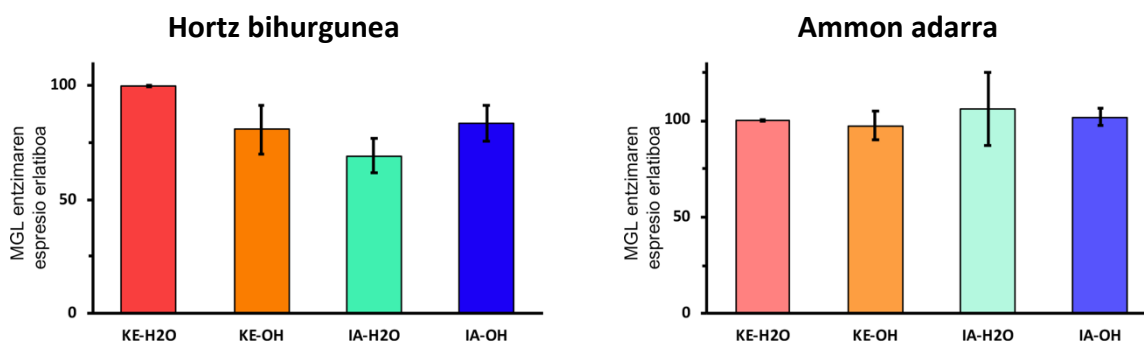
8. Irdia. CB₁ hartzailearen espresio erlatiboaren analisi semikuantitatiboa lau talde esperimentaletako animalien hertz-bihurgunetik eta Ammon adarretik isolatutako P2 frakzioan (sinaptosoma gordinak). Goiko aldean, hertz-bihurguneko eta Ammonen adarreko P2 laginetan egindako Western blot adierazgarriak erakusten dira. Talde esperimental bakoitzetik isolatutako P2 laginak paraleloan migratu ziren (4 eta 8 µg) eta CB₁ hartzailearen aurkako immunoblota egin zen. Mintz berean, aktina seinaleak detektatu ziren, proteina kargaren kontrol gisa CB₁ hartzailearen espresio erlatiboaren balioak zuzentzeko. Beheko aldean, CB₁ hartzailearen espresio erlatiboa adierazten duten grafikak erakusten dira. Datuak KE-H₂O taldean kalkulaturako espresioarekiko (%100) normalizatuta daude. Grafiketan adierazitako balioak 3 esperimentu independenteren batez bestekoak ± SEM (n=3) dira.



9. Irdia. DAGLα eta MGL entzimen Western blot bidezko azterketa lau talde esperimentaletako animalien hertz-bihurgunetik eta Ammon adarretik isolatutako P2 mintzetan (sinaptosoma gordinak). Hertz-bihurguneko eta Ammonen adarreko P2 laginetan egindako Western blot adierazgarriak erakusten dira. Talde esperimental bakoitzetik isolatutako P2 laginak paraleloan migratu ziren (4 eta 8 µg) eta DAGLα eta MGL entzimen aurkako immunoblota egin zen. Mintz berean, aktina seinaleak detektatu ziren, proteina kargaren kontrol gisa DAGLα eta MGL proteinen espresio erlatiboaren balioak zuzentzeko.



10. Irdia. DAGLα entzimaren espresio erlatiboaren analisi semikuantitatiboaren emaitzak lau talde esperimentaletako animalien hertz-bihurgunetik eta Ammon adarretik isolatutako P2 mintzetan (sinaptosoma gordinak). Datuak KE-H₂O taldean kalkulaturako espresioarekiko (%100) normalizatuta daude. Grafiketan adierazitako balioak 3 esperimentu independenteren batezbestekoak ± SEM (n =3) dira.



11. Irudia. MGL entzimaren espresio erlatiboaren analisi semikuantitatiboaren emaitzak lau talde esperimentaletako animalien hortz-bihurgunetik eta Ammon adarretik isolatutako P2 mintzetan (sinaptosoma gordinak). Datuak KE-H₂O taldean kalkulaturako espresioarekiko (%100) normalizatuta daude. Grafiketan adierazitako balioak 2 esperimentu independenteren batez bestekoak \pm SEM (n=2) dira.

EZTABAIDA:

Nerabezaroa garai kritikoa da, heltze psikologikoa eta sozialaren finkapenerako aldia baita⁽⁵⁾. Garai horretan, garuna erabat garatu gabe eta birmoldatze prozesu bizian dagoenez, oso sentikorra da kanpo estimuluekiko eta substantzia toxikoekiko. Horregatik, nerabezaroaldian, alkohol kontsumoak ondorio bereziki kaltegarriak ekar ditzake⁽⁴⁾, horietako batzuk epe luzerakoak direnak, helduarora arte ere manten daitezke⁽¹³⁾. Garunaren estimulazioa sustatzen duen paradigma gisa, ingurune aberastuak alkoholak eragindako epe-luzerako kalteak hobetu edo berreskuratu ditzakela frogatu da⁽²²⁾. Ikerketa honetan, C57BL/6J animalietan, nerabezaroan betekadan oinarritutako alkohol kontsumo patroiak sistema endokannabinoidean duen eragina aztertu dugu, eta, halaber, ingurune aberastuak aldaketa horien gainean dituen ondorioak.

Elektroi-mikroskopiako datuek erakutsi dutenaren arabera, ingurunearen ezaugarriek CB₁ hartzaillearen espresioan eragina dute sinapsi inhibitzaile zein kitzikatzaileetan aztertutako hortz-bihurguneko eremuan, hau da, geruza molekularren beheko herenean, bide zulatzaile medialeko aferenteak amaitzen diren eremuan, hain zuzen ere. Beraz, badirudi, ingurune aberastuak CB₁ espresioaren jaitsiera orokorra eragiten duela hortz-bihurguneko geruza molekularren beheko herenean. Argitaratu gabeko elektrofisiologiako behin-behineko datuen arabera, ingurune aberastuak alkoholak eragindako CB₁-bitarteko epe luzerako depresio (*LTD*, *long term depression*) fenomeno plastikoaren galera lehengorutzen du. Elektroi-mikroskopia bidezko aurkikuntzak maila funtzionalera eramatea oso espekulatiboa izan baliteke ere, ikusitako CB₁ espresioaren aldaketak efektu horren azpian egon litezke. Printzipioz, sinapsi kitzikatzaileetan ikusitako CB₁ hartzaillearen jaitsierak ez luke laboratu *LTD* delakoaren berreskurapena. Baina *LTD* gisako plastikotasun fenomenoak oreka kitzikatzaile-inhibitzailearen menpe daude, eta sinapsi inhibitzaileetan ikusitako CB₁ hartzaillearen espresioaren jaitsierak ez dakigu aipaturako orekan izan dezakeen eragina.

Talde honetan egindako elektroi-mikroskopia bidezko azterketa batean⁽²⁴⁾, CB₁-en espresioaren jaitsiera txikia baina estatistikoki esanguratsua ikusi da KE-OH taldeko animalien bukaera kitzikatzaileetan, KE-H₂O animaliekin alderatuta. Ordez, lan honetan, ez

genuen aldaketa esanguratsurik ikusi KE-H₂O eta KE-OH taldeen artean, datuek joera berdina erakusten bazuten ere. Seguruenik, lagin handiagoa beharko litzateke esangura estatistikoa lortzeko. Baita ere, guk bideratutako kuantifikazioa desberdin samarra izan da aipatutakoarekin alderatuta. Izan ere, gure analisisan, azalera jakin baten barruan sinapsi kitzikatzaileetan eta inhibitzaileetan aurkitutako CB₁ partikula immunoerreaktiboaren kopura analizatu zen, aldezturik egindako analisisan, sinapsi bakoitzeko CB₁ partikula immunoerreaktiboaren kopurua analizatu zen bitartean.

Immunolektroi-mikroskopia bitartez sinapsi inhibitzaileetan zein kitzikatzaileetan aurkitutako CB₁ espresioaren jaitsiera ez genuen detektatu blot bidez egindako analisisetan. Hurbilketa esperimentalen arteko desberdintasunak egon litezke desadostasun honen azpian. Izan ere, elektroi-mikroskopia bidezko azterketa hortz-bihurgunearen bolumen osoaren zati txiki batean egin zen, geruza molekularreko beheko herenean hain zuzen ere. Seguruenik, espazialki mugatua den CB₁ hartzailearen jaitsiera detektaezina da hortz-bihurgune osotik isolatutako sinaptosoma mintzen laginetan. Halaber, Western blot datuak ez datoz bat alkoholikoetan hipokampoaren laginetan aldezturik⁽²⁴⁾ deskribatutako CB₁ proteinaren eta transkriptoaren jaitsierarekin. Berritri ere desberdintasun metodologiko nabarmenak daude, nagusienak aztertutako laginaren ezaugarriekin zerikusia duena. Hala, lan honetan, hortz-bihurgunea eta Ammon adarra bakoitza bereiz hartuta aztertu dira, aurreko azterketetan hipokampo osoa erabili zen bitartean⁽²⁴⁾. Bestetik, gure azterketa biokimikoak sinaptosoma gordinen mintzetan egin dira, aurreko azterketetan homogenatu gordina aztertu zen bitartean. Honekin erlazionatuta, homogenatu gordinetan CB₁ hartzailearen populazio osoa (mintz sinaptikoetan, besikula zitoplasmakoetan, sintesian, sekrezio bidean eta sinaptikoak ez diren mintz plasmakoetan dagoena, besteak beste) aztertu zen, eta, gure lanean, mintz sinaptikoei lotutako hartzailea. Beraz, oso interesgarria da burutako azterketa biokimikoa, P2 frakzioan ez ezik, bestelako konpartimentuetan egitea, posible baita, CB₁ hartzailearen espresioaren aldaketak egotea mintz sinaptikoan dagoen dentsitatean aldaketarik gertatu gabe. Izan ere, aipatutako aldezturik aurreko azterketan⁽²⁴⁾, MGL degradazio entzimaren igoera nabarmena detektatu zen sagu alkoholikoen hipokampo laginetan. Are gehiago, 2-AG endokannabinoiden degradazioaz sortutako azido arakidonikoaren maila 4 aldiz handiagoak ziren alkoholikoetan. Beraz, posible da tonu kannabinoiden baxuago baten ondorioz, barneratze bidezko CB₁ hartzailearen desentsibilizazioa murriztuta egotea alkoholikoan, eta, ondorioz, CB₁ dentsitatea iraunkor mantentzea mintz sinaptikoan, espresio osoa txikiagoa izanik ere. Interpretazio honekin kontraesanetan, gure emaitzek ez dute MGL entzimaren igoerarik detektatu mintz sinaptikoetan. Hala ere, MGL osoaren zati handi bat zitoplasman kokatzen dela kontuan hartu behar da berritri ere. Izan ere, entzima honek bukaera sinaptikoetan banaketa lausoa du eta hurbilketa esperimental desberdinek agerian jarri dute kokapen bikoitza (mintzei lotuta eta zitoplasmatikoa) duela⁽²⁵⁾. Beraz, berritri ere, P2 frakzioan egindako azterketa beste frakzioetara zabaldu beharko da MGL espresioaren erregulazioa argitzeko baldintza esperimental desberdinetan.

Ikerketa honetan lorturiko datuen arabera, aurreko emaitzekin bat⁽²⁴⁾, DAGL α -ren espresioa ez da aldatzen baldintza esperimentalen artean hortz-bihurguneko laginetan. Ordez, ohiko laborategi karioletan egon diren saguekin alderatuta, ingurune aberastuan barneratutako saguen Ammon adarrean DAGL α -ren espresioak gora jotzen du. Joera hori IA talde bietan nabarmena bazen ere, soilik IA-OH animalien laginetan aurkitu genuen esangura estatistikoa. Emaitza hau interesgarria bada ere, Ammon adarrean gertatutako aldaketak lan honen helburuetatik kanpo dago. Izan ere, lagin horretatik isolatutako mintz sinaptiko laginen baliorik nagusia Ammon adarraren eta hortz-bihurgunearen arteko desberdintasun neurokimikoak agerian jartzea izan da, disezio prozeduraren kontrol gisa.

Laburbilduz, ingurune aberastuak izeneko paradigma esperimentalak CB₁ hartzailaren espresioa behera erregulatzen du hortz-bihurguneko geruza molekularren beheko herenean, sinapsi inhibitzaileetan zein kitzikatzailuetan. Ikerketa sakonagoa behar da aldaketa horiek funtzioan eta portaeran dituzten ondorioak argitzeko, baita aldaketa horien garrantzia betekadan oinarritutako alkohol kontsumoaren kalteetan ingurune aberastuak duen aurre egite efektuan ere.

BIBLIOGRAFIA:

1. Drogas PN sobre. Informe EDADES 2017. Plan Nac Sobre Drog [Internet]. 2017;101. Available from: http://www.pnsd.mssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/encuestas_EDADES.htm
2. OMS. Global status report on alcohol and health 2014. Glob status Rep alcohol [Internet]. 2014;1–392. Available from: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprfiles.pdf
3. Ministerio de Sanidad PS e I. Alcohol en la adolescencia [Internet]. Alcohol. p. 4. Available from: <http://www.msbs.gob.es/campanas/campanas11/alcoholenmenoresnoesnormal/sabias.html>
4. Spear LP. The behavioral neuroscience of adolescence. W W Nort Co. 2010;
5. Zupiria X. Garapena. In: Psikologiako gaiak osasun profesionalentzat. 2008. p. 1–36.
6. Huttenlocher PR, Dabholkar AS. Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. J Comp Neurol. 1997;387(2):167–78.
7. Medina KL, McQueeney T, Nagel BJ, Hanson KL, Alecia D, Tapert SF. Disorders : Unique Gender Effects. Magn Reson Imaging. 2008;32(3):386–94.
8. Schweinsburg AD, McQueeney T, Nagel B J, Eyle L T TSF. A preliminary study of functional magnetic resonance imaging response during verbal encoding among adolescent binge drinkers. Alcohol Alcohol. 2010;44(1):111–7.

9. Tapert, Susan F, Schewinsburg, AD, Barlett, VC, Brown, SA, Frank, LR, Brown, GG, Meloy M. Blood oxygen level dependent response and spatial working memory in adolescents with alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(10):1577–86.
10. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(11):873–84.
11. Economidou D, Mattioli L, Cifani C, Perfumi M, Massi M, Cuomo V, et al. Effect of the cannabinoid CB1 receptor antagonist SR-141716A on ethanol self-administration and ethanol-seeking behaviour in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2006;183(4):394–403.
12. Ortiz S, Oliva JM, Pérez-Rial S, Palomo T, Manzanares J. Chronic ethanol consumption regulates cannabinoid CB1 receptor gene expression in selected regions of rat brain. *Alcohol Alcohol.* 2004;39(2):88–92.
13. Bonilla-Del Río I, Puente N, Peñasco S, Rico I, Gutiérrez-Rodríguez A, Elezgarai I, et al. Adolescent ethanol intake alters cannabinoid type-1 receptor localization in astrocytes of the adult mouse hippocampus. *Addict Biol.* 2017;24(2):182–92.
14. Basavarajappa, B. S., Saito, M., Cooper, T. B. and Hungund BL. Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol.* 2003;466:73–83.
15. Montesinos J, Alfonso-Loeches S GC. Impact of the Innate Immune Response in the Actions of Ethanol on the Central Nervous System. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40:2260–70.
16. Brown, S. A., Tapert, S.F., Granholm, E. and Delis DC. Neurocognitive functioning of adolescents: effects of protracted alcohol use. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000;24(2):164–71.
17. Tapert, S. F., Granholm, E., Leedy, N. G., and Brown SA. Substance use and withdrawal: neuropsychological functioning over 8 years in youth. *J Int Neuropsychol Soc.* 2002;8(7):873–83.
18. Brown SA, McGue M, Maggs J, Schulenberg J, Hingson R, Swartzwelder S, Martin C, Chung T, Tapert S F, Sher K, Winters K C, Lowman C MS. A Developmental Perspective on Alcohol and Youths 16 to 20 Years of Age. *Pediatrics.* 2008;121(4):290–310.
19. Simpson J, Kelly JP. The impact of environmental enrichment in laboratory rats- Behavioural and neurochemical aspects. *Behav Brain Res [Internet].* 2011;222(1):246–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.002>
20. Diamond MC. Response of the brain to enrichment. *An Acad Bras Cienc.* 2001;73(2):210–20.
21. Hawrylak N GW. Monocular deprivation alters the morphology of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytes in the rat visual cortex. *Brain Res.* 1995;683(2):187–99.
22. Rico-Barrio I, Peñasco S, Puente N, Ramos A, Fontaine CJ, Reguero L, et al. Cognitive

and neurobehavioral benefits of an enriched environment on young adult mice after chronic ethanol consumption during adolescence. *Addict Biol.* 2018;

23. Hagihara H, Toyama K, Yamasaki N, Miyakawa T. Dissection of Hippocampal Dentate Gyrus from Adult Mouse. *J Vis Exp [Internet]*. 2009;3000(33):1–6. Available from: <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1543>
24. Peñasco S, Rico-Barrio I, Puente N, Fontaine CJ, Ramos A, Reguero L, et al. Intermittent Ethanol Exposure During Adolescence Impairs Cannabinoid Type 1 Receptor- Dependent Long-Term Depression and Recognition Memory in Adult Mice.
25. Labar G, Wouters J, Lambert DM. A review on the monoacylglycerol lipase: at the interface between fat and endocannabinoid signalling. *Curr Med Chem.* 2010;17(24):2588-607.