



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## VI. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2025eko maiatzaren 28, 29 eta 30a  
Bilbo, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 4.0

### OSASUN ZIENTZIAK

**Omega-3 gantz-azidoen eragin  
neurobabeslea nerabezaroan  
aldizkako gehiegizko alkohol-  
kontsumoaren ostean:  
eikosanoide-endokannabinoid  
seinaleztapen gurutzatuaren  
garrantzia**

*Garazi Ocerin,  
Imanol González-Burguera,  
Miquel Saumell-Esnaola,  
Maitane Serrano,  
Gontzal García Del Caño  
eta Pedro Grandes*

113-120 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.13>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



LAGUNTZAILEAK



## Omega-3 gantz-azidoen eragin neurobabeslea nerabezaroan aldizkako gehiegizko alkohol-kontsumoaren ostean: eikosanoide-endokannabinoiden seinaleztapen gurutzatuaren garrantzia

Garazi Ocerin<sup>1,2</sup>, Imanol González-Burguera<sup>3,4</sup>, Miquel Saumell-Esnaola<sup>3,4</sup>,  
Maitane Serrano<sup>1,2</sup>, Gontzal García Del Caño<sup>3,4</sup>, Pedro Grandes<sup>1,2</sup>

(1) Neurozientziak Saila. Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU, Leioa, Bizkaia),

(2) Achucarro Basque Center for Neuroscience, UPV/EHUko Zientzia Parkea (UPV/EHU, Leioa, Bizkaia), (3) Bioaraba, Neurofarmakologia Zelularra eta Molekularra,

(4) Neurozientziak Saila. Farmazia Fakultatea (UPV/EHU, Gasteiz, Araba)

garazi.ocerin@ehu.eus

### Laburpena

Nerabezaroa garapenaren aldi kritikoa da, eta garuna oso sentikorra da *botiloi* gisako neurritz kanpoko alkohol-kontsumoarekiko. Alkoholak eragindako kalte iraunkorretan, mikroglia erantzuna eta eikosanoide proinflamatorioen ekoizpena funtsezkoak dira, eta 2-arakidonilglizerol (2-AG) endokannabinoidak eikosanoide proinflamatorioen iturri gisa garrantzi handia izan dezake. Sagu-eredu batean, alkoholak mikroglia eragintzen eta eikosanoide sintesia parte hartzen duten monoazilglizerol lipasa (MAGL) eta ziklooxigenasa-2 (COX-2) entzimen espresioan duen eragina aztertu dugu, bai eta omega-3 gantz-azidoek aldaketa horiek arintzeko duten gaitasuna ere. Gure emaitzek omega-3 gantz-azidoek alkoholaren ondorio kaltegarriak murrizteko duten potentziala nabarmentzen dute.

Hitz gakoak: Nerabezaroa, Aldizkako alkohol-kontsumoa, Mikroglia, Neuroinflamazioa, Omega-3 gantz-azidoak, Endokannabinoidak.

### Abstract

*Adolescence is a critical period of development, and the brain is highly sensitive to excessive alcohol consumption, such as binge drinking. In alcohol-induced long-term damage, the microglial response and the production of proinflammatory eicosanoids play a key role, with 2-arachidonoylglycerol (2-AG) potentially serving as a major source of proinflammatory eicosanoids. In a mouse model, we examined the effects of alcohol consumption on microglial structure and the expression of monoacylglycerol lipase (MAGL) and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzymes involved in eicosanoid synthesis. We also evaluated the ability of omega-3 fatty acids to mitigate these changes. Our results highlight the potential of omega-3 fatty acids in reducing the harmful effects of alcohol consumption.*

**Keywords:** Adolescence, Binge drinking, Microglia, Neuroinflammation, Omega-3 fatty acids, Endocannabinoids.

### 1. Sarrera eta motibazioa

Alkohola gizartearen garapenaren bidelagun izan da, eta haren kontsumoaren ebidentziak K.a. 7000. urte inguruko giza-kokaguneetan aurkitu dira (McGovern et al., 2004). Antzinako zibilizazioetan, hartiduraren bidez sortutako edariak arrakasta handia izan dute, eta hori gaur egun ere mantendu da. Horrela, substantzia psikoaktiboen artean, munduan gehien kontsumitzen denetako bat bihurtu da, eta osasun publikoari kalterik handiena egiten dion substantzietako bat da (Most et al., 2014).

Mendebaldean, Euskal Autonomia Erkidegoa barne, asteburuetako alkohol-kontsumoa ohikoa da nerabe eta gazteen artean, batez ere 16 urtetik gorako gizonezkoetan eta botiloi (*binge drinking*) eran (Crews et al., 2016; Nwachukwu et al., 2022; Eusko Jaurlaritza, Osasun Saila, 2024). Alkohol-kontsumoak, oro har, eta bereziki *binge drinking* ereduak, kalte handia eragin dezake nerabezaroan, garuna heltze funtzional eta estruktural prozesuan baitago (Gogtay et al., 2004). Horrek epe luzerako asaldurak eragin ditzake burmuinean (Crews et al., 2016). Asaldura horiek arintzeko esku-hartze terapeutikoak bilatze asmoz, zenbait ikerketek sistema endokannabinoiden jarri dute arreta, sistema horrek duen funtzio homeostasikoa dela eta (Lu eta Mackie, 2021).

Seinaleztapen kannabinoiden, 2-arakidonilglizerolak (2-AG) berebiziko garrantzia du, CB<sub>1</sub> hartzaile kannabinoiden ligando endogeno ugariena baita eta, besteak beste, plastikotasun sinaptikoan, ikasketan eta portaeraren alderdi desberdinetan parte hartzen du. Gure ikerketa taldeak *binge drinking*

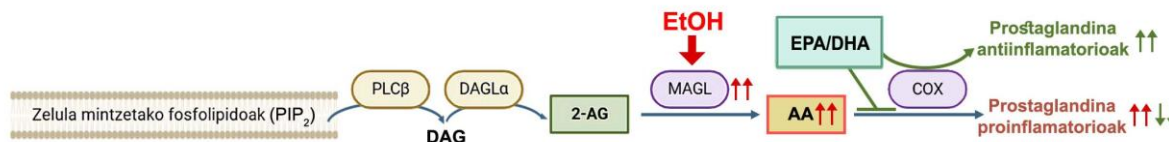
sagu-eredu batean egiaztatu zuen bezala, nerabezaroan aldizkako alkohol kontsumoak 2-AG eta CB<sub>1</sub> hartzailearen bitarteko seinaleztapena kaltetzen du epe luzera (Peñasco et al., 2020). Zehazki, ikerlan horretan, aldizkako alkohol-kontsumoak nerabezaroan epe luzerako plastikotasun sinaptikoaren galera hortz-bihurgunean eta kalte kognitiboak dakartzala erakutsi genuen.

Beraz, oro har, eta bereziki nerabezaroan, funtsezkoa da alkohol-kontsumoaren prebentzio politikak garatzea. Era berean, alkoholaren gehiegizko kontsumoak eragindako kalteak arintzeko estrategia terapeutiko eta bizi-kalitateari buruzko ikerketa prekliniko eta klinikoak ere, bereziki interesgarriak dira osasun publikoa eta gizartearen ongizatea bermatzeko.

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Seinaleztapen kannabinoidean, 2-AGk egundoko funtzioa du endokannabinoiden nagusi gisa. Izan ere, CB<sub>1</sub> hartzaile kannabinoidearen ligando endogeno ugariena da eta, gure ikerketa-taldeak *binge drinking* sagu-eredu batean egiaztatu zuen bezala, nerabezaroan aldizkako alkohol-kontsumoak epe luzera kaltetzen du 2-AG eta CB<sub>1</sub> hartzailearen bidezko seinaleztapena (Peñasco et al., 2020). Zehazki, nerabezaroan aldizkako alkohol-kontsumoak epe luzera plastikotasun sinaptikoa galtzea dakar saguaren hortz-bihurgunean, eta horrekin batera kalte kognitiboak geratzen dira. Interesgarri oso, 2-AGren degradazioaren produktu den azido arakidoniko (AA) metabolitoaren mailen igoera drastikoa aurkitu genuen alkohola kontsumitu zuten saguetan eta, horrekin batera, 2-AGren degradazioaz arduratzen den serina-hidrolasa nagusia (monoazilglizerol lipasa, MAGL), gora erregulatuta zegoen (1. Irudia). Bestalde, kontrolekin alderatuta 2-AG mailak iraunkor mantendu ziren alkohola kontsumitu zuten saguetan. Horrek, 2-AG sintesia arinduta zegoela iradokitzen du, Peñasco eta kolaboratzaileen ikerlanean aztertu ez bagenuen ere (1. Irudia).

**1. Irudia.** 2-AGren bide biosintesikoan, fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ) entzimak mintz-fosfolipido den fosfatidil inositol 4,5-bisfosfatoa (PIP<sub>2</sub>) diazilglizerol (DAG) bihurtzen du. Ondoren, diazilglizerol lipasa  $\alpha$  (DAGL $\alpha$ ) entzimaren jarduerak DAG hori 2-AG bihurtzen du. Monoazilglizerol lipasa (MAGL) entzimak, beriz, 2-AG degradatzen du azido arakidonikoa (AA) sortzeko. Alkohol (EtOH) kontsumoak MAGLren espresioa handitzen du, eta horrek AA maila igoarazten du; AA horrek ziklooxigenasa (COX) bidearen bidez, prostaglandina proinflamatorioen ekoizpena areagotzen du. Bestalde, omega-3 gantz-azido poliassegabeek (EPA eta DHA) prostaglandina antiinflamatorioen aitzindari gisa jarduten dute eta AAren gaineko COX aktibitatea inhibitzen dute, eta horrela erantzun inflamatorioa murriztu dezakete. Gezi gorriek eta berdeek alkohol kontsumoaren eta omega-3 gantz-azidoen eraginak adierazten dituzte, hurrenez hurren.



Edonola ere, gure datuek argi erakutsi zuten AAren mailen igoera zorrotza alkohol kontsumoaren ondorioz. AA prostaglandina proinflamatorioen aitzindaria denez (Nomura et al., 1979) *binge drinking*-ak garunean eragiten dituen kalteetan premiazko garrantzia izan zezakeela hipotetizatu dugu. Hipotesi horren alde, MAGLren inhibizioak alkohol kontsumoak eragindako kalteak lehengoratzeko zituela egiaztatu genuen (Peñasco et al., 2020). Era berean, ikerketek MAGL inhibitzaileen eraginkortasuna frogatu dute neuroinflamazio egoera desberdinetan (McAllister et al., 2018; Jiang et al., 2023). Eikosanoide-endokannabinoiden seinaleztapen gurutzatuaren testuinguruan (Dyall, 2017), dietan edo osagarri gisa emandako omega-3 serieko azido eikosapentaenoikoak (EPA) eta dokosahexaenoikoak (DHA) garun-kalteak moteldu lezakete, garuneko sistema kannabinoidea modu sakonean modulatzaren bidez. Horrela, omega-3 gantz-azidoek nerabezaroan botiloi motako alkohol-kontsumoak eragindako neuroinflamazioa eta epe luzerako ondorio kaltegarriak arindu ditzakete. Beste mekanismo batzuen artean, omega-3 gantz-azidoek eikosanoide antiinflamatorio eratorriak ematen dituzte (Farooqui et al., 2007). Gainera, EPAk eta DHak AArekin lehiatzen dute eikosanoideen sintesi bideetan, eta EPAren 22 karbonodun eratorriek AAren gaineko ziklooxigenasa (COX) aktibitatea inhibitzen dute (Norris et al., 2012), eta horrela, AAren eratorri proinflamatorioen ekoizpena gutxitzen dute (1. Irudia). Laburbilduz, alkohol kontsumoaren ondorio kaltegarriak moteltze aldera, oinarri sendoa dago omega-3 gantz azidoak alternatiba terapeutiko ez-farmakologiko gisa proposatzeko.

Alkohol-kontsumoak aldaketa sakonak eragiten ditu nerabeen garun-egituraren eta funtzioaren. Garapenaren aldi horretan, ikasketa eta oroimen prozesuetan funtsezko rola duen hipokanpoa funtzionalki kaltetzen da alkohol kontsumoaren ondorioz. Kalte horien bitartekari zelularren artean, mikroglia da protagonista, jaiotzetik erantzun neuroimmunean giltzarri gisa. Hala, estres iraunkorreko eta inflamazio sistemiko baldintzetan, mikrogliaaren moldatze gaitasuna galtzen da epe luzera, eta hori aldaketa morfologiko, biokimiko eta funtzionaletan islatzen da. Gehiegizko alkohol-kontsumoaren ondoriozko kalteen eragile nagusia neuroinflamazioa dela ondo ezarrita dagoenez (Knapp eta Crews,

1999), mikroglian eragin negatiboak izatea aurreikusten da. Beraz, funtsezkoa da *binge drinking* alkohol-kontsumo patroiak mikroglian duen eragina aztertzea, bai eta omega-3 gantz-azidoetan aberastutako dietek izan ditzaketen eragin terapeutikoak mikrogliaren egitura eta funtzioarekin duten lotura ere.

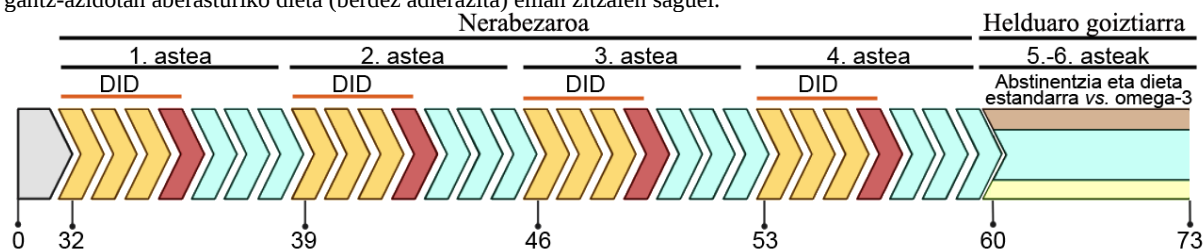
Neuroinflamazio egoeretan, ezaguna da mikroglia zelulak morfologikoki nabarmen aldatzen direla, eta moldatze estruktural hori egoera funtzionalarekin estu erlazionatuta dagoela (Govek et al., 2023). Zabal dokumentatu den bezala (Navascués J et al., 2000), ingurunearekiko zaintza aktibo funtzioa duen mikroglia oso moldagarria da, eraso akutu eta kronikoen aurrean. Gehiegizko alkohol-kontsumoa bezalako eraso neuroinflamatorio egoeretan, mikrogliaren erantzunetan eragin handia izan dezaketen aldaketa biokimikoak ere gertatzen dira. Eikosanoide-kannabinoide seinaleztapen gurutzatuan, MAGL eta COX-2 bitartekariak berebiziko garrantzia dute mikrogliaren inflamazio erantzunaren modulazioan, 2-AG endokannabinoidetik abiatutako prostaglandinen biosintesiararen erantzule moduan (Farooqui et al., 2007; 1. Irudia). Alkohol-kontsumoak entzima horien aktibitatea eta espresioa alda ditzake, eta horrek eragin sakonak ditu mikroglia zelulak inplikatzin dituzten erantzunetan (Knapp eta Crews, 1999; Owens et al., 2017). Izan ere, gure ikerketa-taldeak egiaztatu du nerabezaroan alkohola kontsumitu duten saguetan MAGLren espresioa nabarmen handitzen dela (Peñasco et al., 2020). Hala ere, aurreko ikerketa horretan MAGL sinaptosometan neurtu genuen, eta interesgarria litzateke haren espresioa beste konpartimentu batzuetan, bereziki mikroglian, ere gora erregulatuta dagoen aztertzea.

Aurrekari hauek guztiak kontuan hartuta, ikerketa honek bi helburu nagusi ditu. Lehenik, *binge drinking* motako alkohol-kontsumoak nerabezaroan hipokanpoko mikrogliaren morfologian dituen ondorioak aztertzea, bai eta omega-3 gantz-azidoek ondorio horiek moteltzeko duten gaitasuna ere. Bigarrenik, aldaketa morfologiko horiek endokannabinoid-eikosanoide bidearen aktibazioarekin erlazionatze aldera, hipokanpoko homogenatu osoetan MAGL eta COX-2 entzimen espresioa aztertu da, haien espresio konpartimentalizatua ikertu aurreko abiapuntu gisa.

### 3. Ikerketaren muina

Jaiotza osteko 3. astetik aurrera, C57BL/6J sagu arrak bikoteka eta ingurune kontrolatuan mantendu ziren (12 orduko argi-ilunpeko zikloan eta  $22 \pm 2$  °C-ko tenperaturan), elikagaia eta urarekin *ad libitum*. *Binge drinking* alkohol-kontsumo patroia simulatzeko, saguek *drinking-in-the-dark* (DID) protokoloa jarraitu zuten 4 astez, jaiotza osteko 32. eta 56. egunen bitartean (Rhodes et al., 2005). Aldi horretan, nerabezaro aldian, aste bakoitzaren lehenengo 3 egunetan, saguen erdiari %20ko etanola (EtOH) zuen ura eman zitzairen 2 orduz, EtOH gabeko ura edateko aukerarik gabe. Kontrol saguei prozedura bera aplikatu zitzairen, baina EtOH gabeko urarekin. Laugarren egunean, alkoholarekiko esposizioa 4 orduz luzatu zen. Astearen gainerako 3 egunetan, saguak abstinentsian egon ziren. DID ondoren, saguak abstinentsian mantendu ziren bi astez (jaiotza osteko 60. eta 73. egunen bitartean). Abstinentsia-aldi horretan, protokoloan ura hartu zuten animaliak bi azpitaldetan banatu ziren: H<sub>2</sub>O taldea, abstinentsia-aldian dieta estandarra jaso zuten saguak; eta H<sub>2</sub>O-n-3 taldea, abstinentsia-aldian omega-3 gantz-azidoetan aberastutako dieta (EPA %2,7 eta DHA %2,0) jaso zuten saguak. Era berean, DID protokoloan alkohola hartu zuten animaliak EtOH eta EtOH-n-3 taldeetan banatu ziren. Dieta-erregimen hori esperimendazio-fasearen amaierara arte mantendu zen, animaliak heldutasun goiztiarrerako trantsizioan zeudenean (2. Irudia).

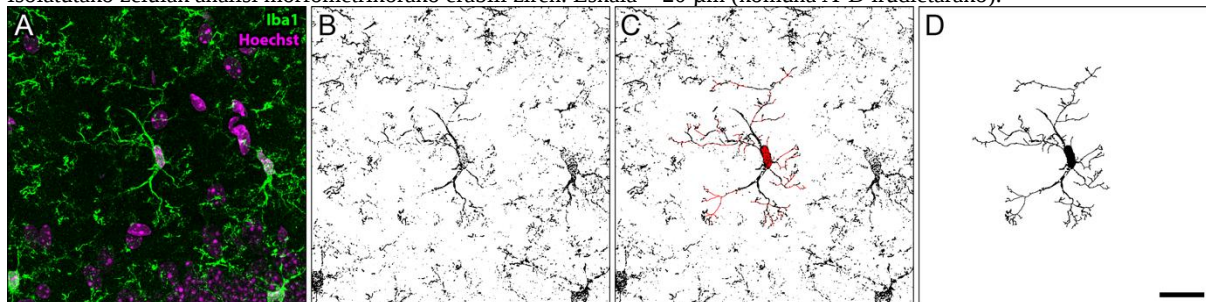
**2. Irudia.** Protokoloaren kronograma esperimental. Jaiotze osteko 32. eta 56.egunen bitartean, *binge drinking* DID protokoloa ezarri zen astean lau egunetan zehar; 2 orduz, lehenengo hiru egunetan (horiz adierazita) eta 4 orduz laugarrenean (gorriz adierazita). Jaio osteko 60. eta 73. egunen bitarteko abstinentsia-aldian, dieta estandarra (marroiz adierazita) edo omega-3 gantz-azidotan aberasturiko dieta (berdez adierazita) eman zitzairen saguei.



Immunohistokimika entseguetarako, saguak sakon anestesiatu (ketamina, 80 mg/kg gorputz-pisua; xilazina, 10 mg/kg gorputz-pisua) ondoren, %4 paraformaldehido, %2 azido pikriko eta %0,1 glutaraldehido zuen 0,1 M fosfato-tanpoiarekin (PB, pH 7,4) perfunditu ziren. Garunak garezurretik atera bezain laster, finkapen-soluzio berean mantendu ziren 4 orduz, eta ondoren, %30 sakarosa zuen

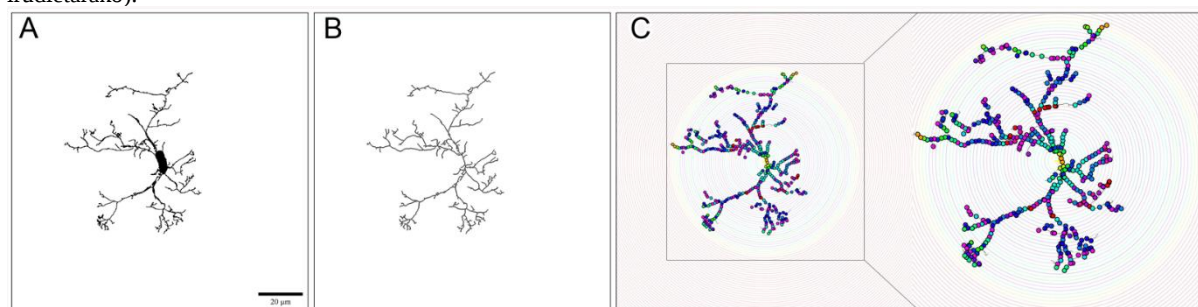
PB tanpoian gorde ziren, 4 °C-tan hondoratu arte. Jarraian, garunak izoztu eta 40 µm-ko ebaketak egin ziren, tenperatura-kontrolagailu bati konektatutako mikrotomoa erabiliz. Azkenik, ebaketak dimetilsulfoxidoaren (DMSO) kontzentrazio gorakorretan inkubatu ziren (%5, %10 eta %20 PB tanpoian) eta izozte-desiozte zikloen bidez iragazkortu ziren. Horrela tratatutako ebaketak -80 °C-tan gorde ziren, erabili arte.

**3. Irudia.** Mikrogliaen analisi morfometrikoa egiteko fluxu metodologikoa. **A.** Mikroglia zelulak Iba1-en aurkako immunofluoreszentzia bidez, Hoechst kromatina tindatzailearekin konbinaturik, markatu ziren saguen hipokanpoko ebaketetan. **B.** Intentsitate atari batetik beherako pixelak ezabatuz, Iba-1 markaketa zuten pixelak hondotik segmentatu ziren eta zuri-beltz irudi binarioak lortu ziren. **C.** Binarizatutako irudietan, zelula-luzakinen etenak zuzendu ziren eskuzko edizioz (gorriz). **D.** Isolatutako zelulak analisi morfometrikorako erabili ziren. Eskala = 20 µm (komuna A-D irudietarako).



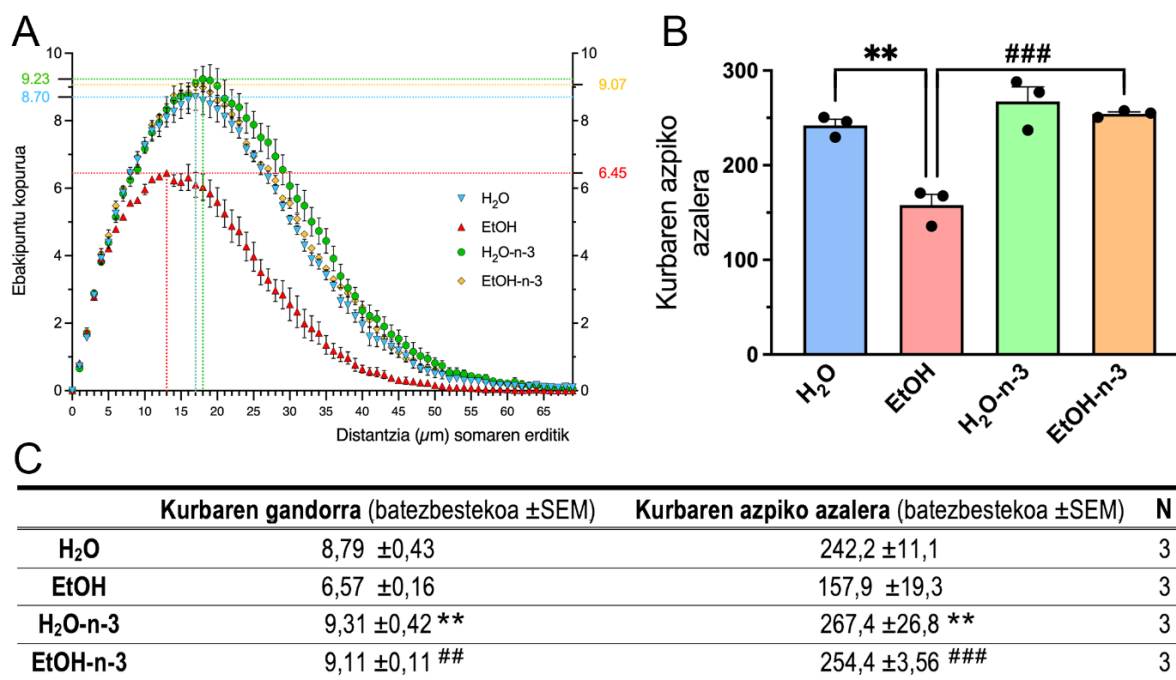
Azterketa histologikoak hipokanpo dortsaleko hortz-bihurgunean egin ziren, Bregma puntu kraniometrikoren atzetik 1,46 eta 2,80 mm bitartean egindako ebaketa koronaletan. Lau talde esperimentaletako laginetan, mikroglia zelulak immunofluoreszentziaz tindatu ziren flotazio askean, Iba1 aurkako ahuntz-antigorputz poliklonal bat erabiliz. Irudiak platina motordun bat duen Nikon Ti-U fluoreszentzia-mikroskopiaarekin lortu ziren, x20 objektiboa erabiliz. Fluoreszentzia-mikroskopia arruntaz Z-plano desberdinetan lortutako irudiak dekonboluzio algoritmo baten bidez prozesatu ziren ebaketa optikoak lortzeko. Ebaketa birtualen proiektzio maximoak digitalki prozesatu ziren *Fiji-ImageJ* softwarearekin, zelula isolatuen irudi binarioak lortzeko (3. Irudia).

**4. Irudia.** Mikrogliaen *Sholl* analisi morfometrikoa egiteko fluxu metodologikoa isolatutako zelula batetik abiatuta. **A.** Isolatutako mikroglia zelula. **B.** Eskeletonizatutako mikroglia zelula. Zelularen egitura dimentsio bakarreko eskeleto batean sinplifikatzen da. **C.** Eskeletonizatutako mikroglia zelula *Fiji-ImageJ*-ko *Neuroanatomy* gehigarria erabiliz aztertu zen *Sholl* analisia egiteko. Analisi horretan, somaren erdigunetik abiatuta, mikroglia zelularen luzakinek zirkulu kontzentrikoekin dituzten ebakipuntuak kuantifikatzen dira, 1 µm tarteko distantzia erradial desberdinetan. Eskala = 20 µm (komuna A-C irudietarako).



Isolatutako mikroglia zelula horietan, *Fiji-ImageJ*-ko *Neuroanatomy* gehigarria erabiliz, *Sholl* parametro morfometrikoa kalkulatu zen (Clarke et al., 2021) (4. Irudia). Analisi horrek, soma erdigunetik abiatuta, mikroglia zelulen luzakinek zirkulu kontzentrikoekin dituzten ebakipuntuak kuantifikatzen ditu, 1 µm tarteko distantzia erradial desberdinetan. Horrela, mikroglia zelulen morfologia xehetasunez aztertu zen lau talde esperimentaletan, adarren banaketa eta konplexutasuna neurtuz. Datuak *GraphPad Prism* softwarearen bidez analizatu ziren.

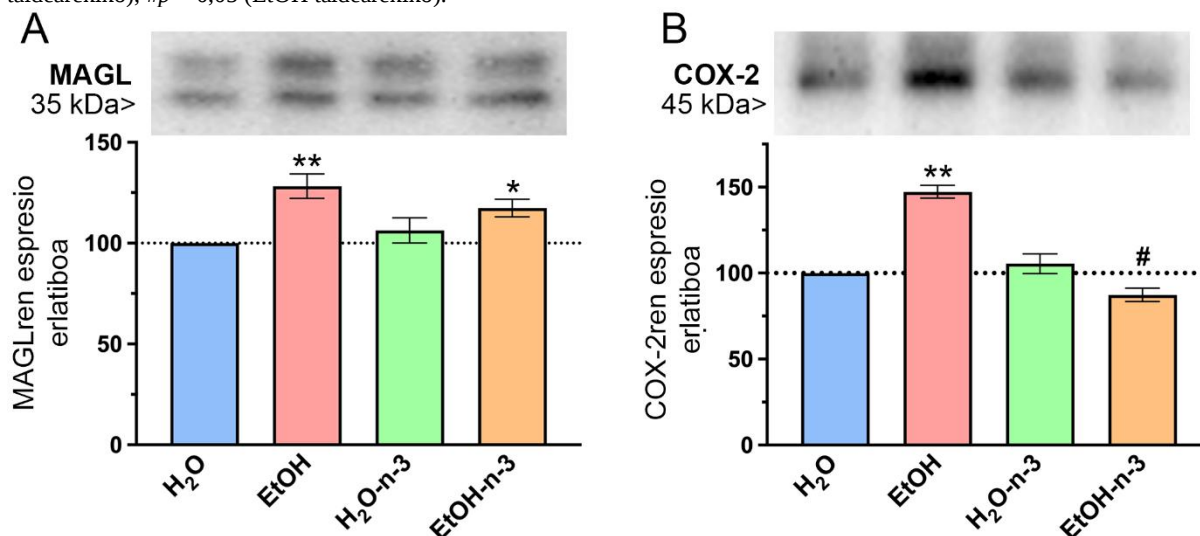
**5. Irudia.** Mikrogliaen azterketa morfometrikoa *Sholl* analisiaren bidez. Azterketan, hortz-bihurguneko mikroglia zelula guztiak hartu ziren barne, inolako hautaketa-mugarik gabe, eta guztira 317 eta 365 zelula bitartean analizatu ziren talde esperimental bakoitzean. **A.** Somaren erditik distantzia gorakorretan neurtutako ebakipuntu kopurua erakusten duen grafikoa. Lerro eten horizontalek ebakipuntu kopururik altuenak (kurbaren gandorrak) erakusten dituzte, eta batezbesteko balioak ezkerreko eta eskuineko Y ardatzen alboan adierazten dira. Lerro eten bertikalek gandorrak zelula-gorputzaren erditik zein distantziara aurkitu ziren erakusten dute. Datuak batezbestekoa ± batezbestekoaren errore estandarra (SEM) gisa adierazten dira. Puntu bakoitza hiru sagutik (n=3) lortutako batezbesteko ± SEM balioak dira. Baldintza esperimental guztietan, 74 eta 139 zelula bitartean analizatu ziren sagu bakoitzean. **B.** Kurbaren azpiko azalera (± SEM) erakusten duen barra-grafikoa. **C.** Kurbaren gandorra eta kurbaren azpiko azalaren analisitik lortutako emaitzak eta analisi estatistikoa (bide bakarreko ANOVA eta *post hoc* Tukey testa). \*\**p* < 0,005 (H<sub>2</sub>O vs EtOH); ###*p* < 0,005, ###*p* < 0,0005 (EtOH vs. EtOH-n-3).



Emaitzek argi erakutsi zutenenez, alkoholarekiko esposizioak (EtOH taldea) adarkatze-komplexutasuna murriztu zuen hortz-bihurgune dortsaleko mikroglia zeluletan, kontrol (H<sub>2</sub>O) taldearekin alderatuta. Izan ere, soma erditik distantzia-tarte zabalean ebakipuntu kopurua nabarmen gutxitu zen, eta hori somatik distantzia gorakorretan neurtutako ebakipuntu kopurutik lortutako kurben azpiko azalaren analisi estatistikoetan islatu zen (5. A-C irudia). Horrenbestez, EtOH taldeko mikroglia zelulen luzapenak nabarmen laburragoak eta gutxiago hedatzen ziren erradialki, kontrol taldekoei aldea. Zentzu berean, H<sub>2</sub>O taldean, ebakipuntu kopururik handiena adierazten zuen kurbaren gandorra somaren erditik 17 μm-ra aurkitu zen, eta EtOH taldean, ordea, 4 μm hurbilago (13 μm) (5. irudia). Nabarmenki, *binge drinking* protokoloaren ondoren EPA eta DHA gantz-azidoetan aberastutako dieta jaso zuten saguen (EtOH-n-3 taldea) mikroglia zelulen analititik lortutako balioak (kurbaren azpiko azalera, ebakipuntu kopuru maximoa eta gandorraren somarekiko distantzia) H<sub>2</sub>O taldearen balioetara itzuli ziren (5. irudia). Bestalde, H<sub>2</sub>O-n-3 taldean parametro horien guztien handitze xume bat hauteman genuen, baina estatistikoki ez-esanguratsua izan zen. Emaitza hauek adierazten dute omega-3 gantz-azido dietetikoek nerabezaroan alkohol-kontsumoak eragindako mikroglia kalte estrukturala berreskuratzeko gaitasuna izan dezaketela.

*Western blot* entseguetarako 5 animalia erabili ziren talde experimental bakoitzerako. Animaliak lokadura zerbikal bidez sakrifikatu ondoren, garunak garezurretik atera eta hipokanpoak isolatu ziren. Ondoren, talde experimental bakoitza osatzen zuten 5 animalien hipokanpoak 0,32 M sakarosa eta proteasa inhibitzaileak zituen PB 0,1 M tanpoian homogeneizatu ziren, 1:10 ehun:tanpoi (g/ml) erlazioan. Horrela lortutako homogenatu osoaren laginen proteina edukia *Bradford* metodoaren bidez neurtu zen. Laginak alikuotatu eta -80 °C-tan gorde ziren, erabili arte. Homogenatu osoak urea desnaturalizazio tanpoian (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, %12 glizerola, %12 urea, %5 DTT, %2 SDS, %0,01 bromofenol urdina) 60 °C-tara berotu ziren 5 minutuz. Ondoren, laginak %10 SDS-poliakrilamida elektroforesi geletan (SDS-PAGE) migratu ziren, 100 V-tan 2 orduz eta 4 °C-tan. Elektroforesia amaitzean, proteinak %100 metanolean aktibatutako binilideno polifluoruro (PVDF) mintz batera transferitu ziren, 30 V-tan gau osoan zehar eta 4 °C-tan. Transferentziaren ostean, mintzak ur distilatutik pasatu, erabat lehortu eta %100 metanolean aktibatu ziren. Ondoren, 10 minutuz garbitu ziren PBS-T tanpoian (gatz-fosfato tanpoia 0,2 M, pH 7,5, %0,1 Tween-20). Mintzak ordubetez inkubatu ziren blokeo tanpoian (gatz-fosfato tanpoia 0,2 M, pH 7,5, %0,2 Tween-20, %5 esne gaingabetua, %0,5 behi-albumina serikoa) eta jarraian, blokeo tanpoian diluitutako MAGL eta COX-2 aurkako antigorputz primarioekin inkubatu ziren, 4 °C-tan gau osoan zehar. PBS-T tanpoian 10 minutuko hiru garbiketa egin ostean, mintzak errefau peroxidasarekin konjugatutako antigorputz sekundarioekin inkubatu ziren, bi orduz giro tenperaturan. Mintzak PBS-T tanpoian hiru aldiz garbitu, eta banda immunopositiboak kimiluminiszentzia substratuarekin errebelatu ziren. Irudien dentsitometria analisisia *Fiji-ImageJ* softwarearekin egin zen, talde experimental bakoitzaren datuak H<sub>2</sub>O taldearekiko normalizatuta, eta datuak ehuneko gisa adierazita.

**6. Irudia.** MAGL eta COX-2 entzimen espresio erlatiboaren neurketa hipokanpoko homogenatu osoetan, *Western Blot* bidez aztertuta. **A.** *Western blot* irudia eta MAGLren espresio erlatiboa adierazten duen grafiko-barra. **B.** *Western blot* irudia eta COX-2ren espresio erlatiboa adierazten duen grafiko-barra. Datuak H<sub>2</sub>O taldearekiko ehuneko bezala adierazten dira eta hiru (n=3; MAGL) edo bi (n=2; COX-2) errepikapen independenteetatik lortutako batezbestekoak  $\pm$  SEM adierazten dute. Alderaketa estatistikoak parekatu gabeko *Student's t test* bidez egin ziren. \* $p < 0,05$  (H<sub>2</sub>O taldearekiko); \*\* $p < 0,01$  (H<sub>2</sub>O taldearekiko); # $p < 0,05$  (EtOH taldearekiko).



Lortutako emaitzen arabera, EtOH taldeko saguen hipokanpoan bi entzima horien espresioak gora egin zuen H<sub>2</sub>O taldearekin alderatuta. MAGLren espresioa apur bat jaitsi zen alkohola eta omega-3 gantz-azidoetan aberastutako dieta jaso zuten saguetan (EtOH-n-3 taldea), baina oraindik gorago zegoen kontrolekin alderatuta. Ordea, EPA eta DHAn aberastutako dietaren ondoren, COX-2ren espresioa H<sub>2</sub>O taldearen maila berera itzuli zen EtOH taldeko saguen hipokanpoan (6. Irudia).

Emaitza hauek omega-3 gantz-azido dietetikoek nerabezaroan alkohol-kontsumoak AAtik eratorritako prostaglandina proinflamatorioen biosintesian parte hartzen duten entzima nagusien gora-erregulazioa moteltzen edo normaltzen dutela iradokitzen dute.

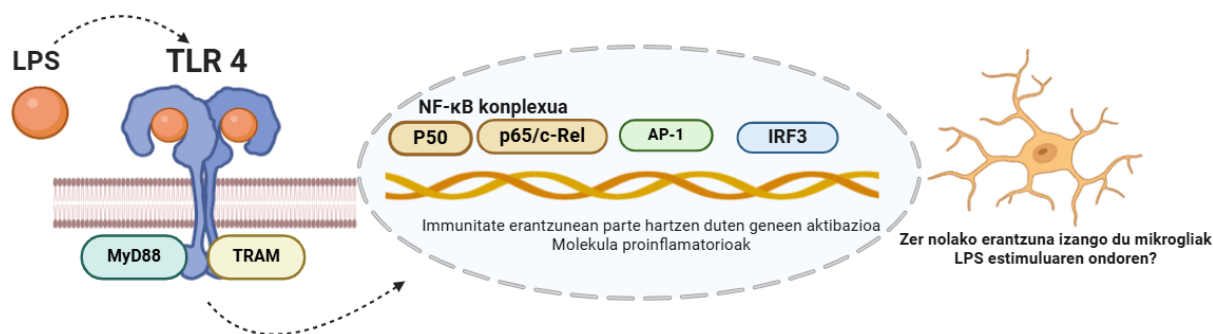
#### 4. Ondorioak

1. Nerabezaroan aldizkako alkohol kontsumoak mikrogliaaren adarkatze-komplexutasuna murrizten du epe luzera saguaren hortz-bihurgunean.
2. Omega-3 gantz azidoetan aberastutako dietak nerabezaroan alkohol-kontsumoak eragindako mikrogliaaren kalte estrukturala berreskuratzen dute.
3. Nerabezaroan aldizkako alkohol kontsumoaren ondorioz, AAtik eratorritako prostaglandina proinflamatorioen biosintesian parte hartzen duten MAGL eta COX-2 entzimen espresioa gora erregulatzen da.
4. Omega-3 gantz-azido dietetikoek nerabezaroan alkohol-kontsumoaren ondoriozko MAGL eta COX-2 entzimen espresioaren igoera moteltzen edo normaltzen dituzte.

#### 5. Etorkizunerako planteatutako norabidea

Gure datu morfometrikoek erakusten dute alkohol-kontsumoak mikrogliaaren egitura-aldaketak eragiten dituela, eta aurretik dauden ebidentzien arabera (Lékó et al., 2023), neuroinflamazioaren seinaleztapena gainaktibatuta egotea aurreikus liteke. Horren ondorioz, *binge drinking* motako alkohol-kontsumoaren ondoren, mikrogliaak proportzioz kanpoko erantzuna izan lezake inflamazio-estimuluen aurrean, bereziki Toll motako 4 hartzaila/ $\kappa$ B faktore nuklearra (TLR4/NF- $\kappa$ B) ardatzaren bidez (6. Irudia). Horrek hipokanpoaren homeostasia arriskuan jar lezake bitartekari proinflamatorioen (eikosanoideak eta kimiozinak) gehiegizko ekoizpenaren ondorioz. Beraz, etorkizuneko helburuen artean, TLR4/NF- $\kappa$ B ardatzeko osagaien espresioa eta kimiozina proinflamatorio eta antiinflamatorioen mailak neurtzeko asmoa dugu lau talde esperimentalen hipokanpoan mikroskopia zein teknika biokimiko eta analitikoaren bidez.

**6. Irudia.** Etorkizunean planteatzen den norabidearen irudi eskematikoa. Irudia egiteko *BioRender* aplikazioa erabili da.



MAGL entzimaz gain, 2-AGren sintesia parte hartzen duten fosfolipasa C $\beta$  (PLC $\beta$ ) eta diazilglizerol lipasa  $\alpha$  (DAGL $\alpha$ ) entzimak (1. Irudia) aztertuko ditugu lau talde esperimentaletan, AAre mailak eta oxigenasa-aktibitatearen bidezko eikosanoideen sintesia baldintzatu baititzakete. Horrekin lotuta, leukotrienoak eta lipoxinak bezalako eikosanoideen biosintesia inplikatur dauden lipooxigenasen (5-LOX eta 15-LOX) espresioa ere aztertuko dugu. Gainera, mintz-fosfolipidoen konposaketa, kannabinoideen eta AAre mailak hipokanpoko laginetan aztertuko ditugu, kromatografia likidoa eta masa-espektrometria (LC/MS) erabiliz.

Azkenik, saguei lipopolisakaridoa (LPS) intraperitonealki administratuz, TLR4 hartzailea aktibatu egingo dugu. Ondoren, inflamazioaren aurreko erantzuna ebaluatzeko, bitartekari pro- eta antiinflamatorioak (kimiozinak eta eikosanoideak) analizatuko ditugu talde esperimental guztien hipokanpoko laginetan (6. Irudia).

## 6. Erreferentziak

- Crews FT, Vetreno RP, Broadwater MA, Robinson DL. Adolescent Alcohol Exposure Persistently Impacts Adult Neurobiology and Behavior (2016). *Pharmacol*, 68,v1074-1109.
- Dyall SC (2017). Interplay Between n-3 and n-6 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and the Endocannabinoid System in Brain Protection and Repair. *Lipids*, 52, 885–900.
- Eusko Jaurlaritza, Osasun Saila. (2024). Euskadiko adikzioei buruzko 2023ko inkestaren emaitza nagusiak.
- Farooqui, A. A., Horrocks, L. A., & Farooqui, T. (2007). Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem*, 101, 577–599.
- Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 8174-8179
- Govek KW, Nicodemus P, Lin Y, Crawford J, Saturnino AB, Cui H, Zoga K, Hart MP, Camara PG (2023). CAJAL enables analysis and integration of single-cell morphological data using metric geometry. *Nat Commun*, 14, 3672.
- Jiang M, Huizenga MCW, Wirt JL, Paloczi J, Amedi A, van den Berg RJBHN, Benz J, Collin L, Deng H, Di X, Driever WF, Florea BI, Grether U, Janssen APA, Hankemeier T, Heitman LH, Lam TW, Mohr F, Pavlovic A, Ruf I, van den Hurk H, Stevens AF, van der Vliet D, van der Wel T, Wittwer MB, van Boeckel CAA, Pacher P, Hohmann AG, van der Stelt M (2023). A monoacylglycerol lipase inhibitor showing therapeutic efficacy in mice without central side effects or dependence. *Nat Commun*, 14, 8039.
- Knapp, DJ, Crews, FT (1999). Induction of cyclooxygenase-2 in brain during acute and chronic ethanol treatment and ethanol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res*, 23(4), 633–643
- Lékó AH, Ray LA, Leggio L (2023). The vicious cycle between (neuro)inflammation and alcohol use disorder: An opportunity to develop new medications? *Alcohol Clin Exp Res (Hoboken)*, 47, 843-847.
- Lu HC, Mackie K (2021). Review of the Endocannabinoid System. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*, 6, 607-615.

- McAllister LA, Butler CR, Mente S, O'Neil SV, Fonseca KR, Piro JR, Cianfroga JA, Foley TL, Gilbert AM, Harris AR, Helal CJ, Johnson DS, Montgomery JJ, Nason DM, Noell S, Pandit J, Rogers BN, Samad TA, Shaffer CL, da Silva RG, Uccello DP, Webb D, Brodney MA (2018). Discovery of Trifluoromethyl Glycol Carbamates as Potent and Selective Covalent Monoacylglycerol Lipase (MAGL) Inhibitors for Treatment of Neuroinflammation. *J Med Chem*, 61, 3008-3026
- McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, Nuñez A, Butrym ED, Richards MP, Wang CS, Cheng G, Zhao Z, Wang C (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 17593-17598.
- Most, D., Ferguson, L., & Harris, R. A. (2014). Molecular basis of alcoholism. *Handbook of Clinical Neurology*, 125, 89–111. Elsevier, Amsterdam.
- Navascués J, Calvente R, Marín-Teva JL, Cuadros MA (2000). Entry, dispersion and differentiation of microglia in the developing central nervous system. *An Acad Bras Cienc*, 72, 91-102
- Nwachukwu KN, Healey KL, Swartzwelder HS, Marshall SA (2022). The Influence of Sex on Hippocampal Neurogenesis and Neurotrophic Responses on the Persistent Effects of Adolescent Intermittent Ethanol Exposure into Adulthood. *Neuroscience*, 506, 68-79.
- Nomura DK, Morrison BE, Blankman JL, Long JZ, Kinsey SG, Marcondes MC, Ward AM, Hahn YK, Lichtman AH, Conti B, Cravatt BF (2011). Endocannabinoid hydrolysis generates brain prostaglandins that promote neuroinflammation. *Science*, 334, 809-813.
- Norris PC, Dennis EA (2012). Omega-3 fatty acids cause dramatic changes in TLR4 and purinergic eicosanoid signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 8517-22.
- Owens RA, Mustafa MA, Ignatowska-Jankowska BM, Damaj MI, Beardsley PM, Wiley JL, Niphakis MJ, Cravatt BF, Lichtman AH (2017). Inhibition of the endocannabinoid-regulating enzyme monoacylglycerol lipase elicits a CB1 receptor-mediated discriminative stimulus in mice. *Neuropharmacology*, 125, 80-86
- Peñasco S, Rico-Barrio I, Puente N, Fontaine CJ, Ramos A, Reguero L, Gerrikagoitia I, de Fonseca FR, Suarez J, Barrondo S, Aretxabala X, García Del Caño G, Sallés J, Elezgarai I, Nahimey PC, Christie BR, Grandes P (2020). Intermittent ethanol exposure during adolescence impairs cannabinoid type 1 receptor-dependent long-term depression and recognition memory in adult mice. *Neuropsychopharmacology*, 45, 309-318
- Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA, Crabbe JC (2005). Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav*, 84, 53-63.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Ikerlan hau egiteko finantzazioa honako erakunde publiko hauetatik lortu da: Eusko Jaurlaritza (IT1620-22); Red de Investigación en Atención Primaria de Adicciones (RIAPAd), Instituto de Salud Carlos III (ISC-III RD21/0009/0006) eta Europar Batasunaren Europako Eskualde Garapenerako Funtsa (ERDF-EU; RD16/0017/0012); Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-107548RB-I00, PID2022-138266NB-I00; MCIN/AEI/10.13039/501100011033 eta ERDF *A way of making Europe*).