



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**TRPV1 hartzaile gabeziak CB1
hartzailearen funtzioan eragina du
hipokanpoko hortz bihurguneko
bide zulatzaileko sinapsietan**

*Jon Egaña-Huguet, Svein
Achicallende, Irantzu Rico-Barrio,
Ianire Buceta, Itziar Bonilla-del Rio,
Nagore Puente, Inmaculada
Gerrikagoitia, Izaskun Elezagarai
eta Pedro Grandes*

149-156 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.19>



TRPV1 hartzaile gabeziak CB1 hartzailearen funtzioan eragina du hipokanpoko hortz bihurguneko bide zulatzaileko sinapsietan

Egaña-Huguet, Jon^{1,2}; Achicallende, Svein^{1,2}; Rico-Barrio, Irantzu^{1,2}; Buceta, Janire^{1,2};
Bonilla-Del Rio, Itziar^{1,2}; Puente, Nagore^{1,2}; Gerrikagoitia, Inmaculada^{1,2};
Elezgarai, Izaskun^{1,2}; eta Grandes, Pedro^{1,2}

¹ Medikuntza eta Erizaintza fakultatea UPV/EHU, E-48940 Leioa, ² Achucarro Basque Center
for Neuroscience, EHU-ko Zientzia Parkea

jon.egana@ehu.eus

Laburpena

Potentzial aldakorreko lehen motako hartzaile vallinoideak (TRPV1) neurotransmisoreen jariapenean eta plastikotasun sinaptikoan eragiten du. Ikerketa honetan, erdialdeko bide zulatzailearen intentsitate baxuko kitzikapen estimuluak (10 Hz 10 min) jatorriz hartzaile honen gabezia duten saguetan (TRPV1-KO) jatorrizko animalietan agertzen den endokannabinoiden menpeko iraupen luzeko depresioa (eKB-eLTD) eKBen menpeko iraupen luzeko indartze batean bilakatzen da. Orokorrean, gure emaitzek adierazten dute TRPV1 hartzailearen gabeziak, EKSk bideratutako plastikotasun sinaptikoan egokitzapenezko aldaketak eragiten dituela.

Hitz gakoak: TRPV1-KO, endokannabinoidak, elektrofisiologia

Abstract

The transient receptor potential vanilloid (TRPV1) receptor modulates neurotransmitter release and synaptic plasticity in the brain. In this study, we have observed that low frequency stimulation (10 Hz 10 min) of the Medial Perforant path in TRPV1-KO shifted the eCB-eLTD observed at these synapses in wild type mice to a eCB-LTP. Overall, these results indicate that the absence of TRPV1 receptors triggers adaptive changes in synaptic plasticity that involve the eCB system.

Key word: TRPV1-KO, endocannabinoids, electrophysiology.

1. Sarrera eta motibazioa

Ugaztunen burmuinean gertatzen diren prozesuen artean garrantzitsuenetarako bat plastikotasun sinaptikoa da. Plastikotasuna, esperientzia batek sorturiko aktibitate neuronalak, gainerako zirkuitu neuronalen funtzioa aldatzeko duen gaitasunean datza, ondorioz, gure sentimenduak, pentsaerak eta portaera aldatuz. Aldaketa plastiko horien atzean zehazki, aurretik ezarrita dauden sinapsietan neurotransmisioaren intentsitatearen edo eraginkortasunaren aldaketak daude. Horrela, bide sinaptiko batzuk gehiago indartuko diren bitartean beste batzuetan neurotransmisioa jaitsaraziko da (Citri eta Malenka, 2008).

Plastikotasun sinaptikoak hainbat funtziotan parte hartzen duenez, ez da harritzekoa honen barne hainbat mota eta mekanismo egotea. Jakina da transmisio sinaptikoa sustatu edota gutxitu daitekeela aktibitate neuronalaren arabera, eta aldaketa hauek denbora jakin baterako mantentzen direla, denbora

hau segundotatik orduetara edota betirako izan daitezkeelarik. Horrela, iraupen laburreko plastikotasun sinaptikoa eta iraupen luzeko plastikotasun sinaptikoa bereizten dira, eta hauen barne, iraupen laburreko indartzea edota depresioa eta iraupen luzeko indartzea (LTP) edo depresioa (LTD) batik bat (Komaki et al., 2013).

Deskribatu zen lehen plastikotasun mota hipokanpoan gertatzen den LTPa izan zen eta egitura honek memoriarekin duen lotura ezagututa plastikotasun prozesuek memorian duten garrantzia kritikoa zela iradoki zen (Squire et al., 2004), horregatik azken urteotan hainbat ikerketa egin dira hipokanpoko plastikotasuna aztertze aldera, bertan inplikaturiko mekanismoak deskribatzeko asmoz (Morris, 2006).

Endokannabinoide sistemak (EKS) hainbat prozesu fisiologikotan hartzen du parte eta bere funtzio nagusia neuromodulatzailerik bezala jokatzeko izanik, eragina du eraginkortasun sinaptikoan eta ondorioz, plastikotasun sinaptikoan. Funtzio hori betetzeko berezko hartzaileak dauzka, CB1 eta CB2 hartzaileak deritzenak, eta hauek aktibatzen dituzten berezko estekatzaileak diren endokannabinoideak (eKB), hauen artean nagusienak 2-AGa (2-arakidonoilglicerola) eta anandamida (arakidonoiletanolamida) (Howlett et al., 2002). Hala ere, eKBek plastikotasun sinaptikoan jokatzen duten papera oso eztabaidatua izan da, izan ere, CB1 hartzailearen agonistak aplikatuz, kontzentrazioaren araberrako efektu bifasiko bat ikusi egin da (Abush eta Akirav, 2010).

Hartzaile klasiko horiez gain, EKSk beste hartzaile batzuetan eragina du ere, hauen artean TRPV1 hartzailea. Hartzaile hau eKBengatik aktibatua izan daiteke eta eKBen sintesian eragina izan dezakeela ikusi da (Chávez et al., 2014). Jakina da hartzaile honek plastikotasun sinaptikoan parte hartzen duela, sinapsiko kaltzio kontzentrazioa aldatuz eta ondorioz neurotransmisoreen askapenean doitu (Chavez et al., 2010; Gibson et al., 2008). Duela gutxi deskribatu da hartzaile hau, hipokanpoko geruza molekularreko bide zulatzailean kokaturiko sinapsi kitzikatzaileen alde postsinaptikoan aurkitzen dela (Puente et al. 2014) eta gainera geruza horretan dauden sinapsi inhibitzaileen % 30 hartzaile honentzako immunopositiboak direla (Canduela et al. 2015). Bi hartzaile horien kokapena hipokanpoan eta beste hainbat egituratan frogatu bada ere (Cristino et al. 2006) neuronon jardueran eta plastikotasun sinaptikoan eragiten duten efektua kontrako dela iradokitzen da (Di Marzo et al., 2010).

2. Ikerketaren helburuak

Neurotransmisioaren eraginkortasunean TRPV1 hartzaileak duen garrantzia jakinik, hipokanpoko hortz bihurtzeko geruza molekularreko bide zulatzailean EKSk bideratutako plastikotasun sinaptikoa aztertzea erabaki dugu, eta gertatzen diren aldaketen erantzulea identifikatzen saiatu gara. Izan ere, eremu horretan estimulu baten ondorioz ematen den eKBek bideratutako LTDa, LTP baten bilakatzen da TRPV1-KO saguetan.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

Aurretik TRPV1-KO saguetan eginiko ikerketa batean aldaketak ikusi genituen EKSk sintesi eta degradazio entzimen adierazpenean eta baita CB1 hartzailearen banaketan ere (Egaña-Huguet et al., 2017). Aldaketa horietan sakondu nahi izan dugu dagokigun ikerketa honetan eta EKBSrekin erlazionatutako plastikotasun sinaptikoan ere aldaketa nabarmenak dituztela ikusi dugu.

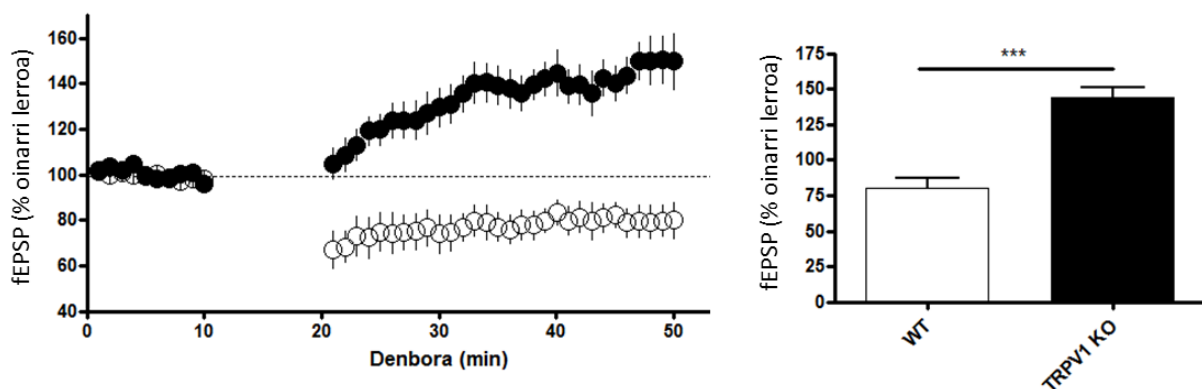
Ikerketa honetan teknika elektrofisiologiakoak erabili ditugu transmisio sinaptikoa aztertzeko, burmuin xerren zelulaz kanpoko elektrofisiologia hain zuzen, “*ex vivo*” moduan ere ezaguna. Honetan

behin animalia anestesiatuta dagoelarik burmuina atera, eta bizirik mantentzen duen eta oxigenatua dagoen disoluzio baten murgiltzen da eta bibratomoaren laguntzaz 300µm-ko xerretan ebakitzen da.

Ondoren xerra hauek elektrofisiologia-teknikak burutzeko prestatuta dagoen mikroskopia baten ganberatxoan jartzen dira. Intereseko eremuak aukeratu eta bi elektrodo sartzen dira, hauek batek estimulua bidaltzen du eta besteak estimulu horrekiko erantzuna jasotzen du. Burmuin xerrak bizirik mantentzeko egoera fisiologikoa ordezkatzeko duen eta oxigenatua dagoen disoluzio bat ponpatzen da zuzenean mikroskopia-ganberara. Horrez gain, disoluzio horretan gure ikerketarako interesgarriak diren farmakoak gehitzen dira burmuin xerratan efektu ezberdinak eragin ditzaten. Ikerketa honetan burututako esperimendu guztietan Pikrotoxina (PTX) deritzon farmako bat gehitu dugu transmisio inhibitzailea deuseztatzeko eta kitzikatzailea baino ez jasotzeko. Gainera efektu ezberdinak eragiteko EKS_n eta TRPV1 hartzailean eragina duten beste hainbat farmako erabili ditugu. Hortaz, bi egoera ezberdinen aurrean (TRPV1 hartzaile gabezia eta egoera arrunta) burmuin eremu berberak estimulu berberaren aurrean duen jokaera edo erantzuna aztertzen da. Lehenik eta behin 10 minutuz laginak estimulu kontrol baten aurrean duen erantzuna aztertzen da, “oinarri-lerroa” moduan ezagutzen dena eta aldaketarekiko erreferentzia gisa erabiliko dena, ondoren kitzikapen estimulu bat aplikatzen da eta honek sare neuronalean eragiten duen erantzuna aztertzen da. Gure ikerketan, estimulu kontrol gisa 0.1 Hz-ko estimuluak erabili ditugu eta 10 minutu irauten duten 10 Hz-ko kitzikapen estimuluak. Ondoren laginak duen erantzuna 50 minutuz aztertu dugu. Horrela, hurrengo emaitzak jaso ditugularik.

Lehenik eta behin, TRPV-KO saguen hipokanpoko hortz bihurguneko bide zulatzailean, jatorrizko animalietan iraupen luzeko LTDa eragiten duen kitzikapen protokoloa aplikatzerakoan lortzen den erantzuna guztiz ezberdina izan da, izan ere, LTP bat pizten baita. Sagu arruntetan estimulu honen aurreko erantzuna 80.51 ± 6.339 -koa den bitartean, TRPV1-KO saguetan erantzuna 144.0 ± 7.152 -koa izan da (1.irudia). Ezberdintasuna estatistikoki esanguratsua da ($p < 0.0001$ ***).

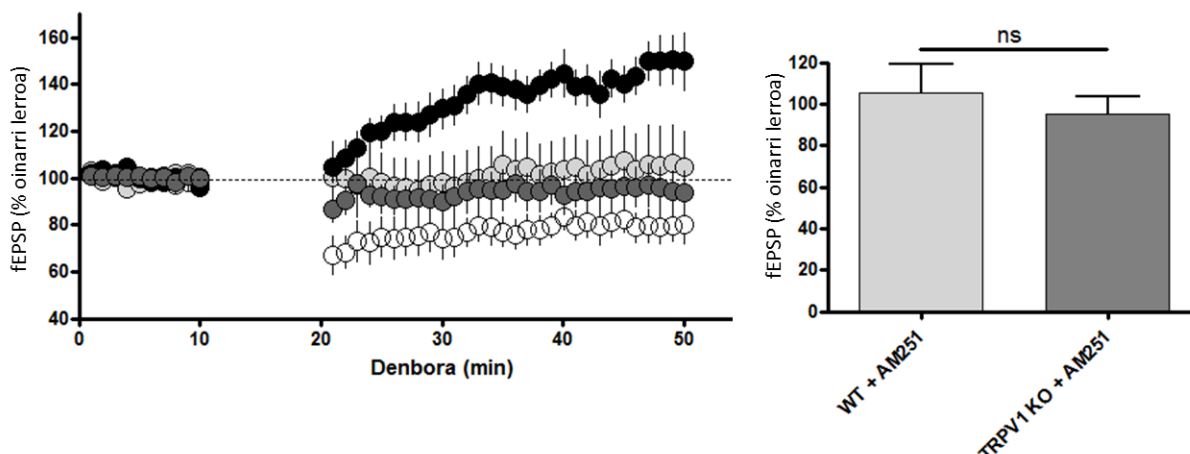
- 1. irudia. Plastikotasun sinaptikoaren azterketa.** 10 minutuko 10 Hz-ko estimulua jaso ondoren jatorrizko saguen (zuriz) (n=10) eta TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) (n=9) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



Efektu honen erantzulea sistema endokannabinoidea den edo ez ezagutzeko, EKSko hartzaile nagusia den CB1 hartzailearen farmako antagonista den AM251 gehitu dugu etengabe mikroskopia-ganbarara. Horrela, xerran hartzaile honen aktibazioa ekiditen da eta honek bideratzen dituen prozesuak blokeatu. Jatorrizko saguetan gertatzen den moduan, TRPV1-KO saguen erantzuna oinarri-lerroaren mailara bueltatzen da, kitzikapen estimuluaren eragina guztiz blokeatuz. Horrela, jatorrizko saguetan

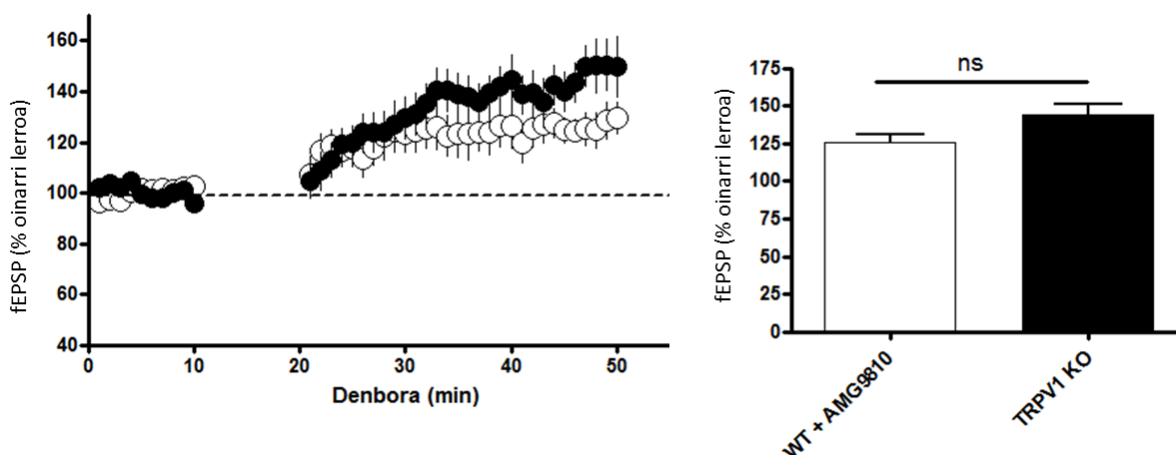
farmakoaren eragina oinarri-lerroarekiko 105.4 ± 13.89 -ra arte berreskuratu duen bitartean TRPV1-KO hau 95.12 ± 8.12 -ra arte jaitzarazi da (2.irudia). Ezberdintasun hau ez da estatistikoki esanguratsua ($p > 0.05$).

2. **irudia. CB1 hartzaillearen parte hartzea plastikotasun sinaptikoan.** AM251 farmakoa gehitu, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren jatorrizko saguen (gris argiz) (n=10) eta TRPV1-KO saguen erantzuna (gris ilunez) (n=10) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



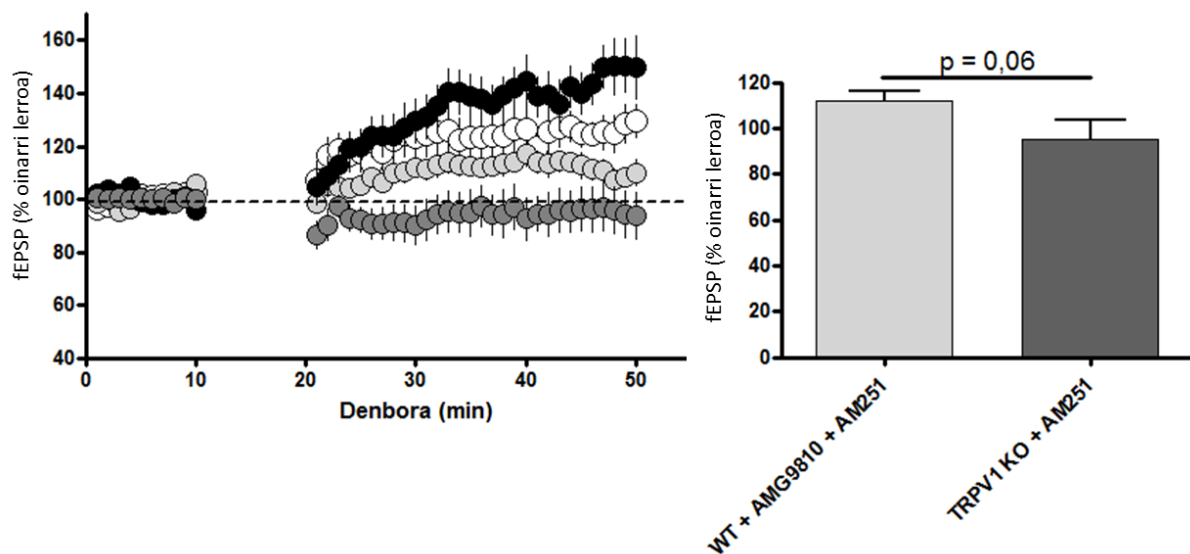
Behin efektu honetan CB1 hartzaillearen parte hartzea frogatuta, aztertu nahi izan genuen TRPV1-KO saguetan gertatzen diren aldaketak gabezia horri soilik zegozkion ala animaliek garapenean zehar jasan dituzten egokitzapenei erantzuten zioten. Hori ikertzeko jatorrizko saguen burmuin xerratan TRPV1 hartzaillearen antagonista bat, AMG9810, gehitu genuen. Kasu honetan TRPV1 hartzaillearen inhibizioak, egokitzapenik gabeko EKSrengan eragiten duen erantzuna aztertu dugu. Horrela, jatorrizko saguetan TRPV1 hartzaillea blokatzearen ondorioz, estimuluaren aurrean seinalea oinarri-lerroarekiko 125.4 ± 5.655 -ra arte igotzen da, LTP bat eraginez, hala ere, aurretik esan bezala TRPV1-KO saguetan oinarri-lerroarekiko 144.0 ± 7.152 -ra arte igoarazten du. Diferentzia hau ez da estatistikoki esanguratsua baina ezin da esan efektua berbera denik (3.irudia) ($p = 0.1035$).

3. **irudia. Egokitzapenezko aldaketen papera plastikotasun sinaptikoan.** AMG9810 farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren, jatorrizko saguen (zuriz) (n=5) eta farmakorik gabeko TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) (n=9) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



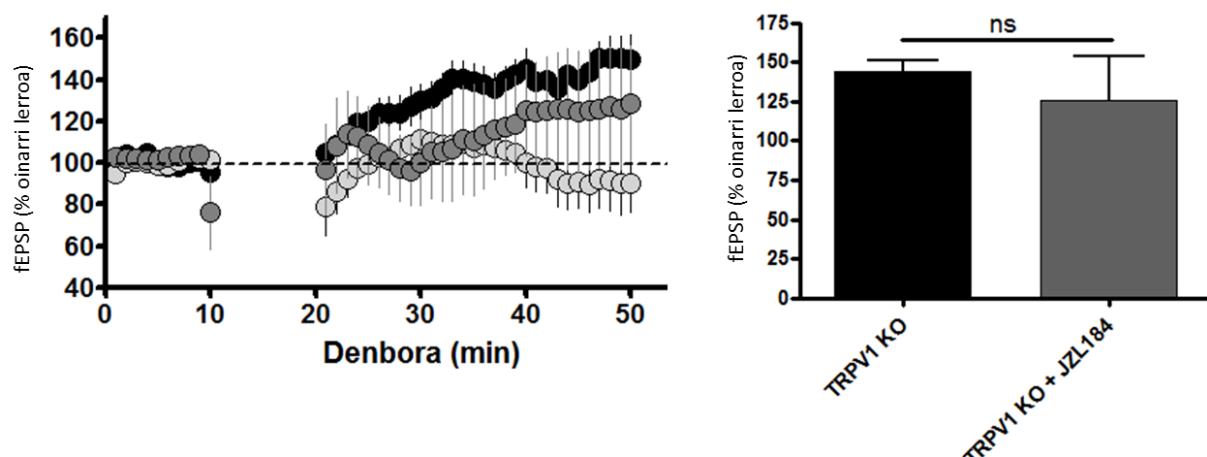
TRPV1 hartzailea farmakologikoki blokeatuta duten jatorrizko saguen burmuin xerretan aurretik aipatutako CB1 hartzailearen aurkako farmakoa, AM251-a, aplikatu dugu eta honek eragindako erantzunaren aldaketa ez da TRPV1-KO saguetan eman denaren berdina izan. Jatorrizko saguetan “oinarri-lerroarekiko” erantzuna estimulu arrotzaren aurrean 125.4 ± 5.655 -ra arte igo eta AM251 farmakoa aplikatu ondoren hau 112.1 ± 3.91 -ra arte jaitea bakarrik lortu dugu. TRPV1-KO saguetan berriz, estimuluaren ondoriozko erantzuna oinarri-lerroa-arekiko 144.0 ± 7.152 -ra arte igo du eta AM251 farmakoaren aplikazioaren ondoren hau $95,12 \pm 8,23$ -ra arte jaitsarazi du (4.irudia). Bi efektu hauen arteko ezberdintasuna ez da estatistikoki esanguratsua ($p = 0.06$).

4. **irudia. CB1 hartzailearen antagonistaren efektua jatorrizko sagu eta TRPV1-KOetan:** AM251 farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren jatorrizko saguen (gris argiz) (n=12) eta TRPV1-KO saguen erantzuna (gris ilunez) (n=10) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



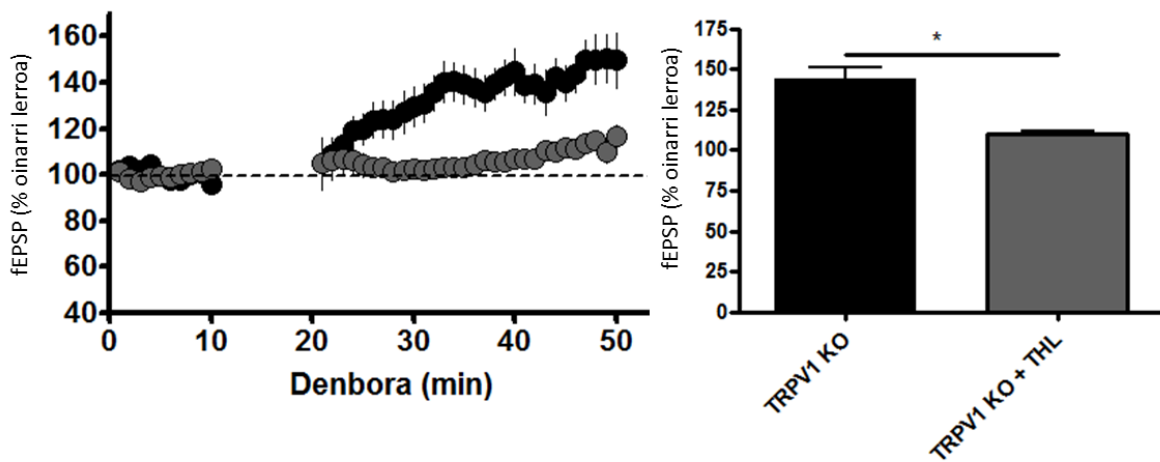
Horrez gain, LTParen erantzulea zehatzago identifikatzeko asmoz, bi endokannabinoide nagusien kontzentrazioan eragiten duten farmakoak gehitu ditugu. Lehenik eta behin 2-AG endokannabinoidea (eKB) degradatzen duen MAGL entzima blokeatzen duen JZL184 farmakoa gehitu dugu. Estimuluaren ondoren seinalea 144.0 ± 7.152 -ra arte igotzen da eta aplikazioaren ondoren 126.0 ± 27.41 -ra arte jaitsiz, aldaketa hau ez da estatistikoki esanguratsua ($p > 0.05$). Jatorrizko saguetan berriz JZL184 farmakoaren ondorioz 2-AG eKBaren kontzentrazioa areagotuz epe luzeko depresioa deuseztatzen da aurreko ikerketetan izan ditugun emaitzak errepikatuz (5.irudia).

5. **irudia. 2-AG eKBaren parte hartzea bere degradazio entziman eraginez.** JZL184 farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren jatorrizko saguen erantzuna (gris argiz) (n=4), farmakoarekin TRPV1-KO saguena (gris ilunez) (n=4) eta farmakorik gabeko TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) (n=9) denboran zehar. Ondoan azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



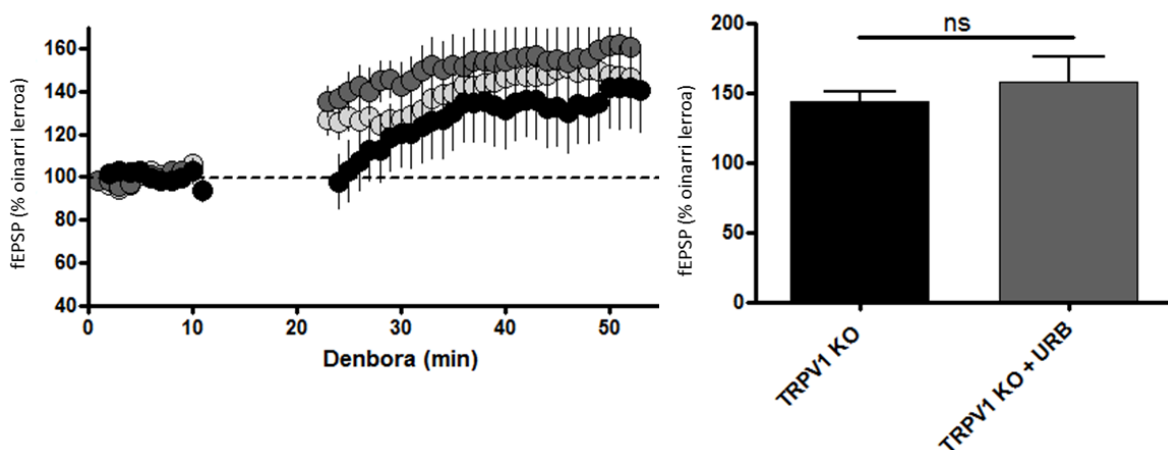
2-AGa eKBaren parte hartzea hobeto aztertzeko eKB hori sintetizatzen duen entzima blokeatzen duen farmakoa gehitu dugu, THL. Horren ondorioz 2-AGren kontzentrazio jaitsarazten da. Horrela estimuluaren ondoriozko erantzunean LTPa asko murrizten dela behatu dugu, ia desagertu arte. TRPV1-KO estimuluaren aurreko erantzuna oinarri-lerroarekiko 144.0 ± 7.152 -ra arte igoarazten den bitartean DAGL entzimaren blokeoa eragiten duen farmako honen ostean, “oinarri-lerroarekiko” 109.8 ± 1.868 -ra arte jaisten da (6. irudia). Ezberdintasun hau estatistikoki esanguratsua da ($p = 0.0102$).

- 6. irudia.** 2-AG eKBaren parte hartzearen azterketa bere sintesi entziman eraginez. THL farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren, farmakoarekin TRPV1-KO saguen (gris ilunez) ($n=4$) eta farmakorik gabeko TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) ($n=9$) denboran zehar. Ondoa azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



Azkenik, beste endokanabinoide nagusia den, anandamidaren degradazioa ekiditen duen URB farmakoa gehitu dugu. Modu horretan anandamidaren kontzentrazioa igoaraztea lortzen da. Jatorrizko saguetan farmako hau aplikatuz LTDa LTP batean bilakatzen dela behatu dugu. TRPV1-KO saguetan berriz, estimuluaren aurrean daukagun LTPa mantendu egiten da, seinalea “oinarri-lerroarekiko” 157.3 ± 17.95 -ra arte igotzen delarik (7. irudia). Ezberdintasun hau ez da estatistikoki esanguratsua ($p = 0.4158$).

- 7. irudia.** Anandamida eKBaren parte hartzearen azterketa degradazio entziman eraginez. URB farmakoa gehitu ondoren, eta 10 minutuko 10 Hz-ko estimuluaren ondoren, jatorrizko saguetan (gris argiz) ($n=4$), farmakoarekin TRPV1-KO saguena (gris ilunez) ($n=4$) eta farmakorik gabeko TRPV1-KO saguen erantzuna (beltzez) ($n=9$) denboran zehar. Ondoa azken hamar minutuen azterketa kuantitatiboa.



Oro har, emaitza hauek iradokitzen dute, TRPV1 hartzailearen jaiotzetiko gabeziak EKSn egokitzapenezko aldaketak eragiten dituela. Aldaketa horiek hipokanpoko hortz bihurguneko plastikotasun sinaptikoa zeharo moldatzen dute parte hartzen duten hartzaile eta eKBak berdina izan ere. Guzti horrek adierazten du EKSk osagaien arteko orekak, mailak eta kokapenak zeharo moldatu dezakela zirkuitu honen fisiologia.

4. Etorkizunerako planteatutako norabidea

TRPV1-KO animaliek jatorrizko animaliekin konparatuz epilepsia arinagoak jasaten dituztela ikusi dugu loki lobuluaren epilepsia sagu eremuan. Epilepsiarekiko erakusten duten erresistentzia hau deskribatu ditugun EKSk erakusten duen aldaketetan izan dezake sorburua. Loki lobuluaren epilepsia eremuan farmakologikoki EKSn eragiteak gaixotasunaren aurrean eragin ditzakeen onurak aztertuko ditugu. Horrekin batera, epilepsia EKSn eragiten dituen aldaketetan sakonduko dugu.

5. Eskerrak eta oharrak

Lan hau burutzeko hainbat erakunderen diru laguntzaz baliatu da. Eusko Jaurlaritza BCG IT764-13 laguntza; Espainiako Ministeritza SAF2015-65034-; UPV/EHU UFI11/41; Adikzio nahasmenduen saretik - Instituto de Salud Carlos III-RD12/0028/0004 eta JEH Euskal Herriko Unibertsitatearen kontratu dauka (PIF 15/255).

6. Erreferentziak

- Abush, H. eta Akirav, I. (2010). Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus*; 20: 1126–1138.
- Canduela, M. J. et al. (2015) Visualization by high-resolution immunoelectron microscopy of the transient receptor potential vallinoid-1 at inhibitory synapses of mouse dentate gyrus. *PLoS One*; Mar 16; 10 (3):e0119401.
- Chávez, A. E. (2010). TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat. Neurosci*; 13: 1511–1518.
- Chávez A. E. et al (2014) Compartment-Specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*; 34 (50):16621-29.
- Citri, A. eta Malenka, R.C. (2008) Synaptic plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanism. *Neuropsychopharmacology Rev.*; 33: 18-41.
- Cristino, L. (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*; 139: 1405–1415.
- Di Marzo, V. (2010). Anandamide serves two masters in the brain. *Nat. Neurosci*; 13:1446–1448.
- Egaña-Huguet, J. et al., (2017). TRPV1-KO saguek epilepsia krisi arinagoak jasatearen zergatiak bilatzen. II. *IkerGazte, Nazioarteko ikerketa euskaraz: 2. Liburuxka (Osasun zientz.)*: 80-87
- Gibson, H.E. et al. (2008). TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal inter-neurons. *Neuron*; 57: 746–759.
- Howlett, A. C. et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.*; 54(2): 161-202.
- Komaki, A. et al. (2014). Effects of exposure to an extremely low frequency electromagnetic field on hippocampal long-term potentiation in rat. *BrainRes*; 1564: 1–8.
- Morris R.G. (2006). Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: the role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas. *Eur J Neurosci*; 23: 2829–2846.
- Puente, N. et al. (2014). The transient receptor potential vallinoid-1 is localized at excitatory synapses in the mouse dentate gyrus. *Brain Struct. Funct.* Man; 220(2): 12187-94.
- Squire L.R. et al. (2004). The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci*; 27: 279–306.