



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

**Sistema endokannabinoidearen
eragina estres kronikodun sagu
eredu batean**

*J. Egaña, A. Fernandez, N. Royo,
L. Reguero, N. Puente, P. Grandes,
I. Elezgarai eta R. Sarria*

824-831 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.115>

ANTOLATZAILEA:



udako
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



Bizkaiko Foru Aldundia
Diputación Foral de Bizkaia

eman ta zabal zazu



UPV EHU

LAGUNTZAILEAK:



Deusto
Universidad de Deusto
Deustuko Unibertsitatea



MONDRAGON
UNIBERTSITATEA



UDALBILTZA



upna
Universidad
Pública de Navarra
Nafarroako
Unibertsitate Publikoa

Sistema endokannabinoidearen eragina estres kronikodun sagu eredu batean

Egaña J, Fernández A, Royo N, Reguero L, Puente N, Grandes P, Elezgarai I, Sarria R
Neurozientziak Saila, Medikuntza eta Odontologia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea
E-48940 Leioa

Jegana009@ikasle.ehu.eus

Laburpena

Gaur egun, gero eta ebidentzia gehiago aurkitzen dira sistema endokannabinoideak (eCB) estres-prozesuetan duen ondorioei buruz. Sistema horretan dagoen CB1 hartzailea (CB1R) genetikoki ezabatzeak hipotalamo-hipofisi-adrenal (HPA) ardatzaren aktibitatea areagotzea eragiten du eta animaliak estresera sentsibilizatzen ditu. Are gehiago, ikerketa neurofisiologikoez erakutsi dutenez, CB1 hartzailearen aktibitatean aldaketak gertatzen dira estresaren ondorioz. Aurkikuntza hauek badira ere, ez da oso ezaguna estresaren eragina aipatutako giltzurrun gaineko guruinaren sistema endokannabinoidean.

Hitz gakoak: eCB-CB1R-estres-giltzurrun gaineko guruina

Abstract

Increasing evidence suggests that the endocannabinoid (eCB) system plays a role in stress responses. Genetic disruption of the endocannabinoid signaling by knocking out the cannabinoid 1 receptor (CB1R) increases activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, sensitizing animals to stress. Furthermore, neurophysiological studies reveal changes in CB1 receptor activity following stress. Despite these findings, little is known about how stress affects the endocannabinoid system in the adrenal gland.

Key words: eCB-CB1R-stress-adrenal gland

Sarrera eta motibazioa:

Estresaren erantzunean, estresatzaile fisiologiko zein psikologikoen aurrean gorputzaren homeostasia mantentzeko martxan jartzen diren sistema fisiologikoak biziraupen-tasa handitzeko balio dute. Bi babes-sistema aktibatzen dira nagusiki: nerbio sistema begetatiboa eta sistema neuroendokrinoa. Erantzun begetatiboan, sistema adrenomedularren parte diren giltzurrun gaineko guruinaren muineko zeluletan katekolaminen sintesiaren eta jariapenaren handipena gertatzen da. Erantzun neuroendokrinoan berriz, hipotalamo-hipofisi-adrenal ardatzaren (HPA) aktibazioaren ondorioz, glukokortikoideen jariapenaren handipena gertatzen da (Pecorano et al., 2006).

Endokannabinoide sistema hainbat prozesu fisiologiko eta fisiopatologikotan parte hartzen duen sistema neuromodulatzailea da. Izan ere, estres erantzunaren erregulatzaile kritikoa moduan proposatu izan da HPA ardatzaren sentsibilitatea eta aktibitatea modulatu dituelako (Steiner et al., 2008). Endokannabinoide sistemaren inhibizioak HPA sistemaren aktibazioa eragiten du (Patel eta Roelke, 2004). Gainera sistema horrek estres-egoeren aurrean gertatzen diren egokitzapen-prozesuetan ere parte hartzen du (Patel eta Hillard, 2008).

Hau guztia jakinda, gure interesa sistema endokannabinoidearekin erlazionatutako proteina desberdinak giltzurrun gaineko guruinean espresatzen diren ala ez jakitea izan da. Horrez gain, estres kronikodun egoeran proteina ezberdinen espresioarekin zer gertatzen den aztertu dugu.

Arloko egoera

HPA ardatzean hiru atal bereizten dira: a) hipotalamoa, non nukleo paraventrikularreko tamaina handiko neuronek kortikotropinaren faktore askatzailea (CRF) sintetizatu eta jariatzen duten b) hipofisia, non zelula kortikotropikoez CRFren eraginez kortikotropina (ACTH) sintetizatu eta askatzen duten eta c) giltzurrun gaineko guruinaren kortexa edo azala, non nagusiki ACTHren efektuagatik glukokortikoideak jariatzen diren (Tasker eta Herman, 2011).

Hormona horiek atzeraelikadura mekanismo negatibo baten bitartez, HPA ardatzaren atal zentralen funtzioa (hipotalamoia zein hipofisiarena) inhibitzen dute. Atzeraelikaduraren fase azkarrean gertatzen diren aldaketak mintzeko glukokortikoideen hartzaileek endokannabinoiden ekoizpenean daukaten eraginagatik gertatzen dira (Malcher-Lopes et al., 2006).

Endokannabinoidak sinapsi atzeko mintzean sintetizatzen diren molekula lipidikoak dira. Garrantzitsuenak 2-AG (2-arakidonilglizerola) eta anandamida (N-arakidoniletanolamida) dira. Espezifikoak diren hartzaileekin (CB1 eta CB2) batuz, sinapsi aurreko neurotransmisoreen askapena inhibitzen dute (Howlett et al., 2002). Egoera normaletan sistema endokannabinoidak erregulazio negatibo bat eragiten du HPA ardatzean eta nerbio sistema begetatiboan eta ondorioz, sistema horietako hormonon jariatzea inhibitzen da. Estres-egoeretan, endokanabinoide mailak jaisten dira eta horren ondorioz, inhibizioa eteten da eta aipatutako bi sistemak berriro aktibatzen dira (Hill et al., 2011).

Orain arteko ikerketa gehienak HPA ardatzaren egitura zentraletan egin dira; hala ere, azkenaldian plazaratutako zenbait artikulutan sistema horren eragina ardatzaren eremu periferikoan ere eman daitekeela argitaratu da, hots, endokanabinoideek giltzurrun gaineko guruinean ere eragin zuzena dutela. Horrela, untxietan egindako ikerketa baten, zelula kromafinen adrenalina-jariaketan sistema endokanabinoidearen inplikazioa frogatu da (Niederhoffer et al., 2001). Horrez gain, RT-PCR teknika erabiliz, endokanabinoide lehen eta bigarren motako (CB1 eta CB2) hartzaileen espresioa egiaztatu da gizakien guruineko zelula kortikaletan. Gainera, CB1 motako hartzailearen aktibazioak esteroidegenesiararen inhibizioa eragiten du (Ziegler et al., 2010).

Helburua:

HPA ardatzaren erregulazioan sistema endokanabinoideak duen parte-hartzea jakina delarik, lan honen hasierako helburua giltzurrun gaineko guruinean endokanabinoide sistemarekin erlazionatutako proteinen espresioa frogatzea izan da. Giltzurrun gaineko zelulen funtzioarekin zerikusia duten beste proteinen espresioa ere bilatu da. Horrez gain, estres kronikodun egoeretan giltzurrun gaineko zeluletan sistema endokanabinoidearen proteinen espresioan eman daitezkeen aldaketak aztertu dira. Helburu horiek aurrera eramateko, teknika immunozitokimikoak erabili ditugu, mikroskopio optikorako zein elektronikorako.

Ikerketaren muina:

Ikerketa burutzeko hiru sagu mota erabili dira. C57 sagu kontrolak eta kronikoki estresatuak izan diren animaliak. Animaliak estresatzeko immobilizazio-teknika bat erabili da non saguak plastikozko poltsa itxietan sartzen diren egunero ordubetez, 10 egunetan zehar. Hirugarren animalia mota CB1 hartzailearen sagu *knockout*-a izan da.

Animalia guztiak perfunditu ondoren ateratako giltzurrun gaineko guruinak moztu dira bibratomo baten bidez 40 mikra lodierako xerrak lortzeko. Teknika immunozitokimikoak erabiliz sistema endokanabinoideekin erlazionatutako proteina desberdinen espresioak aztertu dira animalia kontrolatan eta estresatuen giltzurrun gaineko hainbat eremutan, zehatzago, azalean eta muinean. Horien artean CB1, TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid subfamily, member 1*) eta DAGL α (*diacylglycerol lipase α*) 2-AG sintesian parte hartzen duen entzimaren proteinak daude. Proteina horiez gain, giltzurrun gaineko zelulen funtzioarekin zerikusia duten beste proteina batzuk bilatu dira. Horien artean TH (*tyrosine hydroxylase*) katekolaminen sintesian parte hartzen duen entzima eta sinapsi aurreko eremuan kokatzen diren I taldeko glutamatoaren hartzaile metabotropikoak, mGluR1a eta mGluR5a. Proteina desberdinen espresioak mikroskopio optikoan zein elektronikoan aztertu dira. Laginak mikroskopio elektronikoan ikusi ahal izateko, aurretik zilar bidezko intentsifikazioa erabiltzen duen urre markaketaren bidez proteinak markatu dira. Ikerketan lortutako emaitzen argi mikroskopio mailako azterketa argazki kamera bat duen (AxioCam HRC) Zeiss AxioPhot mikroskopio batean burutu da. Antigorputzen markaketen intentsitatea neurtzeko Image J programa erabili da eta lortutako datuen analisi estatistikoa GraphPad (Prism 4, 4.03 bertsioa)

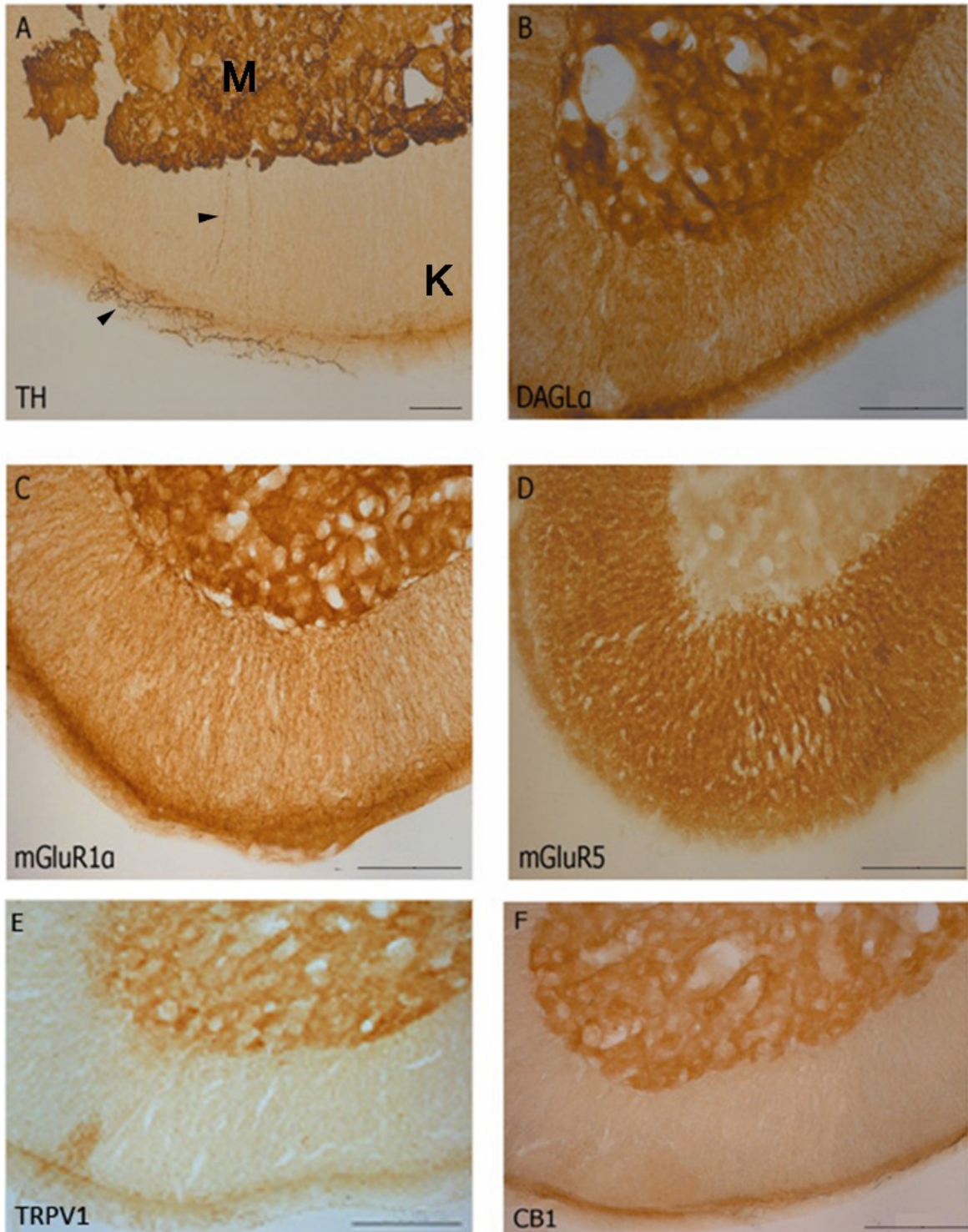
programa informatikoa erabiliz egin da. Mikroskopia elektronikoa mailako behaketa Morada kamara bati lotutako Philips EM2008S mikroskopia batean egin da.

Argi mikroskopia mailan, animalia kontrolatan TH immunorreaktibitatea muineko zelula kromafinetan ikusten da (1A irudia), non katekolaminak (epinefrina eta norepinefrina) ekoizten diren. Gainera, giltzurrun gaineko guruinaren kapsulan eta azalean zehar TH immunorreaktiboak diren nerbio zuntzak ere ikus daitezke (1A irudia). Kokapena eta intentsitateari dagokionez, aztertutako endokannabinoidesistemarekin erlazionatutako proteinen espresioak ez dira uniformeak izan. CB1 hartzaillearen markaketa batez ere muineko zelula kromafinetan ikusten da, nahiz eta azalean ere agertu (1F irudia). Giltzurrun gaineko muineko zelulak ere intentsitate handiko DAGL markaketarekin agertzen dira (1B irudia). Azalean ere hari itxurako DAGL espresioa dago (1B irudia). Azkenik TRPV1 espresioa bakarrik guruinaren muineko zatian ikusten da (1E irudia). Aztertutako I taldeko glutamatoaren hartzaille metabotropikoen espresioa guztiz desberdina da. mGluR5 immunorreaktibitatea azaleko geruza guztietan agertzen da (1D irudia), mGluR1 markaketa, aldiz, giltzurrun gaineko muineko zeluletan soilik aurki daiteke (1C irudia).

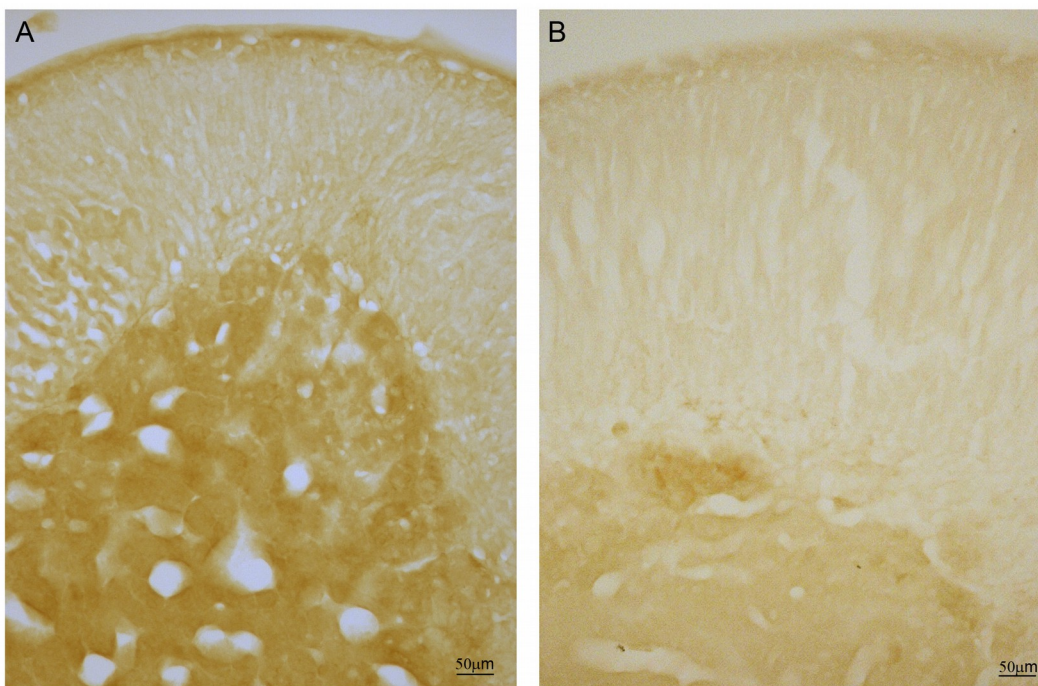
Animalia estresatuetan ikusitako antigorputzen kokapenek, kontrol animaliekin alderatuta, ez dute ezberdintasunik adierazten. Hala ere, estresatutako animalietan CB1 hartzaillearen markaketaren intentsitatea kontrol animaliena baino txikiagoa da, batez ere muineko zeluletan (2A eta 2B irudia). GraphPad programa informatikoa erabiliz, animalia estresatuen muineko zeluletan gertatzen den CB1 hartzaillearen markaketaren intentsitate jaitsiera esanguratsua dela ($p < 0.05$) bermatu dugu (1.taula). Animalia estresatuen kortexeko zeluletan lortutako CB1 hartzaillearen markaketaren intentsitatea baxuagoa da animalia kontrolarena baino. Hala ere, jaitsiera hori ez da esanguratsua ($p > 0.05$).

Mikroskopia elektronikorako prozesatutako laginetan, animalia kontrolatan, CB1 hartzaillearen espresioa giltzurrun gaineko guruinaren zelula kortikalen arteko odol-hodietako paretako zeluletan behatu dugu (3A). Animalia estresatuetan CB1 hartzaillearen markaketa kortexeko zelula mota berdinetan ikusten da (3B). Ikusitako markaketa espezifikoa dela ziurtatzeko, CB1 hartzaillearen sagu *knockout*-ak erabili dira, eta animalia mota horietan ez da hartzaillearen markaketarik ikusi (3C). Muineko zeluletan ere nerbio bukaeren mintzean eta zelulen mitokondrietan CB1 hartzaillearen markaketa dagoela ikusi da (4.irudia).

1. irudia. Argi mikroskopio mailan endokannabinoide sistemaren proteinen (CB1, DAGL α eta TRPV1), glutamato hartzaile metabotropikoen (mGluR1 α eta mGluR5) eta TH-ren immunorreaktitateak sagu kontrolen giltzurrun gaineko guruinean. **(A)** TH immunorreaktiboak diren muineko zelulak eta TH-arekiko immunorreaktiboak diren kapsulako eta kortexeko zuntzak (gezi buruak). **(B)** DAGL α -ren immunorreaktitatea muineko zein kortexeko zeluletan agertzen da. **(C)** mGluR1 immunorreaktiboak diren zelulak, kortexeko geruza glomerularrean eta muineko zeluletan kokatzen dira. **(D)** mGluR5 immunorreaktiboak diren zelulak soilik kortexeko geruzetan ikusten dira. **(E)** TRPV1-ren immunorreaktitatea kortex zein muinean agertzen da. **(F)** CB1-ren immunorreaktitatea batez ere muineko zeluletan agertzen da.



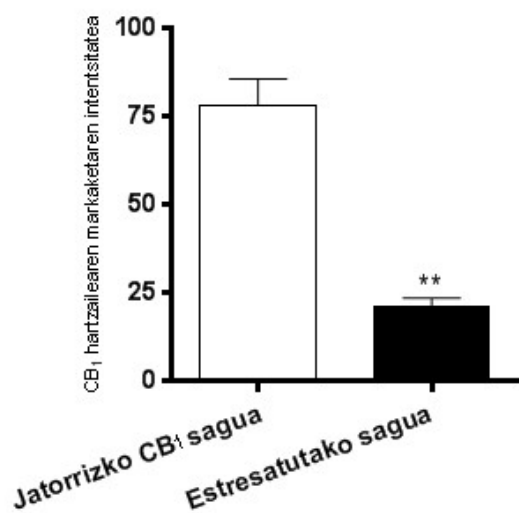
2. irudia. Argi mikroskopio mailan CB1 hartzaillearen giltzurrun gaineko guruinaren markaketa. Kronikoki estresatutako saguetan muineko zelulen markaketaren intentsitatea (**B**), sagu kontroletan ikusitakoa baino baxuagoa da (**A**).



1. taula. GraphPad programa informatikoaren bidez burututako analisi estatistikoaren arabera CB1 hartzaillearen markaketaren intentsitatea txikiagoa da kronikoki estresatutako saguetan jatorrizko saguetan baino. Jaitsiera hau giltzurrun gaineko muinean (**A**) zein kortexean (**B**) gertatzen bada ere, kortexean baino ez da adierazgarria ($p < 0.05$).

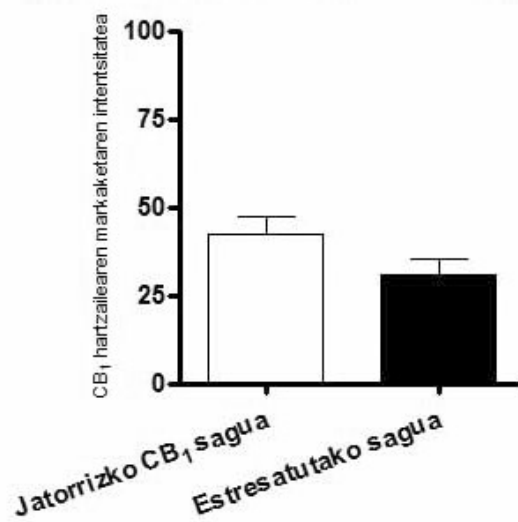
A

CB₁ hartzaillearen intentsitatea muineko zeluletan

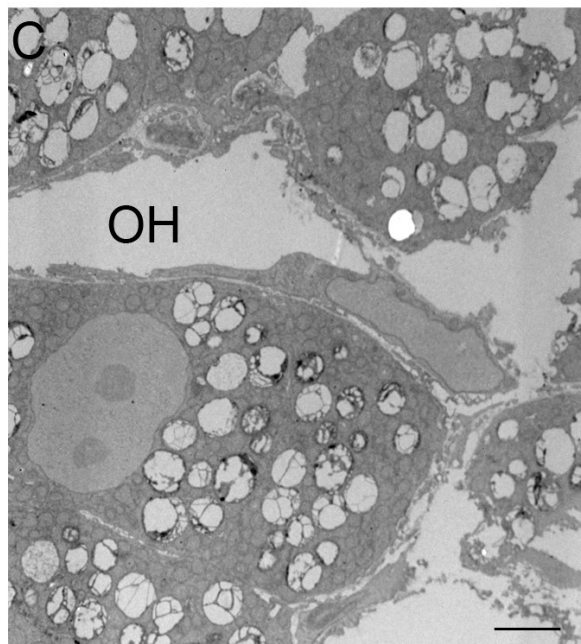
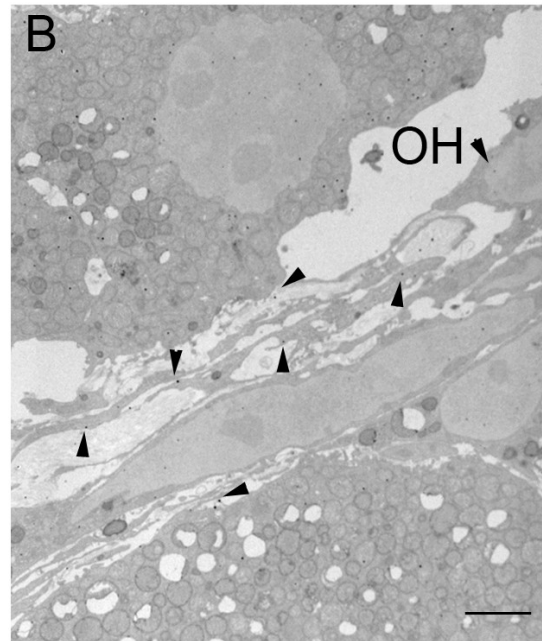
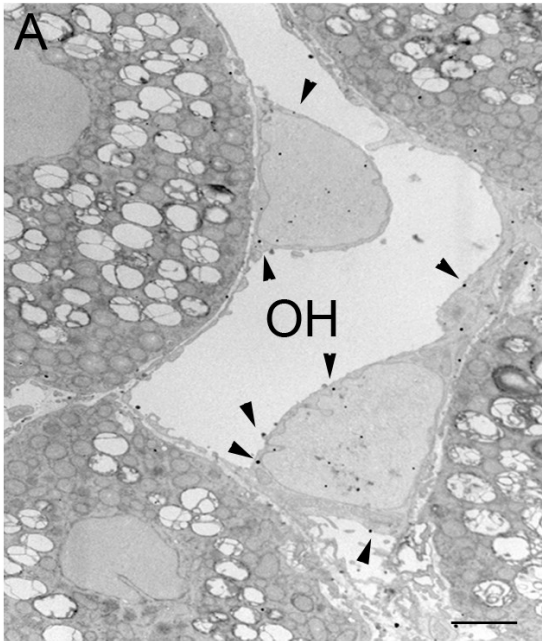


B

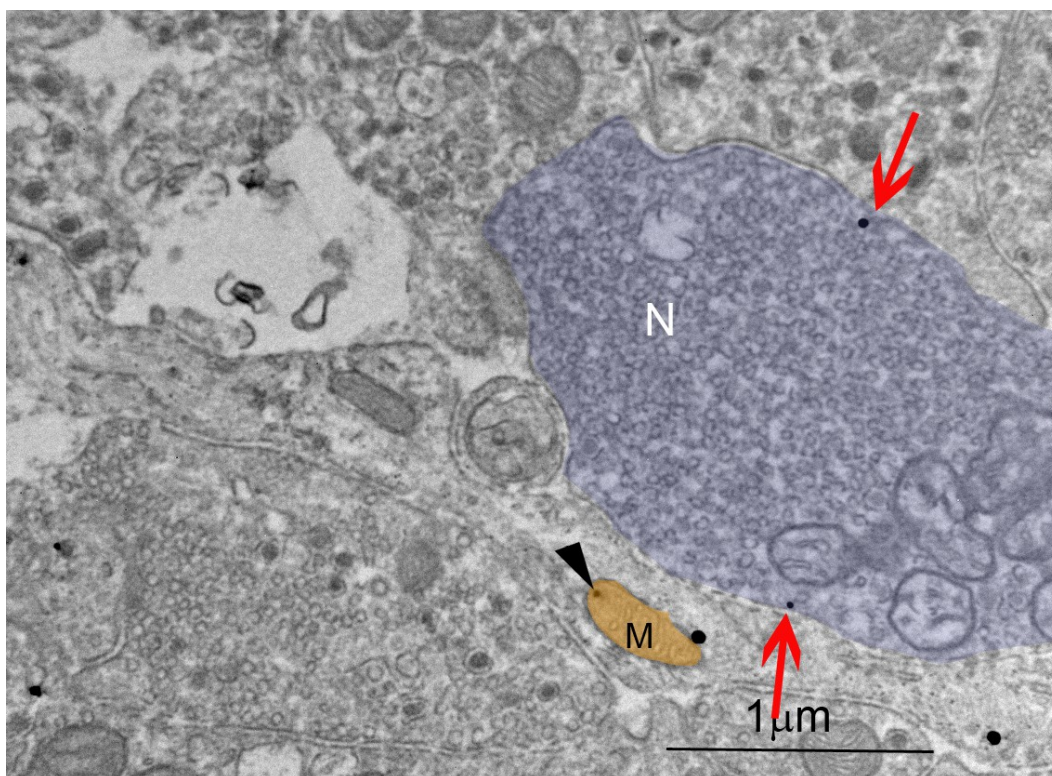
CB₁ hartzaillearen intentsitatea kortexeko zeluletan



3. irudia. Mikroskopia elektronikoaren bidez lortutako giltzurrun gaineko guruinaren kortexeko irudiak. Sagu kontrolatan (A) CBI hartzailaren espresioa (gezi burua) zelula kortikalen inguruko odol-hodien (OH) zelula endotelialeetan ikusten da. Estres kronikoa jasan duten saguetan (B) ere CBI hartzailaren espresioa zelula mota berdinetan behatzen da. CBI hartzailaren sagu *knockout*-etan berriz (C), ez da aipatutako endotelioko zelula horietan CBI hartzailaren markaketarik ikusten.



4. irudia. Mikroskopia elektronikoaren bidez lortutako giltzurrun gaineko guruinaren muineko irudia. Sagu kontrollean CB1 hartzailearen markaketa (gezia) sinapsi aurreko nerbio bukaeraren (N) mintzean kokatzen da. Horrez gain, CB1 hartzailearen markaketa (gezi burua) mitokondrietan (M) ere ikusten da.



Ondorioak

Endokannabinoiden sistemaren proteinak, HPA ardatzaren egitura zentraletan kokatzeaz gain, ardatzaren egitura periferikoan ere, hau da, giltzurrun gaineko guruinean espresatzen dira. Izan ere CB1R, DAGL α eta TRPV1 proteinak aurkezten baititu.

CB1 hartzailearen espresioa animalia kontrol zein estresatuen giltzurrun gaineko guruinaren kortexeko eta muineko zeluletan ikusten da.

Kronikoki estresatutako animalietan bai kortexeko zein muineko zeluletan CB1 hartzailearen markaketaren intentsitatea animalia kontrolarena baino baxuagoa da. Jaitsiera hau soilik muineko zeluletan da esanguratsua ($p < 0.05$).

Animalia kontrolatan ere, giltzurrun gaineko guruinaren funtzioarekin erlazionatutako hartzaile metabotropikoak espresatzen dira. mGluR1 hartzailearen espresioa kortexeko zein muineko zeluletan aurkitzen da, aldiz mGluR5 hartzailearen espresioa kortexean baino ez da ikusten.

Etorkizuna:

Gure ikerketa taldearen helburu nagusia sistema endokannabinoidak, bai egoera fisiologiko zein fisiopatologikoetan gertatzen den plastiktasun sinaptikoan inplikaturik dauden ekintza mekanismoak aztertzea da. Proiektu honetan lortu diren emaitzak kannabinoideen ekintza farmakologikoa zehaztea ahalbidetuko dute. Gainera, sistema endokannabinoidaren eta bertan inplikaturiko proteinen modulazioak estresari loturiko gaixotasunetan izan dezaketen parte-hartzea, argituko lukete. Honekin batera, sistema endokannabinoidan eragina duten antsiolitiko berrien garapenean garrantzi nabarmena izan dezakeen informazio berria plazaratu dezakete gure ikerketek. Modu honetan kannabinoideak epe luzera dituzten aukera terapeutikoak hobeto aztertzea ahalbidetuko litzateke, ligando farmakologiko berrien sorrerarekin.

Erreferentziak:

Hill MN, McLaughlin RJ, Bingham B, Shrestha L, Lee TT, Gray JM, Hillard CJ, Gorzalka BB, Viau V. (2010): *Endogenous cannabinoid signaling is essential for stress adaptation.. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 18;107(20):9406-9411.

Hill MN, Tasker JG. (2012): *Endocannabinoid signaling, glucocorticoid-mediated negative feedback, and regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Neuroscience.* 1;204:5-16.

Hill, M. N., McLaughlin, R. J., Pan, B., Fitzgerald, M. L., Roberts, C. J., Lee, T. T. Y. & Hillard, C. J. (2011): *Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. J. Neurosci,* 31(29), 10506-10515.

Pecoraro N, Dallman MF, Warne JP, Ginsberg AB, Laugero KD, la Fleur SE, Houshyar H, Gomez F, Bhargava A, Akana SF. (2006): *From Malthus to motive: how the HPA axis engineers the phenotype, yoking needs to wants. Prog Neurobiol.;*79(5-6):247-340.

Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, TI., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A. & Pertwee, R. G (2002): *International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. Pharmacol Rev.* 2002 Jun;54(2):161-202.

Malcher-Lopes, R., Di, S., Marcheselli, V. S., Weng, F. J., Stuart, C. T., Bazan, N. G., & Tasker, J. G. (2006): *Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release. . Neuroscience.,* 26(24), 6643-6650.

Niederhoffer, N., Hansen, H. H., Fernandez-Ruiz, J. J., & Szabo, B. (2001): *Effects of cannabinoids on adrenaline release from adrenal medullary cells. Br J Pharmacol.* 134(6):1319-1327.

Patel S, Hillard CJ. (2008): *Adaptations in endocannabinoid signaling in response to repeated homotypic stress: a novel mechanism for stress habituation. Eur J Neurosci.* Jun;27(11):2821-2829.

Patel S, Roelke CT, Rademacher DJ, Cullinan WE, Hillard CJ. (2004): *Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Endocrinology.;*145(12):5431-5438.

Steiner MA, Wotjak CT. (2008): *Role of the endocannabinoid system in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Prog Brain Res;*170:397-432.

Tasker JG, Herman JP. (2011): *Mechanisms of rapid glucocorticoid feedback inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Stress.,* 14(4):398-406.

Tsigos, C., & Chrousos, G. P. (2002): *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J Psychosom Res.* 53(4):865-887.

Ziegler, C. G., Mohn, C., Lamounier-Zepter, V., Rettori, V., Bornstein, S. R., Krug, A. W., & Ehrhart-Bornstein, M. (2010): *Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex. Horm Metab Res.* 42(2):88-92.

Eskerrak eta oharrak:

Eskerrak Medikuntza Fakultateko Euskal Hizkuntza eta Komunikazioa Saileko Itziar San Martin lankideari . Ikerketa honek honako diru-laguntzak izan ditu: Eusko Jaurlaritzaren BCG IT764-13; Euskal Herriko Unibertsitatea UPV/EHU UFI111/41; Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioa (MINECO) BFU2012-33334 eta Droga-menpekotasun Arazoen Sarea (RTA)-Carlos III. Osasun-Institutua RD12/0028/0004.