



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

OSASUN ZIENTZIAK

**Hipokanpoko CB₁ hartzailean
funtzionamendua, berdina ar eta
emeen artean?**

*Lucia Sangroniz Beltran,
Aitor Aranguren Alberdi,
Pablo Reyes, Nicolas Landgraf,
Itziar Bonilla Del Rio,
Almudena Ramos,
Pedro Grandes Moreno,
Jon Egaña Huguet
eta Edgar Soria Gomez*

99-106 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.04.12>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Hipokanpoko CB₁ hartzailearen funtzionamendua, berdina ar eta emeen artean?

Lucia Sangroniz-Beltran^{1,2}, Aitor Aranguren-Alberdi¹, Pablo Reyes^{1,2}, Nicolas Landgraf^{1,2},
Itziar Bonilla-Del Rio^{1,2}, Almudena Ramos^{1,2}, Pedro Grandes^{1,2}, Jon Egaña-Huguet^{1,2},
Edgar Soria-Gómez^{1,2,3}

¹Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, ²Achucarro
Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia,
³IKERBASQUE, Basque Foundation for Science,

jon.egana@ehu.eus

Laburpena

Hipokanpoko zirkuitoak berebiziko garrantzia dute hainbat prozesu kognitiboetan, hala nola nabigazioan edota memorian. Honez gain, prozesu hauetan zelula-mota askok (CB₁ hartzaileak mintzean adierazten dutenak) modu desberdinean parte hartzen dute. Lan honetan, hipokanpoko zirkuitu horietan parte hartzen duten neuronetako CB₁ hartzaileen zeregin espezifiko eta sexuaren araberako funtzioa ezberdindu nahi ditugu. Honetarako CB₁-flox sagu ar eta emeetan hipokanpoarekin erlazionaturiko portaera frogak egin dira. Saguetan CRE bidezko CB₁ hartzailearen ezabapena eragin zen hipokanpoko neuronetan zuzenean bektore biralak (AAV-Cre) injektatuz.

Hitz gakoak: Hipokanpoa; CB₁ hartzailea, memoria, nabigazioa, sexu ezberdintasunak

Abstract

Hippocampal circuits play a crucial role in cognitive processes such as navigation or memory. Moreover, many cell types (expressing CB₁ receptors on their membranes) participate on a different way to develop such processes. In this work, we want to dissect the specific and sex-dependent role of CB₁ receptors in neurons that participate on those hippocampal circuits. We used hippocampus-related behavioral test in CB₁-flox male and female mice. These mice carried a specific CRE-mediated CB₁ deletion on hippocampal neurons, by direct viral vector (AAV-Cre) administration.

Keywords: hippocampus, CB₁ receptors, memory, navigation, sex differences

1. SARRERA ETA MOTIBAZIOA

Cannabis sativa landarearen konposatu psikoaktiboa den Delta-9-tetrahidrocannabinolaren (THC) itu nagusia endokannabinoidesistema (ECS) da (Busquets-García eta lankideak., 2015). ECSa neuromodulazio sistema bat da, zeinak nerbio-sistema zentralaren garapenean, plastikotasun sinaptikoan eta kanpo-nahiz barne-inguruneko estimuluen erantzunean parte hartzen duen (Lu eta Mackie, 2016). Funtzionalki adierazi diren bi hartzaile kannabinoide dira nagusienak: CB₁R eta CB₂R. Hartzaile horiek aktibatzeak hainbat ondorio eragiten ditu fisiologia zelularrean, besteak beste, funtzio sinaptikoaren modulazioan, geneen transkripzioan eta zelulen mugigarritasunean (Howlet eta lankideak, 2002; Lu eta Mackie, 2016). Honez gain, sistemak erabiltzen dituen agonista endogenoak, hots, endokannabinoides (eCB) ere identifikatu dira, N-arakidonoleitolamina, anandamida edo AEA bezala ezagunagoa (Devane eta lankideak, 1992) eta 2- arakidonoleitilglicerola edo 2-AG (Sugiura eta lankideak, 1995).

eCBen sintesia alde postsinaptikoan gertatzen dela kontutan hartuta (Pertwee eta lankideak, 2010), eCBek bideratzen duten seinaleztapena atzerakaria dela iradoki zen. CB₁Rren aktibazioak neurotransmisoreak bukaera sinaptikoetatik askatzea eragozten du, bai GABA, bai glutamatoa, baita edozein neurotransmisore

mota ere. Horrek, CB₁Rri neurotransmisioa erregulatzeko gaitasuna ematen dio (Gerdeman eta lankideak, 2001). Mekanismo hori gehiegizko kitzikapenaren aurkako jarduera neurobabesle gisa proposatu da, nerbio sistema zentralerako (NSZ) neuronek bideratutako hainbat prozesutan eta asalduretan esku hartzen duelarik, hala nola, gosea, ikaskuntza eta oroimena, antsietatea, nabigazioa, neuroendekapena, epilepsia edo adikzioa (Kano eta lankideak, 2009; Di Marzo eta lankideak, 2015). Neuronez gain, eta neurri txikiagoan bada ere, CB₁R glia zeluletan ere adierazten da, adibidez, astrozitoetan, oligodendrozitoetan edota mikroglian, non transmisio sinaptikoan eragiteko gai dela frogatu den (Navarrete eta Araque, 2010; Castillo eta lankideak, 2012). CB₁Rren beste azpipopulazioetako bat mitokondriak bezalako organuluetan kokatuta dago (Benard eta lankideak, 2012).

Garunean, CB₁Rren adierazpen-maila altuenetakoa duen egituretako bat hipokanpoa da, non neuronez gain (Hu eta Mackie, 2015), prozesu astrozitikoetan (Gutiérrez-Rodríguez eta lankideak, 2018) eta mintz mitokondrialetan espresatzen dela frogatu den, hauen funtzioetan eraginez (Hebert-Chatelain eta lankideak, 2014a, b). Esan bezala, eCBek plastikotasun sinaptikoa erregulatu dute CB₁ hartzailak aktibatuz (Castillo eta lankideak, 2012). Hau, garunean gertatzen den funtsezko prozesu bat da, zirkuitu neuronalek esperientzia berrietara egokitzeko eta horietatik ikasteko duten gaitasunean oinarritzen dena. Enbrioi-fasetik helduarora, ingurumen-estimuluek aldaketak eragiten dituzte funtzio sinaptikoan, eta banakako esperientziak ezinbestekoak dira oroitzapen berriak eratzeko edo egokitze hobea ekarriko duten jokabide berriak sortzeko. ECS transmisio sinaptikoaren funtsezko modulatuzailea dela erakutsi da, eta, beraz, plastikotasun sinaptikoan duen parte-hartzea ukalezina da. (Chevalyere eta Castillo, 2004).

Plastikotasun honi esker oroitzapenak sortzen dira (Martin eta lankideak, 2002) eta hipokanpoak oroitzapen mota ezberdinen sorkuntzan parte hartzen du. Hauen artean, adibidez, oroimen ez-espaziala den ezagutza-oroimena eratzearen erantzulea da (Burgess, 2002). Oroitzapen hau karraskariek objektu berriak ezagun dituztenak baino gehiago esploratzeko duten joeran oinarritzen da (Denniger eta lankideak, 2018). Hipokanpoak sortutako beste oroitzapen mota bat oroimen-espaziala da, hau objektuak, lekuak edota espezie bereko kideak ingurune ezagun edo ezezagun batean kokatzeko gaitasuna da (Rahman eta lankideak, 2017). Esplorazio-portaera eraginkorrak sustatzeko, saguek nabigazio-estrategia espazialak hautatzen dituzte, erreferentzia-puntuetan edo mapa kognitiboetan oinarrituta (Laricchiuta eta lankideak, 2020).

2. ARLOKO EGOERA ETA IKERKETAREN HELBURUAK

Aurretik aipatu bezala, CB₁R hipokanpoan aurki daiteke, zelula mota eta zelula barneko konpartimendu ezberdinetan (neuronetan, glia zeluletan edota mitokondrietan). Gainera, neuromodulazio sistema nagusietako bat izanik prozesu ezberdinetan hartzen du parte, hauen artean, hipokanpoak bideratzen dituen oroimen eta nabigazio prozesuen erantzuleetako bat da.

Orain arte eginiko ikerketetan, ECSaren partaidetza deskribatu bada ere hipokanpoko prozesu hauetan, hau era orokor baten egin da, hots, ez da ezberdindu CB₁ hartzailak duen zeregin zehatzean zelula mota ezberdinetan eta hauek efektu global horretan duten partaidetzan.

Ikerketa honetan, hipokanpoko neuronetan kokaturiko CB₁ hartzailen funtzioa gainerako zelula eta kokapenetan aurki daitekeen hartzailaren funtzioetatik ezberdindu nahi dugu. Honez gain, hartzaille hauek ar eta emeetan funtzio desberdina duten edo ez argitzea dugu helburu, izan ere, ordura arte eginiko ikerketak arretan ECSak duen funtzioan enfokatu dira.

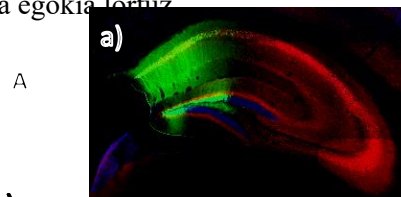
3. IKERKETAREN MUINA

Saguak:

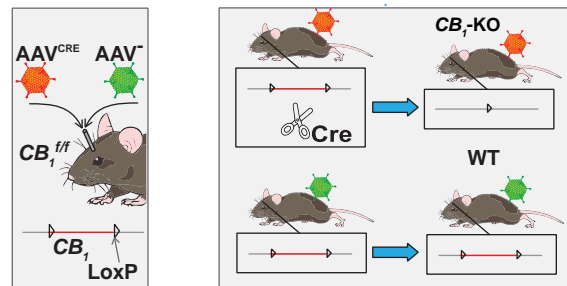
Ikerketa honetan erabilitako saguak mutanteak dira. Hain zuzen ere, CB₁-flox saguaren eredu erabili zen. Honetan CB₁ hartzailaren proteina ekoizteaz arduratzen den genearen bi aldeetan proteina bat (loxP) atxikiturik daramate saguek. Proteina loxP horiek, CRE entzimarekin erreakzionatzean, haien artean kokatzen den genea ebakitzea lortzen dute, kasu honetan CB₁ hartzaila, eta hau sortzeko ezintasuna ematen da, hots, *de novo* sintesia oztopatzen da. Hau lortzeko ikerketarako interesgarria den burmuineko eremua aukeratu ondoren, honetan CRE entzima hori atxikiturik daraman birus bat injektatzen da zuzenean kirurgia estereotaxikoaren bitartez.

Hasteko, kirurgien aurretik, saguak banan-banan kokatzen dira karioletan, eta tenperatura kontrolatzen duen armairu batean gordetzen dira esperimenduak irauten duen bitartean. Ura eta janaria nahi beste eskura dezakete esperimenduan zehar eta 12h/12h-ko argi/iluntasun ziklo bat ezartzen zaie, goizeko 8:00etatik arratsaldeko 20:00etara argia izanik. Ikerketa honetan sagu arrak eta sagu emeak erabili dira. Birusa administratzeko kirurgia burutzeko, lehenik sagua anesthesiatu zen. Jarraian, erreflexurik ez duela egiaztatu ondoren, ilea moztu eta marko estereotaxikoan kokatu zen. Ondoren, buruko azala ireki eta taladro baten laguntzaz zulo bi egin ziren atlas estereotaxikoaren bidez lortutako koordinatuetan Bregma erreferentziatuz hartuta (garezurraren jostura guneen gurutzeta). Hauek, saguen hipokanpo eremuaren gain egin ziren, bertan birusa askatzeko eta CB₁ hartzailearen sintesia neuronetan oztopatzeko. Horrela, nanoinjektore bat erabili zen (NANOJECT III; Drummond Scientific) tratamendua administratzeko, hau da, CRE entzima atxikiturik duen birusa (HC-CB₁-KO) edota kontrol birusa (HC-CB₁-WT), CRE entzima gabekoa, hipokanpoan txertatzeko (1. Irudia). Birusa bilateralki txertatu ondoren (250 ul alde bakoitzean), saguaren azala josi eta karioletan sartu zen berriro eta 5 astez berreskuratzen utzi zen, birusaren errekonbinazio-maila egokia lortuz.

1. irudia: a) Saguen hipokanpoan birusaren adierazpena kolore berdez. b) Bi birus moten funtzionamenduaren azalpen eskematikoa, kontrola berdea eta CRE entzima daramana gorria litzatezke.



b)



Portaera probak:

Portaera probak 13-14 asteko sagu ar eta emeetan egin ziren, baldintza bakoitzeko 6 animali erabiliz. Proba hasi baino 30 minutu lehenago, tenperatura eta aire jario kontrolatua zuen gela batean eduki ziren animaliak, girora egokitzeko. Proba guztiak baldintza berberetan egin ziren; gela berean, betiere argi fasean eta denbora-tarte berean (9:00-15:00).

Animaliek jasandako tratamenduekiko, hau da, birus motarekiko,itsu ziren bi ikerlariak proba guztiak gainbegiratu zituzten. Horrez gain, emaitzen interpretazioa ahalik eta zorrotzena burutzeko asmoz, Barnes-en labirintoan lortutako emaitzen analisisia ANYMAZE software-ren bitartez burutu zen. Esperimendu guztiak kamera digital batekin grabatu ziren (ARDUCam iDS). Usaimen seinaleak saihesteko, labirintoak eta objektuak EtOH % 70ekin garbitu ziren, azkenik urarekin garbituz proba bakoitzari hasiera eman aurretik. Saguen arteko aldean esangura estatistikoa bi bideko ANOVA proben bidez edo Student T proba parametrikoko eta ez-parametrikoko bitartez aztertu zen. Emaitzak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazi ziren software estatistikoko pakete bat erabiliz (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, AEB). $p < 0.05$ balioak estatistikoki esanguratsutzat jo ziren.

Objektu berrien ezagutza proba (NOR testa):

Proba hau hipokanpo funtzioaren araberakoa den oroimen ez-espazialaren ebaluaketa egiteko erabili zen. Azterketa, plexiglasez eginiko L formako labirinto zuri batean egin zen, 90°-ko angeluan kokatutako bi korridorerekin (30 cm eta 35 cm luze, 4.5 cm zabal eta 15 cm garai), eta argi intentsitate ahul baten azpian (50 Lux). Hiru proba egin ziren jarraian (9 minutu bakoitza) 3 egunetan zehar. Lehena, ohitzeko eguna izan zen; non saguak bi besoen elkargunean jarri ziren, eta besoak libreki esploratzen utzi zitzairen. Bigarren egunean, bi objektu berdin jarri ziren beso bakoitzaren amaieran eta saguei objektuak esploratzen utzi zitzairen. Azken egunean, hasierako objektuetako bat objektu berri batek ordezkatu zuen. Objektu hori ezberdina zen forma, kolore eta testuran, eta ordezkatuaren posizio berdinean jarri zen; objektu ezagunak aldaketarik gabe iraun zuen. Objektu berriaren kokapena eta objektu berri eta ezagunen pareak ausaz ezarri ziren (2.irudia).

2. irudia: NOR test-an egun bakoitzean saguak bete behar duen prozeduraren eskema.

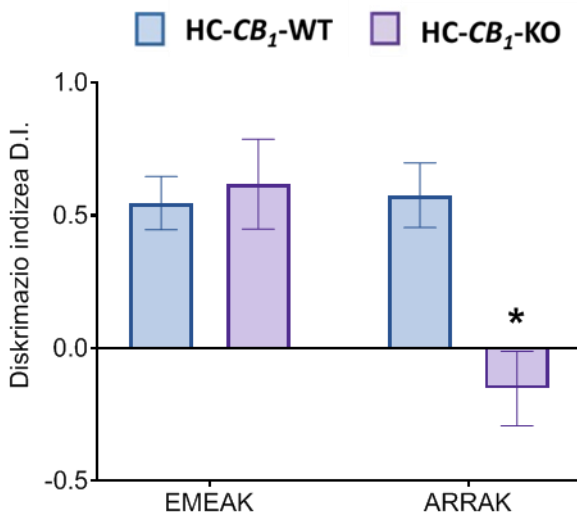


Tratamenduekiko itsu zen ikertzaile batek gutxienez, sagu bakoitzak esploratutako denbora neurtu zuen grabatutako bideoetan. Saguak sudurrarekin objektua 1 cm baino gutxiagora begira igarotzen zuen denbora jo zen miaketa positibotzat; ez zen positibotzat hartu objektu gainera igotzea edo hau murtzikatzea edota ikutzea.

Oroimen errendimendua ebaluatzeko, diskriminazio-indizea honela kalkulatu zen: objektu berria (TN) esploratzen emandako denboraren eta objektu ezaguna (TF) esploratzen emandako denborekin arteko aldea zati miaketan emandako denbora osoa (TN+TF) (Puighermanal eta lankideak, 2009).

$$\text{Diskriminazio-indizea} = (\text{TN}-\text{TF})/(\text{TN}+\text{TF})$$

Horrela, objektu berriak ezagutzeko proban ar eta emeen arteko ezberdintasunak aurkitu ziren hipokanpoko CB_1 hartzailea neuronetatik ezabatu ondoren. Emeen kasuan ez zen aldaketa nabarmenik aurkitu, kontrol birusa jaso zuten emeetan diskriminazio indizea 0.54 ± 0.1 zen bitartean, CRE entzimadun birusa jaso zuten horietan 0.61 ± 0.16 izan zen ($p = 0.720$). Aldiz, arretan aldaketa esanguratsua aurkitu ziren bi tratamenduen artean. Kontrol birusa jaso zuten horietan diskriminazio indizea 0.55 ± 0.09 izan zen eta CRE entzima jaso zuten horienak -0.15 ± 0.14 (* $p = 0.011$) (3.irudia).



3.irudia: NOR testan: Sagu eme eta arren diskriminazio indizeak birusa jaso ondoren, bai kontrol zein CRE birusak. Esangura estatistikoa Student T proba parametrikoren bitartez aztertu zen.. * $p < 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

Barnes-en labirintoa: oroimen- eta estrategia-espazialen testa (BM):

Ingurune lehorrean eginiko portaera-proba bat da, saguen oroimen espaziala aztertzeko (Bach eta lankideak, 1995). Oroimen-mota hori hipokanpoaren araberakoa da, eta saguek inguruko espazioan kokaturiko ikusmen-seinaleen eta ihes-

kaxa finko baten arteko erlazioa ikasten dute. Rueda-Orozco eta lankideak (2008) deskribatutako BMrako egokitutako protokolo bat erabili dugu. Hala, plataforma zirkular garai bat erabili zen, perimetroaren inguruan 20 zulo dituen. Ihes-kaxa zulo baten azpian finkatu zen, gainerako 19 zuloak hutsik utzi zirelarik. Argi distiratsua eta espazio ireki garaiak saguentzat desatseginak direnez, labirintoaren altueraren diseinua eta goiko argiztapen-iturria izan ziren ihesa eragiteko faktore motibatzaileak. Ihes-kutxa eta gelan sakabanatutako ikusmen-pistak leku finko batean mantendu ziren probek iraun zuten bitartean, egunean lau proba egin ziren bost egunez sagu bakoitzarekin. Saguek hiru bilaketa-estrategia sekuentzia ezberdin erabili ohi dituzte ihes-kaxaren kokapena aurkitzeko (ausazkoa, seriala eta espaziala) (4.irudia).

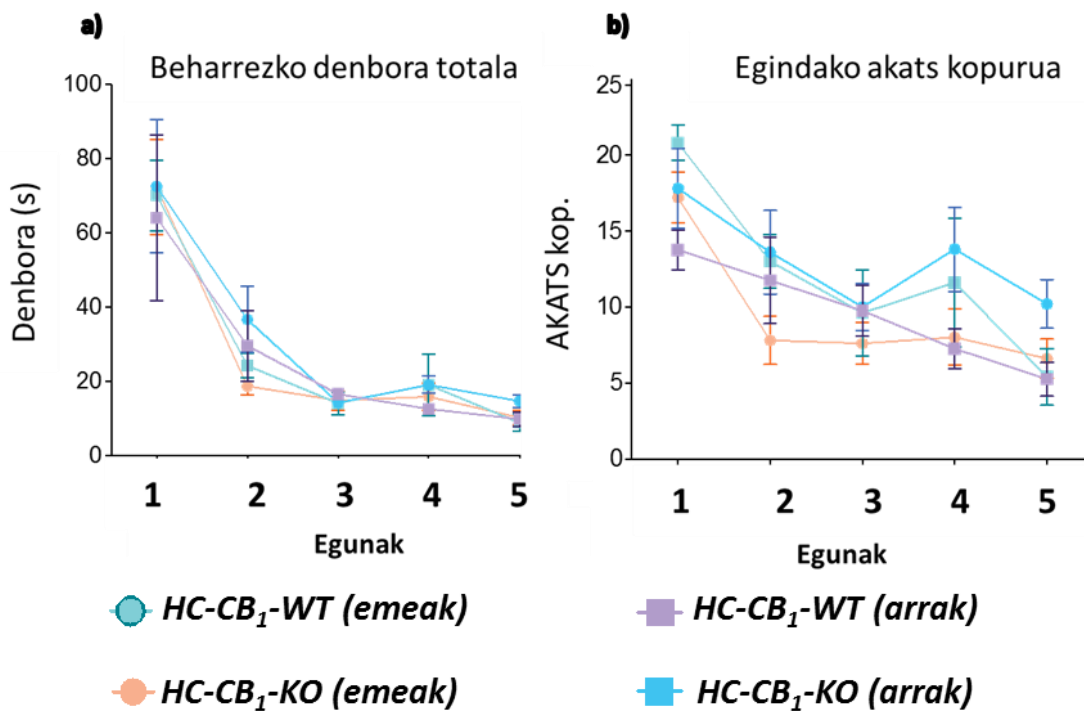
4. irudia: Barnes-en labirintoan saguek ihes-kaxa aurkitzeko erabili ditzaketen estrategien azalpen eskematikoa.



Eguneroko saiakuntzetan, tratamenduarekiko itsuak ziren bi ikertzailek, saguek erakutsitako estrategiak puntuatu zituzten, eta zeregin bakoitza osatzeko erabilitako denbora neurtu ere. Honez gain, saguek egineko akatsak, hots, zulo desegokiaren miaketak, ere zenbatu ziren. Lehenik, saguek ihes-kutxan jarri ziren minutu batez, gero labirintoaren erdian jarri ziren eta libreki arakatzeko utzi zitzairen 4 minutuz, ihes-kaxa aurkitu arte. Emaitzak honela puntuatu ziren: 1) estragaririk gabe: non ihes-kaxa ez zen aurkitu esplorazio-aldian; 2) ausazko estrategia: ihes-kaxa ausazko bilaketa baten ondoren aurkitu zen hainbat zuloen miaketa eta gero; 3) estrategia seriala: ihes-kaxa, atzera itzuli gabeko eta segidan kokaturiko zuloak esploratu ondoren aurkitu zen; estrategia espaziala: saguek, labirintoaren erditik, gelan sakabanaturiko ikusmen-pistak baliatuz ihes-kaxa aurkitzen duenean.

Portaera proba honetan lortutako emaitzei dagokienez, aipatzekoa da ezberdintasun esanguratsurik ez dela aurkitu hipokanpoko CB₁ hartzailea ezabatu ondoren saguek ihes-kaxa aurkitzeko erabilitako guztizko denboran ez emetan ($p = 0.487$) edo arretan ($p = 0.059$) (5a.irudia); edota hauek egunean egindako akats kopuruan ez emetan ($p = 0.357$) edota ezta ere arretan ($p = 0.064$) (5b.irudia).

5. irudia: Barnes-en labirintoan: a) Saguek egunean behar izan duten denbora totala (segundotan) saiakera guztiak burutzeko, b) Saguek ihes-kaxa bilatzerakoan izan dituzten akatsen kopurua, bai kontrol zen CRE birusa jaso duten ar eta emetan. Esangura estatistikoa bi bideko ANOVA proben bidez aztertu zen. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.



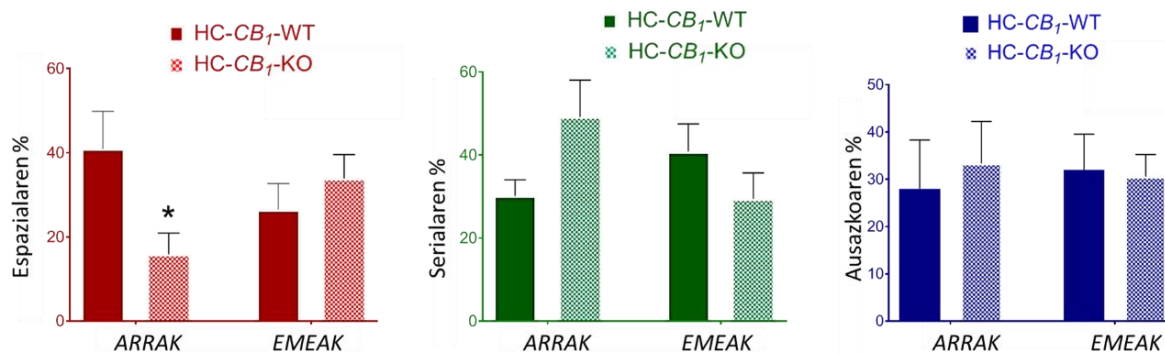
Horrela emeen kasuan, kontrol birusa jaso zuten horiek batz bestea, egun guztiak kontutan hartuta, 33.74 ± 13.45 segundo behar izan zituzten bitartean, CRE birusa jaso zutenek, 31.04 ± 13.74 segundo behar izan zituzten batz bestea ihes-kaxa aurkitzeko. Arrei dagokionez, kontrol birusa jaso zutenek, egun guztiak

kontutan izanda, batuz beste 26.82 ± 8.42 segundo erabili zituzten ihes-kaxa aurkitzeko. CRE birusa jaso zuten arrek berriz, 34.18 ± 9.54 segundo erabili zituzten batuz beste ihes-kaxa aurkitzeko (5a. irudia).

Egunean eginiko akats kopuruari dagokionez, emeen kasuan, kontrol birusa jaso zutenek batuz beste, egun guztiak kontutan izanda, 12.03 ± 2.87 akats egin zituzten ihes-kaxa aurkitu aurretik. CRE birusa jaso zuten emeei dagokionez, 9.54 ± 2.03 akats egin zituzten zuzen aurkitu aurretik. Arrei dagokionez, kontrol birusa jaso zuten horiek, egun guztiak kontutan hartuta 9.93 ± 2.06 akats egin zituzten. CRE birusa jaso zuten arrek berriz, 12.5 ± 1.36 akats egin zituzten (5b. irudia).

Beste alde batetik erabilitako estrategia motetan bai aldaketak eman zirela CB_1 hartzailera ezabatu ondoren (6 irudia). Kontrol arrek estrategia espaziala (gorria) % 41 ± 8.85 erabili zuten eta CRE birusa jaso zuten sagu arrek aldiz % 15.83 ± 5.06 ($p = 0.033$; *). Emeei dagokionez, kontrol emeek % 26.5 ± 6.2 erabili zuten estrategia espaziala eta hartzailerearen ezabapena daramaten emeek berriz % 33.89 ± 5.68 ($p = 0.400$). Estrategia serial eta ausazkoari dagokionez, ez zen aldaketa esanguratsurik aurkitu ar eta emeetan CB_1 hartzailerearen ezabapena egin ondoren. Serialari dagokionez, kontrol arretan % 30.17 ± 3.87 izan zen eta hartzailerik gabeko horietan berriz % 49.17 ± 8.89 ($p = 0.078$). Emeei dagokionez, kontroletan estrategia serialaren erabilpena % 40.83 ± 6.67 suposatu zuen bitartean, hartzailera ezabatutako horietan % 29.44 ± 6.26 ($p = 0.241$). Azkenik, ausazko miaketari dagokionez, kontrol arretan honen erabilera % 28 ± 10.31 izan zen bitartean, CRE entzima zuten horietan % 33.33 ± 8.91 izan zen ($p = 0.703$). Emetan berriz, ausazko strategiak kontroletan % 32 ± 7.55 izan zen eta CRE entzima zuten horietan % 30.56 ± 4.68 izan zen ($p = 0.874$) (6.irudia).

6. irudia: Barnes-en labirintoan estrategia ezberdinek (espaziala gorritz, seriala berdez eta ausazkoa urdinez) izan duten erabileraren portzentaiak, probak iraun duen egun guztietan zehar, bai kontrol zein CRE birusa jaso duten ar eta emeetan. Esangura estatistikoa Student T proba parametrikoko eta ez-parametrikoko bitartez aztertu ziren. * $p < 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.



4. ONDORIOAK

Lan honetatik eratorri daitekeen ondorio nagusia hipokanpoko neuronetan kokaturiko CB_1 hartzailera, azterturiko ezagutza-oroimenen eta nabigazio prozesuetan duen partaidetza ezberdina dela ar eta emeen artean. Izan ere, honen ezabapenak, ondorio ezberdinak izan ditu bi sexuen artean.

Alde batetik, objektuen ezagutza proban, arretan hipokanpoko CB_1 hartzailera ezabatu ondoren, ezagutza-oroimena aztertzeko erabili den diskriminazio indizea guztiz kaltetuta dagoela ikusi da. Izan ere, sagu arrek ez zuten objektu familiarra ezagutu eta hau berria bezain beste esploratu zuten. Emeen kasuan, hartzailerearen ezabapena jasan ondoren hipokanpoko neuronetan, ez zen diskriminazio indizean aldaketarik eman, objektu familiarra ezagutu eta berria gehiago esploratu zutelarik.

Bestalde, Barnes-en labirintoaren bidez azterturiko oroimen espazialean ez zen aldaketarik somatu ar zein emeetan hipokanpoko neuronetan CB_1 hartzailera ezabatu ondoren, izan ere, hauek egunean erabilitako batuz besteko denboran edota eginiko akats kopuruan ez da aldaketa esanguratsurik aurkitu. Hala ere, nabigazio prozesuetan ezberdintasunak aurkitu dira bi sexuen artean, saguek erabilitako nabigazio-estrategien

erabilera aldatu egin delako arretan baina ez emeetan, hartzaiarearen ezabapenaren ondorioz. Horrela ar arruntetan (HC-CB₁-WT) nagusia den nabigazio espazialaren erabilera (% 41) nabarmen jaitsi egin da CB₁ hartzaiela ezabatutako saguetan (% 15). Aldiz, emeetan nagusia den estrategia seriala ez da esanguratsu jaitsi ezabatutako saguetan (% 29) kontrolekin alderatu ondoren (% 41).

Bukatzeko, ikerketa honetan aurkitu diren sexu-ezberdintasunen zergatia azaltzeko, lehenik eta behin, azpimarratzekoa da CB₁ hartzaielen kontzentrazioa handiagoa dela arretan (Laurikainen eta lankideak, 2019). Honekin batera, jakinda mekanismo neuronalek eta hormonalek batera egiten dutela lan oroitzapenak sortzeko, eta karraskari emeetan endokannabinoiden sintesia ziklo-hormonalaren menpe dagoela (Borsoi eta lankideak, 2019), CB₁ hartzaiarearen adierazpenean dauden sexu-araberako ezberdintasun hauek oroitzapenen sorkuntzan dauden ezberdintasunen oinarria izan daitezkeela uste da (Laurikainen eta lankideak, 2019). Hala ere, ECSren rola oroitzapenen sorkuntzan guztiz argi ez dagoenez, egindako esperimientuek CB₁ hartzaiarearen banaketa dimorfikoaren inguruan ikuspegi zehatzagoa eman diezagukete.

5. ETORKIZUNERAKO NORABIDEA

Etorkizunera begira eta hipokanpoan CB₁ hartzaiarearen adierazpena beste zelula mota batzuetan ere ematen dela kontutan izanda bi norabide nagusi planteatu dira ikerketa honetan. Batetik, neuronon izaera ezberdina izan daitekeela kontuan izanda, kitzikatzaiela edo inhibitzaileen artean ezberdintzea dugu helburu, oraindik zehatzago determinatu ahal izateko ar eta emeetan neuronetan CB₁ hartzaiela hipokanpoko prozesu hauetan duen eragina.

Bestetik, gliako zeluletan, hain zuzen ere, astrozitoak deritzen glia zeluletan, non arestian aipatu bezala hartzaiarearen adierazpena eta honen funtzioak deskribatu diren eragitea dugu helburu. Horrela, ar eta emeetan honek hipokanpoko prozesu hauetan izan dezakeen partaidetza determinatu ahal izateko.

6. ERREFERENTZIAK

Bach M.E., Hawkins R.D., Osman M., Kandel E.R., Mayford M. (1995): Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal ltp in the range of the θ frequency. *Cell*. 81: 905-915.

Benard G., Massa F., Puente N., Lourenco J., Bellocchio L., Soria-Gómez E., Matias I., Delamarre A., Metna-Laurent M., Cannich A., Hebert-Chatelain E., Mülle C., Ortega-Gutiérrez S., Martín-Fontecha M., Klugmann M., Guggenhuber S., Lutz B., Gertsch J., Chaoulhoff F., López-Rodríguez M.L., Grandes P., Rossignol R., Marsicano G. (2012): Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.* 15: 558-564.

Borsoi M, Manduca A, Bara A, Lassalle O, Pelissier-Alicot AL, Manzoni OJ. Sex Differences in the Behavioral and Synaptic Consequences of a Single in vivo Exposure to the Synthetic Cannabinomimetic WIN55,212-2 at Puberty and Adulthood. *Front Behav Neurosci.* 2019 Mar 5;13:23

Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron.* 2002 Aug 15;35(4):625-41.

Busquets-Garcia, A., Desprez, T., Metna-Laurent, M., Bellocchio, L., Marsicano, G., & Soria Gomez, E. (2015). Dissecting the cannabinergic control of behavior: The where matters. *BioEssays*, 37 (11), 1215–1225.

Castillo P.E., Younts T.J., Chávez A.E., Hashimoto Y. (2012): Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron.* 76: 70-81.

Chevalyere V. and Castillo P.E. (2004): Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron.* 43: 871-881.

Denninger JK, Smith BM, Kirby ED. Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget. *J Vis Exp.* 2018 Nov 20;(141):10.3791/58593.

Devane W.A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etinger A., Mechoulam R. (1992): Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258: 1946-1949.

Di Marzo V., Stella N., Zimmer A. (2015): Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 16: 30-42.

Gerdeman G., Lovinger D.M. (2001): CB₁ cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J. Neurophysiol.* 85: 468-471.

Gutierrez-Rodriguez A., Bonilla-Del Rio I., Puente N., Gomez-Urquijo S.M., Fontaine C.J., Egana-Huguet J., Elezgarai I., Ruehle S., et al. (2018): Localization of the cannabinoid type-1 receptor in subcellular astrocyte compartments of mutant mouse hippocampus. *Glia.* 66 (7): 1417-1431.

Hebert-Chatelain E., Reguero L., Puente N., Lutz B., Chaouloff F., Rossignol R., Piazza P.V., Benard G., Grandes P., Marsicano G. (2014a): Cannabinoid control of brain bioenergetics: exploring the subcellular localization of the CB₁ receptor. *Mol. Metab.* 3: 495-504.

Howlett A.C., Barth F., Bonner T.I., Cabral G., Casellas P., Devane W.A., Felder C.C., Herkenham M., Mackie K., Martin B.R., et al. (2002). International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol. Rev.* 54. 161-202.

Hu S.S.J. and Mackie K. (2015): Distribution of the endocannabinoid system in the central nervous system. In: Pertwee R.G. editor. *Handbook of Experimental Pharmacology, Endocannabinoids.* Berlin: Springer. 59-93.

Kano M., Ohno-Shosaku T., Hashimoto-dani Y., Uchigashima M., Watanabe M. (2009): Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89: 309-380.

Laricchiuta D, Balsamo F, Fabrizio C, Panuccio A, Termine A, Petrosini L. CB₁ Activity Drives the Selection of Navigational Strategies: A Behavioral and c-Fos Immunoreactivity Study. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 6;21(3):1072.

Laurikainen H, Tuominen L, Tikka M, Merisaari H, Armio RL, Sormunen E, Borgan F, Veronese M, Howes O, Haaparanta-Solin M, Solin O, Hietala J; METSY group. Sex difference in brain CB1 receptor availability in man. *Neuroimage.* 2019 Jan 1;184:834-842.

Lu H.C. and Mackie K. (2016): An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry.* 79: 516-525.

Martin SJ, Morris RG. New life in an old idea: the synaptic plasticity and memory hypothesis revisited. *Hippocampus.* 2002;12(5):609-36.

Navarrete M. and Araque A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron.* 68: 113-126.

Pertwee R.G., Howlett A.C., Abood M.E., Alexander S.P., di Marzo V., Elphick M.R., Greasley P.J., Hansen H.S., Kunos G., Mackie K. et al. (2010): International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacol. Rev.* 62: 588-631.

Puighermanal E., Marsicano G., Busquets-Garcia A., Lutz B., Maldonado R., Ozaita A. (2009): Cannabinoid modulation of hippocampal long-term memory is mediated by mTOR signaling. *Nature Neuroscience.* 12: 1152-1158.

Rahman Q, Sharp J, McVeigh M, Ho ML. Sexual Orientation-Related Differences in Virtual Spatial Navigation and Spatial Search Strategies. *Arch Sex Behav.* 2017 Jul;46(5):1279-1294.

Rueda-Orozco P.E., Soria-Gomez E., Montes-Rodriguez C.J., Martínez-Vargas M., Galicia O., Navarro L., Prospero-García O. (2008): A potential function of endocannabinoids in the selection of a navigation strategy by rats. *Psychopharmacology.* 198: 565-576.

Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. (1995): 2-arachidonoylglycerol - A possible endogenous cannabinoid receptor-ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215: 89-97.