



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

**Endokannabinoideak eta
zerebeloaren garapena**

*Ianire Buceta, Irantzu Rico,
Jon Egaña, Inmaculada Gerrikagoitia,
Pedro Grandes eta Izaskun Elezgarai*

153-159 or.

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

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:

emari ta zabal zazu



euskarabidea



Nafarroako Gobernua
Gobierno de Navarra



Ayuntamiento de
Pamplona
Iruñeko Udala



Deusto
Universidad de Deusto
Deustuko Unibertsitatea



UDALBILTZA



Universidad
de Navarra

Endokannabinoideak eta zerebeloaren garapena

Buceta Ianire, Rico Irantzu, Egaña Jon, Gerrikagoitia Inmaculada, Grandes Pedro, Elezgarai Izaskun.

*Neurozientziak saila, Medikuntza eta Enfermeria Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea
E-48940 Leioa,*

Laburpena

Endokannabinoide-sistemak (EKS), helduan, neurotransmisoreen askatzea doitzeaz gain, garapeneko prozesuetan parte hartzen duela baieztatu dute azken urteotako ikerketek. Enbrioi eta baita animalia helduetan ere EKS zerebeloan dela jakina da. Karraskarien zerebeloaren garapena enbrioi aroan hasten bada ere, jaio ondorengo 3 asteetara arte ez da bukatzen. Horretaz baliatu gara EKSak garapeneko prozesuetan parte hartzen duen aztertzeo mikroskopio elektronikoaren bitartez. EKSko osagai desberdinek, helduarekin alderatuz, kokapen berezitua aurkezten dutela ikusi dugu; helduan eta garapenean duten funtzio desberdinaren adierazle. Bestalde, CB₁ kannabinoideen hartzailearen gabeziak izan dezakeen eragina ezagutu nahi izan genuen. Horretarako, funtzio aldetik desberdinak diren eta erasoan aurrean sentzibiltate desberdina erakusten duten zerebeloaren bi eskualdetan, ultraegiturari mailako zenbait parametro neurtu genituen aldaketa nabarmenak aurkituz.

Hitz gakoak: endokannabinoide sistema, zerebeloa, garapena, zuntz paraleloak, CB₁-KO, mikroskopio elektronikoa.

Abstract

The endocannabinoid system (ECS) in the adult modulates the neurotransmitter release but last investigations have confirmed that it also participates in developmental processes. This system is present in the cerebellum at embryonic state as well as in the adult. The development of the rodent's cerebellum starts at embryonic state and continues until the third week after birth. We have used this fact in order to analyze whether the ECS participates at these developmental processes by electron microscopy approach. Our results show the different components of the ECS present specific locations different to the adult indicative of the different functions that they exert in the development and in the adult. Apart from that, we also wondered the possible effects that could have had the lack of the CB₁ cannabinoid receptor at two cerebellar functional divisions which have a different sensitivity to be damaged. We carried out the analysis of different ultrastructural parameters at those divisions where we observed significant changes.

Keywords: endocannabinoid system, cerebellum, development, parallel fibres, CB₁-KO, electron microscopy.

1. Sarrera eta motibazioa

Fitokakannabinoideak landareek eta endokannabinoideak (eKB) animaliek baldintza fisiologikoetan ekoizten dituzten substantziak dira. 2-arakidonilglizerola (2-AG) eta anandamida (AEA) dira ugaztunetan agertzen diren eKB ezagunenak.

eKBek funtzio oso desberdinetan hartzen dutela parte ikusi da baina bere funtzio ezagunena nerbio-sisteman neurotransmisoreen askatzea doitzean datza. Horrez gain, azken aldian ikusi da, nerbio-sistemaren garapeneko prozesuetan parte hartze garrantzitsua izan dezakeela, hala nola, proliferazioan (Aguado et al., 2006), neurogenesian (Berghuis et al., 2007; de Salas-Quiroga et al., 2015), desberdintzapenean (Gaffuri et al., 2012), axoi-hazkuntzan eta gidan (Williams et al., 2003), migrazioan (Zhou et al., 2015) eta sinaptogenesian (Fernandez-Ruiz et al., 2000; Berghuis et al., 2005; Keimpema et al., 2011).

Endokannabinoide sistema (EKS), eKBek, kannabinoideen hartzaileek, eKBen sintesi eta degradazio entzimek eta endokannabinoideek erregulatutako zelula barneko seinaleztapenak osatzen dute (Fride, 2005; Chevalleyre et al., 2006). Beraien artean guk ikergai izan ditugunak 2-AGarekin erlazioa dutenak izan dira, bera baita garapen prozesuekin gehien erlazionatu den eKBa: DAGL- α eta MAGL bere sintesi eta degradazio entzimak dira.

Lan honetan, karraskarien zerebeloa izan dugu ikerketa eredu. EKSak funtzio motorretan hartzen du parte eta zerebeloa mugimenduen doikuntzaz eta ikasketa motorraz arduratzen den nerbio-

sistemako egitura den heinean, bere funtzioan EKSak jokatzeko duen papera, ezinbestekoa da. Zerebeloak duen berezitasunetarikoa bat da bere garapena enbrioi fasean hasi eta jaio osteko 3 asteetan bukatzen dela (Biran et al., 2012). Ildo honetatik, pikor zelulak zerebelo kortexeko neurona ugariak dira eta beraien morfogenesi osoa jaio ostean ematen da (De la Torre-Ubieta eta Azad Bonni, 2011). Enbrioi eta jaio osteko garapenean eta baita animalia helduetan ere EKS zerebeloan espresatzen dela jakina da. Helduan, EKSak ikasketa motorrean parte hartzen duela ezagutzen den arren, sistema honek zerebeloaren kortexeko jaio osteko garapenean jokatzeko duen papera eta kokapena ez ziren ezagutzen.

Guzti honez gain, kannabinoideen CB₁ hartzailea espresatzen ez duten genetikoki moldatutako saguetan (CB₁-KO) burututako ikerketek, zerebeloarekin erlazionatuta dagoen ikasketa motorrean urritasunak dituztela erakutsi dute (Patel eta Hillard, 2001; Kishimoto eta Kano, 2006). Harrigarria den arren, zerebeloaren menpe dagoen koordinazio motorra, ordea, ez da kaltetzen (Bilkei-Gorzo et al., 2005; Kishimoto eta Kano, 2006; Kishimoto et al., 2006) nahiz eta EKSak zerebeloak burutzen duen funtzio horretan parte hartzen duen. Hori argitzeko asmoz, animalia hauetan, ultraegitura mailako zenbait parametroren azterketa anatomiko sakona egin genuen, funtzio aldetik desberdinak diren eta erasoen aurrean sentsibilitate desberdina erakusten duten zerebeloaren bi eskualdetan.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aipatu den bezala, eKBek funtzio zeharo desberdinak bete ditzakete nerbio-sisteman, garapenean eta helduan. Helduan burutzen duen funtzioa ezagunagoa bada ere, garapenean jokatzeko duen papera, ezezagunagoa izanik, oso esanguratsua izan daiteke. Garapenearekin erlazionatuta, *in vivo* eta *in vitro* garatutako ikerketek, eKBen seinaleztapenak axoien ibilbidean funtsezko ekintza burutzen duela berretsi dute (Galve-Ropehr et al., 2009); era horretara, eKBak, CB₁ hartzailearen aktibazioaren ondorioz, axoiaren mutur mugikorraren, hots, axoi-konoaren morfologia, mugikortasuna eta norabidea modulatu dute, beraien berariazko ituetara heltzea ahalbidetuz (Gaffuri et al., 2012). Karraskarien zerebeloaren ezaugarri bat da, aldaketa morfologikoak jasaten dituela jaio osteko lehenengo 3 asteetan zehar, lehen aipatu bezala, eta ezaugarri horrek zerebeloaren eredu bikaina bilakatzen du neuronen garapenearen ikerketarako, askoz arazo gehiago ematen dituen enbrioi aroko azterketak saihestuz. Zentzu honetan, gaur egunera arte zerebeloan egin diren azterketak ez dira jaio osteko garai goiztiar hauetan burutu. Zerebelo helduan neurotransmisioa modulatu duela eta hartzaileen mezulariak enbrioi aroan aurkitu dituztela (Berrendero et al., 1998; Buckley et al., 1998) kontutan izanik, pentsatzekoa zen, jaio osteko garapen goiztiarrean ere espresatuko zirela.

Aztergai izan ditugun pikor zelulen garapenari dagokionez, enbrioi garaian sortzen dira zelula hauen aitzindariak diren zelulak. Aitzindari hauetatik, pikor zelulak baino ez dira sortzen (neurogenesia). Sortu berri diren neurona hauek, berain kopurua handiagotzen dute, proliferazioa deritzon prozesuaren bitartez. Neurona mota bakoitza berariazko morfologia hartzeraren daraman prozesuari, desberdintzapena deritzo. Neuronen desberdintzapenaren lehen urratsa neuritogenesia da, hau da, neuronek, hedaturak garatuko dituzte aurkako polo bietan, zeintzuk axoi batetan eta zenbait dendritetan bilakatuko diren. Polarizazioa amaitzean, hedaturak, kasu honetan pikor zelulen axoi-prozesuak hazte-prozesuan sartuko dira. Aldi berean, pikor zelulek bi prozesu horizontalekiko elkartzuta den hirugarren prozesu bat hedatzen dute eta somari jarraituz behin-betiko lekura migratuko dute. Paraleloki, prozesu horizontal bien fusioa ematen da, beraien ezaugarria den “T” forma duten pikor zelulen axoiak, zuntz paraleloak (ZP) sortuz eta bertan, kontaktu sinaptikoak ezarriko dituzte Purkinje zelulen arantza dendritikoekin geruza molekularrean (GM) (De la Torre-Ubieta eta Azad Bonni, 2011). Purkinje zelulak zerebeloaren ardatza dira eta beraiek integratzen dute zerebelora heltzen den informazio guztia.

Helduaren eta heltzen dagoen zerebeloaren betekizunak desberdinak izanik, itxaron genezakeen EKSaren osagaiek ultraegitura mailako aldaketak izatea beraien kokapenean. Horretan oinarrituta planteatu genuen gure lehen helburua:

- 1.- CB₁ kannabinoide hartzailea eta 2-AG endokannabinoidea sintetizatu eta degradatzen duten entzimek, DAGL- α eta MAGL hurrenez hurren, kokapenearen ultraegitura mailako azterketa, jaio osteko garapeneko prozesuak jasaten dauden zerebelo kortexeko pikor zeluletan.

EKS zerebeloaren garapenean guztiz garrantzitsua izan daitekeela kontutan izanda, CB₁ kannabinoideen hartzailearen gabeziak izan dezakeen eragina ezagutu nahi izan genuen CB₁ hartzailea espresatzen ez duten genetikoki moldatutako saguetan (CB₁-KO). Hori aztertzeko asmoz ezarri genuen 2. helburua honakoa izan zen:

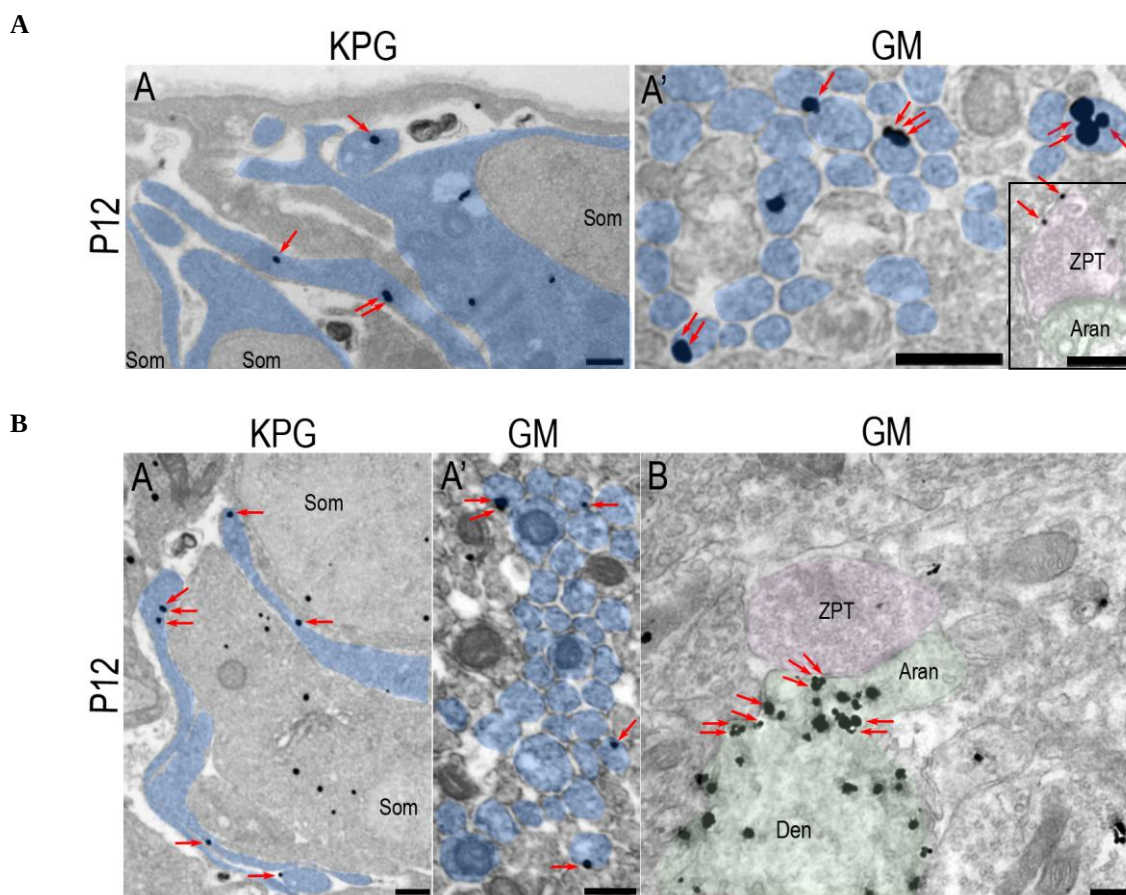
- 2- CB_1 ez duten zuntz paraleloen bukaera sinaptikoek (ZPT) helduan erakusten duten morfologia aztertuko da. Horretarako, jatorrizko sagu helduen zuntz paraleloen ultraegitura mailako parametro desberdinak neurtuko dira eta CB_1 -KO saguek erakusten dituztenekin alderatu.

3. Ikerketaren muina

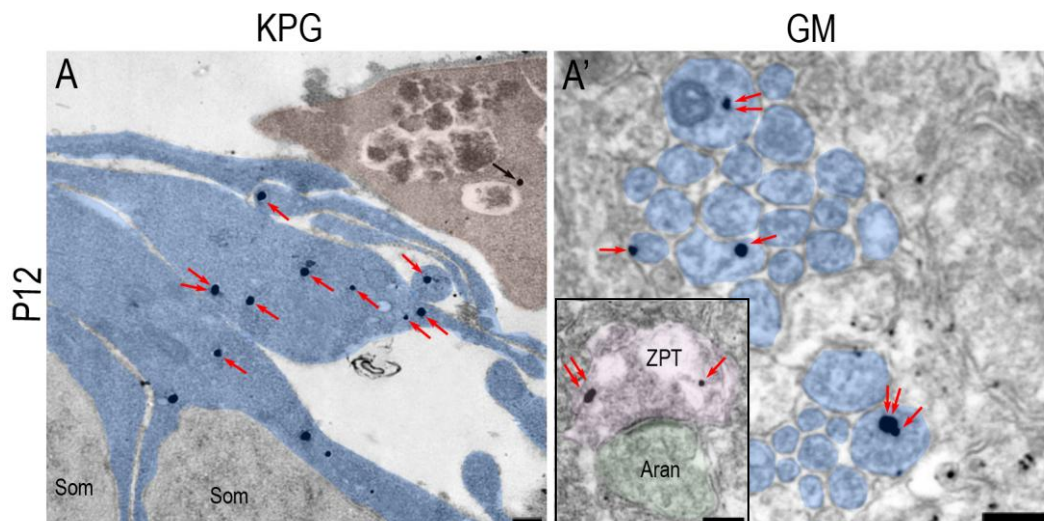
Aurkeztutako helburuak burutzeko, berariazko antigorputzak erabili genituen, teknika immunohistokimikoekin konbinatuz. Lagin desberdinak, handipen handiko mikroskopio elektronikorako prestatu genituen ezinbestekoa baita zehaztasun handiz zelulen mintza, organulu txikienak eta proteinen kokapen zehatza ikusi ahal izateko. Zehazki, garapenean EKSak parte hartzerik duen argitzeko asmoz, burututako azterketarako jaio osteko 0, 5 eta 12 egun (P0, P5 eta P12) dituzten arratoiak erabili genituen. ZPT-en ezaugarri fenotipikoak ultraegitura mailan aztertzeke, sagu helduen zerebeloaren ehuna aztertu zen zuzenean, antigorputzik erabili gabe. Azken hauetan, parametro morfologiko desberdinak aztertu genituen, hala nola, sinapsien kopurua, sinapsien tamaina, terminalen tamaina, besikulen kopurua eta arantza dendritikoen tamaina.

Laburbilduz, erabilitako animaliak honako hauek izan ziren:

- **Sprague Dawley** jatorrizko arratoiak, jaio osteko adin desberdinetakoak: P0, P5 eta P12.
- **CB_1 -WT**: C57 anduiko jatorrizko saguak (CB_1 -WT izendaturikoak; ingeleseko CB_1 -wild-type). Animalia hauek, CB_1 hartzailearen distribuzio normala dute.
- **CB_1 -KO**: C57 anduiko saguak dira; hauek, ez dute CB_1 hartzailerik (CB_1 -KO; ingeleseko CB_1 -knock-out).



C



1. Irudia: CB₁ hartzailleak (A), DAGL- α (B) eta MAGL entzimek (C) zerebeloaren kortexeko pikor zeluletan duten ultraegitura mailako kokapena, jaio osteko P12. egunean, zeinetan garapeneko prozesu guztiak erakusten diren. Kanpoko pikor geruzan (KPG) dauden pikor zelulen somak migrazioan eta beraien hazten dauden axoi-prozesuak erakusten dira (urdinez). GMan, zuntz paraleloen axoiak adieraten dira (urdinez). Profil hauetan, urre partikulak mintzean agertzen dira hartzaillea identifikatuz (A) eta mintzaren hurretasunean entzimen kasuan (B,C) gezien bitartez adierazita. A irudiko A' argazkian, B irudiko B argazkian eta C irudiko A' argazkian, sinapsia sortzean duten kokapena erakusten da. CB₁ hartzaillea eta MAGL alde presinaptikoan geratzen dira behin-betiko eta DAGL- α , berriz, elementu postsinaptiko edo Purkinje zelulen arantza eta dendritetan kokatzen da. KPG, kanpoko pikor geruza; GM, geruza molekularra; P, jaio osteko eguna; Som, soma, ZPT, zuntz paraleloen axoi-botoia; Aran, arantza; Den, dendrita.

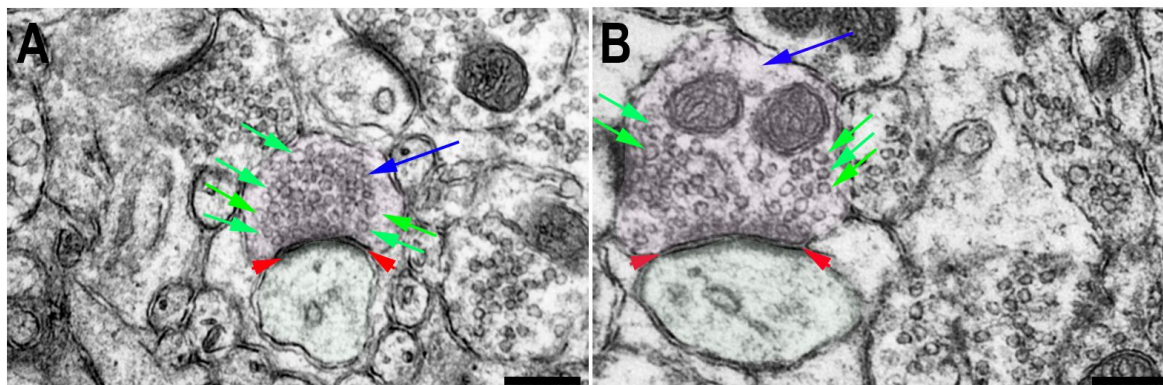
Mikroskopia elektronikoa gure intereseko proteinak ikuskatzeko antigorputzak erabili genituen. Antigorputz horiek metal partikula bat izango dute atxikia, beraz, aztertzen gabiltzan proteinak kokatzen diren lekuan metal partikula bat agertuko zaigu. Modu horretara, CB₁ hartzaillearen eta DAGL- α eta MAGL proteinak identifikatu eta kuantifikazioa egin genuen. Gure emaitzen arabera, jaio osteko garapenean (P0, P5 eta P12) osagai guztiak kanpoko pikor geruzaren zabalera osoan zehar agertzen dira, luzatzen ari den axoi-prozesu horizontalen eta baita prozesu bertikalean ere, mintzean eta mintzaren hurretasunean ere (1. irudia). Hirurak pikor zelulen axoi-prozesuetan batera egoteak, hau da, konpartimendu berean, modu autokrinoan lan egin dezaketela iradokitzen du. Horrela, eKBen sintesia, hartzaillearekiko lotura eta ondoriozko zelula-barneko seinaleztapena toki bereborean gertatzen dira. Axoiaren hazkuntza eta migrazio prozesuak dirauten bitartean, eta sinapsiak guztiz ezarri arte, osagai hauen kokapena mantendu egiten da. Axoiaren muturra bere helburura heltzerakoan eta sinapsia gaitzen denean, EKSko osagai hauek aldaketa topografiko bat erakusten dute. Aldaketa hau, sistemaren eskakizun funtzionalarekin batera doa: garapen neuronal hasieran eta, azkenik, neurotransmisioaren modulazioa. Zerebelo helduan, nerbio-sistemako beste eskualde askotan bezala, bigarren neuronak ekoiztutako eKBak, aurreko neuronan kokatuta dauden hartzailleak kitzikatzen ditu, modu parakrinoan neurona horren transmisioa doituz.

EKSak pikor zelulen garapenean erakusten duen kokapen espezifikoak prozesu horiekin estuki erlazionaturik dagoela adierazten du. Horregatik interesatu ginen horren gabeziak izango lituzkeen ondorioetatik eta kannabinoide hartzaillea espresatzen ez duten genetikoki moldatutako saguez baliatu ginen. Animalia-mota hauetan burututako lanek, zerebeloarekin erlazionatuta dauden urritasun funtzionalak erakusten dute, adibidez, ikasketa motorrean. Zerebeloaren menpe dagoen koordinazio motorra, berriz, ez da kaltetua suertatzen eta faktu hori, harrigarria da, EKSak zerebeloak burutzen duen funtzio horretan parte hartzen baitu. Hori argitze aldera, animalia hauetan, ultraegitura mailako zenbait parametroren azterketa anatomiko zehatza egin genuen, hala nola, sinapsien kopurua, sinapsien tamaina, terminalen tamaina, besikulen kopurua eta arantza dendritikoen tamaina. Image-J programa (1.43u bertsioa, NIH, USA) erabili genuen mikroskopia elektronikoaren bitartez lortutako argazkietan parametro morfologiko hauek neurtzeko.

Funtzio aldetik desberdinak diren eta erasoen aurrean sentsibilitate desberdina erakusten duten zerebeloaren bi eskualde aztertu genituen; zehazki, 10. lobulua oreka-sistemearekin erlazionatua eta 5. lobulua giharren kontrolarekin erlazionatua. Azken hau, kalteberagoa da eta beraz, CB₁ hartzaillearen

gabeziak ondorio desberdinak izan zitzakeen (Clark et al., 2000; Tolbert eta Clark, 2000; Orvis et al., 2012). Zentzu honetan, CB₁ hartzailea ez duten animalietan, bukaera sinaptikoen morfologia zeharo aldatzen dela ikusi genuen baina aldaketa hau ez zen berdina izan lobulu bi hauentzat. 10. lobuluan aldaketak gertatzen diren arren, 5. lobulua da aldaketa nabarmenenak erakusten dituen, hain zuzen ere, kalteberena den lobulu hau.

CB₁ espresatzen duten saguenarekin (CB₁-WT) alderatuz, sinapsi kopurua txikiagoa da eta ezartzen dituzten sinapsiak luzeagoak dira. Bestalde, bukaera sinaptikoei tamaina edo azalera handiagoa erakusten dute eta barruko neurotransmisoreak metatzen dituzten besikulak, sakabanatuago daude.



2. Irudia: 5. lobuluan CB₁ hartzailearen gabeziak ZPen morfologian duen eragina. Pikor zelulen axoi diren ZPen botoi sinaptikoak arrosaz adierazten dira (gezi urdinez ere identifikatuak) eta Purkinje zelulen arantzak berdez koloreztatuta daude (A,B). A argazkia, CB₁ espresatzen duen saguari helduari dagokio eta B argazkia, berriz, CB₁ hartzailerik ez duen saguari dagokio. Gezi berdeak, besikulak adierazten dituzte. Gezi-buru gorriek, sinapsiaren luzera mugatzen dute. Eskala-barrak:0,25 μm.

1. taula. CB₁ hartzailearen gabeziak ZPTen botoi sinaptikoen morfologian dituen eraginak.

Aztertutako parametrua	CB ₁ -WT Batezbestekoa±errore estandarra	CB ₁ -KO Batezbestekoa±errore estandarra	Test estatistikoa
Botoi sinaptikoaren tamaina (μm ²)	0,31±0,008	0,43±0,013 ***	Mann-Whitney U
Sinapsiaren luzera (nm)	303,6±5,372	343,8±6,622 ***	Mann-Whitney U
Besikulen dentsitatea (μm ²)	381±16,01	249,9±13,13 ***	t-Student

*Mann-Whitney U eta t-Student, p<0,0001*** esanguratsua.*

4. Ondorioak

Endokannabinoiden sistemako aztertutako 3 osagaiak (hartzaile eta entzima biak) zerebeloaren kortexean jaio osteko garapenean pikor zelulen axoi-prozesuetan jasaten ari diren garapeneko prozesu guztietan zehar espresatzen dira. CB₁ hartzailea mintzean kokatzen da eta entzimak, mintzaren hurretasunean. Horrek adierazten du, eKBen sintesia zein seinaleztapena autokrinoki, zuntz paraleloetan bertan gertatzen dela. Proteina hauek adinarekin batera aldaketa topografikoa jasaten dute. CB₁ eta MAGL presinaptikoki mantentzen dira adin heldura arte zuntz paraleloen bukaera sinaptikoan; DAGL-α berriz, profil postsinaptikoan espresatzen hasten da, Purkinje zelulen arantza-dendritiko eta dendritetan. Horrek adierazten du, helduan eKBen sintesia alde postsinaptikoan emango dela eta alde presinaptikoan, hau da, zuntz paraleloen CB₁ hartzaileetan eragingo duela. Azken kokapen hau, helduan agertzen den kokapen ohikoa da eta transmisio sinaptikoan parte hartzearen adierazle. Aldaketa topografiko hau, sistemaren eskakizun funtzionalarekin batera doa: garapen neuronala hasieran eta, azkenik, neurotransmisioaren modulazioa.

EKSak, lehen esan bezala, neurotransmisioa doitzen du. Zuntz paraleloei dagokienez, botoi sinaptikoetako besikuletan metatzen da kitzikatzailea den glutamatoa neurotransmisore eta, beraz, glutamato honen askatzea kontrolatuko du CB₁ hartzaileak, neurotransmisore honen gehiegizko askapenak eragin toxikoak izan ditzazkeelako inguruko neuronetan, beraien biziraupena baldintzatuz.

CB₁en gabeziak ondorio larriak izan ditzake beraz zerebelo kortexean. Gure emaitzek ikustarazi dute CB₁ hartzailerik ez izateak, zuntz paraleloen bukaera sinaptikoen morfologiarengan aldaketa nabarmenak eragiten dituela, batez ere sentiberagoa den 5. lobuluan. Elementu postsinaptikoak, hau da, Purkinje zelulen arantza-dendritikoak aldaketa barik dira eta, beraz, CB₁ hartzailaren gabeziak elementu presinaptikoan baino ez du eragina. CB₁ ez duten saguetan (CB₁-KO), 5. lobulu honek, hain kaltebera ez den 10. lobuluak dituen ezaugarriak erakusten ditu. Beraz, animalia hauek CB₁ hartzailarekiko duten gabeziak sor ditzakeen ondorioak hain larriak izanik, sistemak berak egokitzapen morfologikoak jasaten ditu, arrisku gutxiago suposatzen duen egitura eskainiz. Handiagoa den eta besikulak sakabanatuago dituen bukaera sinaptiko batek egoera fisiopatologikoen aurrean irmotasuna eskaini dezake, horrela, neurotransmisoreen askatze-probabilitatea jaitsiz. Izan ere, hauek dira kalteberatasun gutxiago duen 10. lobuluak aurkezten dituen ezaugarriak. Aldaketa hauek izan daitezke animalia hauek izan beharko lituzketen urritasun funtzionalak pentsa baino arinagoak izatearen erantzuleak.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Gure azterketen bitartez EKSren osagaien kokapen zehatza aztertu dugu zerebeloaren jaio osteko garapeneko zuntz paraleloetan. Kokapen hori, helduan agertzen denaren desberdina da garapenean duen funtzioa iradokiz. Etorkizunean, farmakologikoki saiakera desberdinak egitea gustatuko litzaiguke eKB mailak aldatuz eta hartzaila inhibituz horrek zuntz paraleloen heltze-prozesu zehatzetan zein ondorio duen aztertzeko.

Horrez gainera, edokannabinoidiek garapenean izan ditzaketen eragina ikusiz, haurdun dauden sagu kumeetan fitokannabinoidak kontsumitzeak eduki ditzakeen ondorioak ultraegitura mailan aztertzea interesgarria da, gizartean gerta daitekeen egoera bat baita.

Bestalde, ikusi da Dravet sindromean (epilepsia errefraktarioa) zein hipoxia perinatalean, umeetan gertatzen diren bi kasutan, kannabinoidetan oinarritutako tratamenduak oso eraginkorrak izan daitezkeela. Momentuz ez da ezagutzen tratamendu horiek neuronon garapenean eduki ditzaketen ondorioak. Gure asmoa da, tratamendu horiek gure erudian duten eragina aztertzea etorkizunean albo efektu gutxien duten tratamenduak garatze aldera.

6. Erreferentziak

- Aguado T., Palazuelos J., Monory K., Stella N., Cravatt B., Lutz B., Marsicano G., Kokaia Z., Guzmán M., Galve-Roperh I. (2006): "The endocannabinoid system promotes astroglial differentiation by acting on neural progenitor cells". *J Neurosci*, 26(5):1551-61.
- Berghuis P., Dobszay M.B., Wang X., Spano S., Ledda F., Sousa K.M., Schulte G., Ernfors P., Mackie K., Paratcha G., Hurd Y.L., Harkany T. (2005): "Endocannabinoids regulate interneuron migration and morphogenesis by transactivating the TrkB receptor". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52):19115-20.
- Berghuis P., Rajnec A.M., Morozov Y.M., Ross R.A., Mulder J., Urbán G.M., Monory K., Marsicano G., Matteoli M., Canty A., Irving A.J., Katona I., Yanagawa Y., Rakic P., Lutz B., Mackie K., Harkany T. (2007): "Hardwiring the brain: endocannabinoids shape neuronal connectivity". *Science*, 316(5828):1212-6.
- Berrendero F., GarcíaGil L., Hernández M.L., Romero J., Cebeira M., de Miguel R., Ramos J.A., Fernández Ruiz J.J. (1998): "Localization of mRNA expression and activation of signal transduction mechanisms for cannabinoid receptor in rat brain during fetal development". *Development*, 125(16):3179-88.
- Bilkei-Gorzo A., Racz I., Valverde O., Otto M., Michel K., Sastre M., Zimmer A. (2005): "Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(43):15670-5.
- Biran V., Verney C., Ferriero D.M. (2012): "Perinatal cerebellar injury in human and animal models". *Neurology research international*, 2012:858929.
- Buckley N.E., Hansson S., Harta G., Mezey E. (1998): "Expression of the CB1 and CB2 receptor messenger RNAs during embryonic development in the rat". *Neuroscience*, 82(4):1131-49.
- Chevalyere V., Takahashi K.A., Castillo P.E. (2006): "Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity in the CNS". *Annu Rev Neurosci*, 29:37-76.
- Clark B.R., LaRegina M., Tolbert D.L. (2000): "X-linked transmission of the shaker mutation in rats with hereditary Purkinje cell degeneration and ataxia". *Brain research*, 858(2), 264-73.
- de la Torre-Ubieta L., Bonni A. (2011): "Transcriptional regulation of neuronal polarity and morphogenesis in the mammalian brain". *Neuron*, 72(1):22-40.

- de Salas-Quiroga A., Díaz-Alonso J., García-Rincón D., Remmers F., Vega D., Gómez-Cañas M., Lutz B., Guzmán M., Galve-Roperh I. (2015): "Prenatal exposure to cannabinoids evokes long-lasting functional alterations by targeting CB1 receptors on developing cortical neurons". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(44):13693-8.
- Gaffuri A.L., Ladarre D., Lenkei Z. (2012): "Type-1 cannabinoid receptor signaling in neuronal development". *Pharmacology*, 90(1-2):19-39.
- Kawamura Y., Fukaya M., Maejima T., Yoshida T., Miura E., Watanabe M., Ohno-Shosaku T., Kano M. (2006): "The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum". *J Neurosci*, 26(11):2991-3001.
- Keimpema E., Mackie K., Harkany T. (2011) "Molecular model of cannabis sensitivity in developing neuronal circuits. *Trends Pharmacol Sci*, 32(9):551-61.
- Kishimoto Y., Kano M. (2006): "Endogenous cannabinoid signaling through the CB1 receptor is essential for cerebellum-dependent discrete motor learning". *J Neurosci*, 26(34):8829-37.
- Kishimoto Y., Nakazawa K., Tonegawa S., Kirino Y., Kano M. (2006): "Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for adaptive timing of trace eyeblink conditioned response". *J Neurosci*, 26(5):1562-70.
- Orvis G.D., Hartzell A.L., Smith J.B., Barraza L.H., Wilson S.L., Szulc K.U., Turnbull D.H., Joyner A.L. (2012) "The engrailed homeobox genes are required in multiple cell lineages to coordinate sequential formation of fissures and growth of the cerebellum". *Developmental biology*, 367(1):25-39.
- Patel S., Hillard C.J. (2001): "Cannabinoid CB(1) receptor agonists produce cerebellar dysfunction in mice". *J Pharmacol Exp Ther*, 297(2):629-37
- Tanimura A., Uchigashima M., Yamazaki M., Uesaka N., Mikuni T., Abe M., Hashimoto K., Watanabe M., Sakimura K., Kano M. (2012): "Synapse type-independent degradation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol after retrograde synaptic suppression". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(30):12195-200.
- Tolbert D.L., Clark B.R. (2000): "Olivocerebellar projections modify hereditary Purkinje cell degeneration". *Neuroscience*, 101(2):417-33.
- Williams E.J., Walsh F.S., Doherty P. (2003): "The FGF receptor uses the endocannabinoid signaling system to couple to an axonal growth response". *J Cell Biol*, 160(4):481-6.
- Yoshida T., Fukaya M., Uchigashima M., Miura E., Kamiya H., Kano M., Watanabe M. (2006): "Localization of diacylglycerol lipase- α around postsynaptic spine suggests close proximity between production site of an endocannabinoid, 2-arachidonoyl-glycerol, and presynaptic cannabinoid CB1 receptor". *J Neurosci*, 26(18):4740-51.
- Zhou Y., Oudin M.J., Gajendra S., Sonogo M., Falenta K., Williams G., Lalli G., Doherty P. (2015): "Regional effects of endocannabinoid, BDNF and FGF receptor signalling on neuroblast motility and guidance along the rostral migratory stream". *Mol Cell Neurosci*, 64:32-43.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa honek honako diru-laguntzak izan ditu: Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) beka; Eusko Jaurlaritza GIC07/70-IT-432-07; Zientzia eta Berrikuntza Ministerioa SAF2009-07065; Euskal Herriko Unibertsitatea UFI11/41; Droga-menpekotasun Arazoen Sarea (RTA)-Carlos III. Osasun-Institutua RD12/0028/0004; Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioa (MINECO) BFU2012-33334; Eusko Jaurlaritza IT764-13.