



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12  
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### OSASUN ZIENTZIAK

**Glutamatoaren eta  
kannabinoideen neurohartzaileak  
hipokanpoko hilusean**

*Aitor Medrano Peral,  
Sonia María Gómez Urquijo eta  
Pedro Rolando Grandes Moreno*

134-138 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.18>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



## Glutamatoaren eta kannabinoideen neurohartzaileak hipokanpoko hilusean

Medrano A, Gómez SM, Grandes P

“Sistema endokannabinoidea burmuin osasuntsu eta gaixoan”, *Neurozientzia kliniko, basiko eta funtzional integratuko unitatea.*

*Neurozientzia Saila.*

*Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea.*

*Euskal Herriko Unibertsitatea - EHU.*

[Aitor.medrano.peral@gmail.com](mailto:Aitor.medrano.peral@gmail.com)

### Laburpena

Garuneko hipokanpoan horzdun zirkunboluzioa dago, zeinek geruza molekularra, granularra eta hilusa dituen. Azkenengo estratu horren barnean CB1 errezeptore endokannabinoideak aurkezten duen, mGlu1 eta mGlu5 errezeptore glutamatergikoenganako hartuemona egiaztatu da, baina, oraindik, CB-ek beste errezeptore glutamatergikoekiko harremanik ez da baieztatu. Hau dela eta, bai hiluseko neuronetan, bai zelula glialetan, mGlu2, mGlu3 eta CB1-aren arteko erlazioak eszitabilitatearen kontrolean duen parte-hartzea frogatzeko, sagu-horzduen zirkunboluzioaren aurremurgiltze teknika immunohistokimikoak gauzatu ziren, mGlu2, mGlu3 eta CB1 neurohartzaileak markatuz, gero ehuna mikroskopio elektronikoan aztertzeko. Bi motetako errezeptore hauen kokapen hurbila ikusi zen hilusean.

Hitz gakoak: Hilusa, glutamatoa, sistema endokannabinoidea, immunohistokimika

### Abstract

*The dentate gyrus is a part of the hippocampus in the brain formed by three layers: molecular, granular and the hilus. In the last later, there is crosstalk between glutamatergic mGlu1 and mGlu5 receptors and endocannabinoid receptor CB1, but its underlying relationships with any other glutamatergic receptor are presently unknown. Here, we want to test the possibility of an interplay between metabotropic glutamate receptors mGlu2 and mGlu3 and CB1 receptor, both in neuronal and glial cells by showing their location at subcellular level. In order to prove this, we performed immunohistochemical reactions double labelling mGlu2/3 and CB1 in mouse brain to examine tissue under the electron microscope. Both kinds of receptors were found in close vicinity in the hilus.*

*Keywords: Hilus, glutamate, endocannabinoid system, immunohistochemistry*

### 1. Sarrera eta motibazioa

Hipokanpoa zirkuitu eszitatzaileek bereizitako egitura zerebrala da eta bere bide eszitatzaile nagusia, besteak beste, bide zulatzailea. Zirukuitu eta bide horien erretroalimentazio positiborako gaitasunak, euren aktibazioa eta eszitazioaren mantentzea ahalbidetzen du. Ezaugarri hori oroimen-sormenaren oinarria da, baina, batzutan, erretroalimentazio positibo horrek, neurona taldeen etengabeko eszitazio mantendu eta nahaspilatua eragiten du eta krisi epileptikoak gertatzen dira. Egoera horrek, zelulen barnean kaltzio kontzentrazio kaltegarriak metatzea ahalbidetzen du, eta, eszitotoxiko deritzogun mekanismoaren bidez, lesio zelularra eta apoptosia sortzen da (Ben-Ari, 2002; Zhang et al., 2015).

Neuronen eszitazioaren oreka mantentzeko badaude hipokanpoan kontrol mekanismo espezifiko batzuk, erretroalimentazio negatiboko sistemak. Sistema horietariko batzuek maila molekularrean daukate eragina eta sinapsi eszitatzaileetan kokatzen dira, errezeptoreen bidez zelula ezitatzaileak inhibituz, inpulstu eszitatzailea blokeatuz edota hauen transmisioa mugatuz.

Horzdun zirkunboluzioa hipokanpoan kokatzen da eta molekular, granular eta hilus geruzak ditu. Geruza molekularrean bide zulatzaileko zuntzek zelula granularrekin sinapsia egiten dute modu oso espezifikoan (Van Groen et al., 2002). Aldi berean, zelula granularrek bultzada eszitatzailea hau hipokanpoko beste egituretara zabaltzen dute. Bide eferente horrek hiluseko zeluletan egiten du sinapsi, albo-adarren bidez eta hauen eszitazioa eragiten dute (Amaral, 1978).

Geruza molekularrean glutamato errezeptoreen bidez, hauen artean mGlu2 eta 3 errezeptore metabotropikoak, sinapsiaren kontrola erregulatzen da. Errezeptore hauen presentzia bai neuronetan eta bai glia zeluletan ikus daiteke (Petralia et al., 1996, Neki et al., 1996, Shigemoto et al., 1997) eta iraupen luzeko oroimenaren eraketan parte hartzen dute botoi sinaptikoan transmisioa modulatu (Altinbilek eta Manahan-Vaughan, 2009). Badago beste errezeptore mota bat neurona postsinaptikoan, neurona presinaptikoak askatzen dituen substantzien arabera erreakzionatzen duena, CB1 errezeptore endokannabinoidea. Orokorrean errezeptore hau neurona GABAergikoetan kokatzen da (Tsou et al., 1999, Kawamura et al., 2006), baina, terminal sinaptiko eszitatzaileetan ere aurkitu izan da (Uchigashima et al., 2011). Aldi berean, mGlu3 sinapsi glutamatergikoen inguruan dauden zelula glial eta terminal pre eta postsinaptikoetan agertzen da (Tamaru et al., 2001), eta eszitazioaren kontrolean parte hartzen du.

Errezeptore hauen kokapena eta hartuemonak, hilusa osotzen duten elementuetan, oinarritzkoak izan daitezke hilusaren zelulek inpulstu eszitatzailea zelan kontrolatzen duten ulertzerako orduan. Hipokanpoko transmisio eszitatzailea epilepsiaren moduko prozesu kliniko larrien arduraduna denez, puntu espezifiko honetako interakzio ahalmenaren ulerpenera ezagutza garrantzitsua izan daiteke klinikara estrapolatzerako orduan.

## **2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak**

### **2.1 Hipotesia**

Gure hipotesia hau da: hipokanpoaren beste eremuetako sistema erregulatuzaileek hilusean eduki dezaketela erreplika, zuntz goroldiosuetatik datorren informazioarekin batera, erretroalimentazio negatibozko sistema moduan jarduteko bide zulatzaile eta zelula granularren arteko transmisioan.

### **2.2 Helburuak**

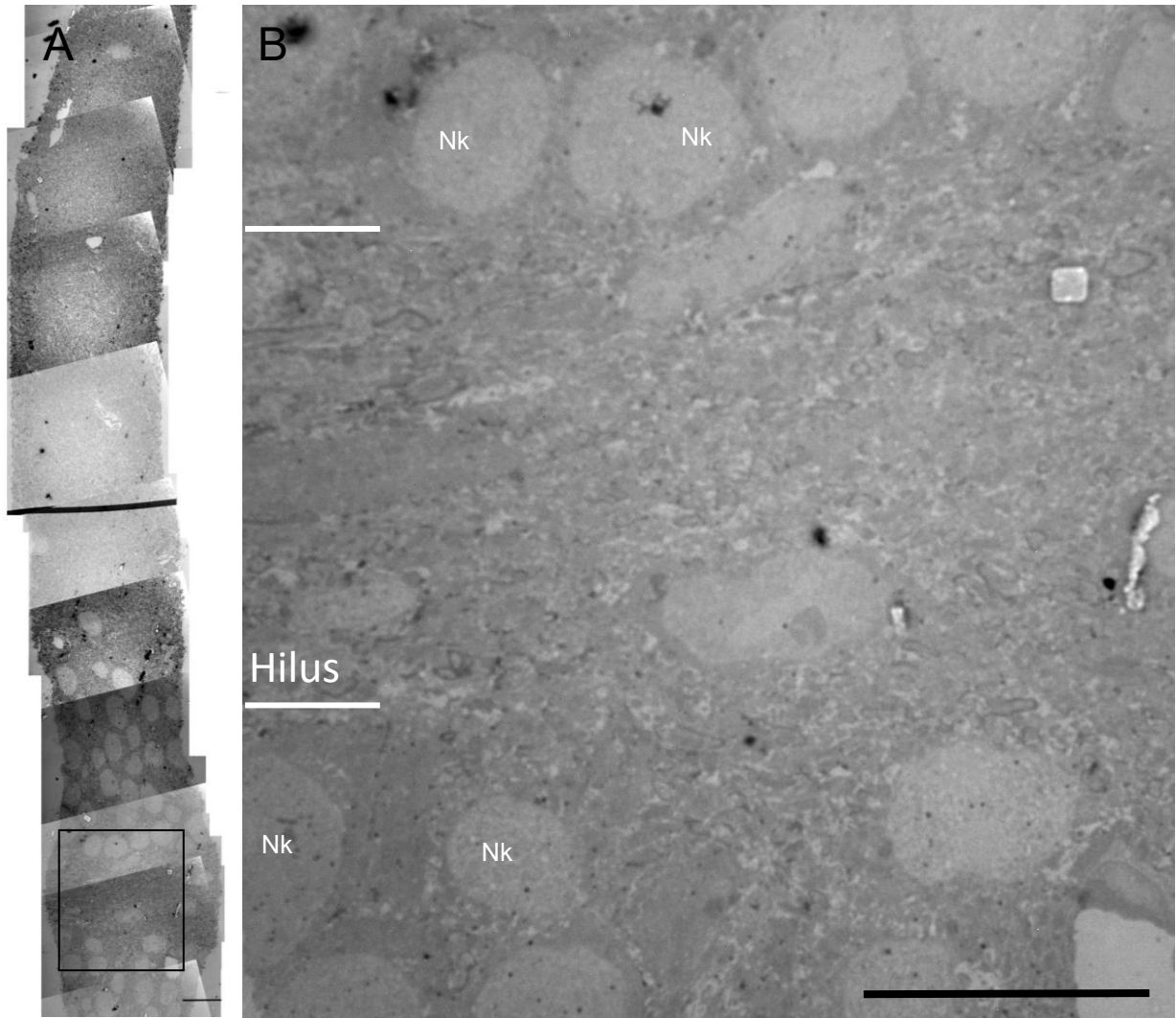
- CB1, mGlu2 eta mGlu3 errezeptoreen hiluseko presentzia egiaztatuz
- CB1, mGlu2 eta mGlu3 errezeptoreen arteko erlazio espaziala zehaztu, maila zelular eta sinaptikoan, erresoluzio handiko mikroskopiaren bidez.

## **3. Ikerketaren muina**

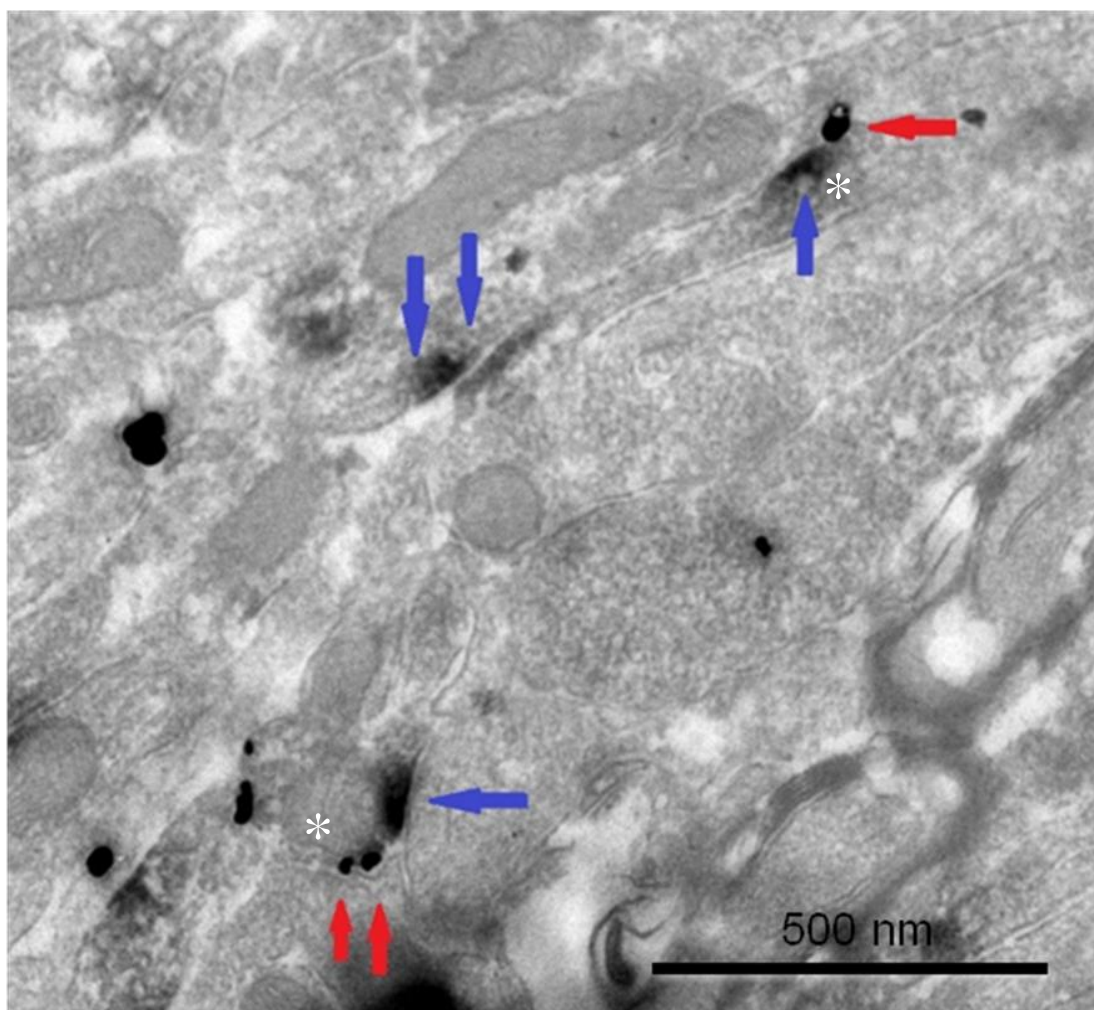
Sagu hipokanpoetan mGlu2/3 eta CB1errezeptoreak markatu ostean, ehuna mikroskopio elektronikoan aztertu zen, bi motatako errezeptoreen arteko erlazioa argitzeko, hilus eremuan. Hilusa identifikatu genuen, hortzdun zirkunboluzioan (1. Irudia), eta magnifikazio handiko argazkiak atera genituen.

Magnifikazio handiko argazkietan diaminobenzidinarekin (DAB) markaketa ikusten zen glutamatoko mGlu2eta3 errezeptoreen presentzia adieraziz. Halaber, urre-partikulak ikusten ziren CB1 errezeptoreak markatuz. Bi markaketen hurbiltasuna eta erlazio topografikoa ere egiaztatuz zen hiluseko eremuan.

### 3.1 Irudiak



1. **Irudia.** **A** Hortzdun zirkunboluzioa, mikroskopia elektroniko bidezko argazkietan. **B.** A irudiko laukiaren barruan dagoen eremua magnifikazio handiagoz ikusita, hilus geruza bereizteko. Hilusa mikroskopia elektronikoaren bidez ateratako argazkietan. Hilusa bi geruza granularren artean dago. Hilusaren goi eta behe alderdietan geruza granularreko zelula-nukleoak (Nk) argi ikus daitezke. Neurri-marra: 10 $\mu$ m.



2. **Irdia.** Diaminobenzidina eta urre markaketa bikoitza mGlu2 eta mGlu3, 2. taldeko glutamatoaren errezeptore metabotropiko eta CB1 errezeptore endokannabinoideetarako sagu baten hilusaren mozte baten. Gezi urdina: DAB-a mGlu2/3 errezeptorearen markatzean. Gezi gorria: nanogold urre partikulak CB1 errezeptorearen markatzean. Puntu batzuetan (asteriskoak) bi markaketak kontaktuan daude, axoi presinaptikoen ezaugarriak dituzten egituretan (besikula batzuk ikusten dira).

#### 4. Ondorioak

Mikroskopia elektronikopean ikusitako materialean agertzen denez, badago erlazio topografikoa CB1 eta mGlu2/3 errezeptoreen artean, bi erregulazio mekanismoen arteko erlazio fisiologikoaren oinarria izan daitekeena.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Planteatzen diren hurrengo urratsak hurrengoak izango dira. Alde batetik, bereiztea bi errezeptore metabotropikoetatik zein den CB1errezeptore kannabinoidearekin erlazionatzen dena. Bestetik, erregulazioa, mekanismo postsinaptikoa edo gliagaitik bideratutakoa den bereiztea.

## 6. Erreferentziak

- Altinbilek B eta Manahan-Vaughan D. (2009) A specific role for group II metabotropic glutamate receptors in hippocampal long-term depression and spatial memory. *Neuroscience*, 158, 149-158.
- Amaral DG (1978) A Golgi study of the cell types in the hilar region of the hippocampus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 182, 851-914.
- Ben-Ari Y. (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3,728-739.
- Kawamura Y, Fukaya M, Maejima T, Yoshida T, Miura E, Watanabe M, Ohno-Shosaku T eta Kano M (2006) The CB1 Cannabinoid Receptor Is the Major Cannabinoid Receptor at Excitatory Presynaptic Sites in the Hippocampus and Cerebellum. *J. Neurosci.*, 26, 2991-3001.
- Neki A, Ohishi H, Kaneko T, Shighemto R, Nakanishi S eta Mizuno N (1996) Pre- and postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the rat brain: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody. *Neurosci. Lett.*, 202, 197-200.
- Petralia RS, Wang Y-X, Niedzielski AS eta Wenthold RJ (1996) The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience*, 71, 949-976.
- Shigemoto R, Kinoshita A, Wada E, Nomura S, Ohishi H, Takada M, Flor PJ, Neki A, Abe T, Nakanishi S eta Mizuno N. (1997) Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 17, 7503-7522.
- Tamaru Y, Nomura S, Mizuno N eta Shigemoto R (2001) Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR3 in the mouse CNS: Differential location relative to pre- and postsynaptic sites. *Neuroscience*, 106, 481-503.
- Tsou K, Mackie K, Sañudo-Peña MC eta Walker JM (1999) Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation. *Neuroscience*, 93, 969-975.
- Uchigashima M, Yamazaki M, Yamasaki M, Tanimura A, Sakimura K, Kano M eta Watanabe M (2011) Molecular and morphological configuration for 2-Arachidonoylglycerol-mediated retrograde signaling at mossy cell-granule cell synapses in the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 31,7700-7714.
- Van Groen T, Kadish I eta Wyss JM (2002) Species differences in the projections from the entorhinal cortex to the hippocampus. *Brain Res. Bull.*, 57,553-556.
- Zhang LN, Hao L, Wang HY, Su HN, Sun YJ, Yang XY, Che B, Xue J eta Gao ZB. (2015) Neuroprotective effect of resveratrol against glutamate-induced excitotoxicity. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 24,161-165.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Egileek eskerrak eman nahi dizkiete J Egañari, bere laguntza teknigoengaitik, N Puente doktoareari, arazo teknikoak gainditzeko bere laguntzagatik eta A Gutiérrez doktoareari bere GFAP eta CB1-aren inguruko lanak ikerketa honen abiapuntua izan delako.

Lan hau “*Relación topográfica entre las localización subcelular de los receptores metabotrópicos de glutamato del grupo 2 (mGlu2/3) y del receptor cannbinoide CB1 en la región del hilus del giro dentado del ratón*” izeneko tesi proiektuaren barnean garatu da Euskal Herriko Unibertsitatearen Neurozientzia Sailean eta Eusko Jaurlaritzako diru-laguntzaz (IT-764-13).