



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

**Erdialdeko habenularen parte-
hartzea emozioen fisiopatologian**

*Lucía Sangroniz-Beltrán,
Nahia López de Murga,
Alaitz Mugica-Peñacoba,
Cathaysa Rodríguez-Cedrés,
Paula Torres-Maldonado,
Pablo Reyes-Velásquez,
Maria Ceprián, Jon Egaña-Huguet
eta Edgar Soria-Gómez*

145-152 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.vi.04.17>

ANTOLATZAILEA



BABESLEAK



LAGUNTZAILEAK



Erdialdeko habenularen parte-hartzea emozioen fisiopatologian

Lucía Sangroniz-Beltrán¹, Nahia López¹, Alaitz Mugica¹, Cathaysa Rodríguez-Cedrés¹, Paula Torres-Maldonado¹, Pablo Reyes-Velásquez¹, Maria Ceprián¹, Jon Egaña-Huguet¹, Edgar Soria-Gómez^{1,2}

¹Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia, Achucarro Basque Center for Neuroscience, Leioa, Bizkaia; ²Ikerbasque, Foundation for Science

lucia.sangroniz@ehu.eus

Laburpena

Habenulako nukleoek egoera motibazional eta kognitibo desberdinetarako garrantzitsuak diren garuneko egiturak lotzen eta erregulatzen dituzte. Neuronez gain, mintz plasmatikoko CB1R adierazten duten glia-zelulek (astrozitoek, mikroglia, oligodendrozitoek) prozesu hauetan ere parte hartzen dute. Lan honetan, erdialdeko habenularen glia-zelulek aldaketek portaeran zer eragin duten aztertu da. Horretarako, batetik, saguen astrozitoetan CB1R ezabatu da eta, bestetik, depresio sagu-ereduak erabili dira. Sagu hauek estimulu negatiboan aurrean duten erantzuna aztertu da portaera frogak erabiliz. Ondoren, glia zelulen, hau da, astrozitoen eta mikroglia, kontaketa eta morfologia ikertu dugu. Lortutako emaitzek iradokitzen dute erdialdeko habenularen astrozitoek eta mikroglia-zelulek portaera-aldaketen mekanismoan parte hartzen dutela.

Hitz gakoak: erdialdeko habenula, CB1R, emozioak, endokannabinoidak, mikroglia eta astrozitoak.

Abstract

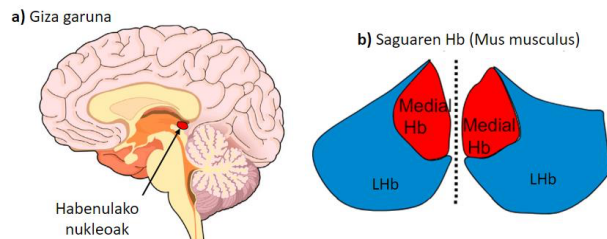
Habenular nuclei link and regulate brain structures crucial for different motivational and cognitive states. In addition to neurons, glial cells (astrocytes, microglia and oligodendrocytes) that express CB1R in the plasmatic membrane also participate in these processes. In this work, the effect of changes in the glial cells, astrocytes and microglia, of the medial habenula has been studied. To do so, on one hand, CB1R has been eliminated in the astrocytes of mice and, on the other hand, models of mice depression have been studied. The response of these mice to negative stimuli has been studied using behavioral tests. After these, the counting and morphology analysis of glial cells, astrocytes and microglia, was done. Results suggest that the astrocytes and microglia cells of the medial habenula are involved in the mechanisms of behavioral changes.

Key words: medial habenula, CB1R, depression, endocannabinoids, microglia and astrocytes.

1. Sarrera eta motibazioa

Emozioek garunean oinarri konplexua dute. Emozioen funtzionamendua ulertzeko hauen prozesamenduan inplikaturako garuneko egiturak eta horiek lotzen dituzten bide neuronalak aztertzea beharrezkoa da. Egitura horien artean habenulako nukleoak aurkitzen dira. Azken urteetan, habenulako nukleoen anatomia, funtzioa eta zenbait nahasmendu emozionaletan izan dezaketen partaidetza ikertu da. Azterketa horiek habenulako nukleoek erantzun emozionalaren erregulazioan duten garrantzia azaleratu dute, baita zenbait nahasmendu emozionalen fisiopatologian izan dezaketen eragina ere, hala nola, depresioan eta antsietatean (Matsumoto eta Hikosaka, 2007; Soria-Gomez et al., 2015).

Habenulako nukleoak ornodunetan dauden dientzefaloko egitura txikiak dira, bilateralak, gizakietan 20-30 mm³ inguruko bolumena dutenak (Loonen eta Ivanova, 2022). III. bentrikuluaren inguruan kokatzen dira eta epifisiarekin batera epitalamoa osatzen dute (1. irudia) (Namboodiri et al., 2016). Habenula bi nukleotan banatzen da, alboko habenulako nukleoa (LHb) eta erdialdeko habenulako nukleoa (MHb) (1. irudia) (Namboodiri et al., 2016). Azpieremu horiek neurri handi batean independenteak dira, gene-adierazpenaren eta konektibitate anatomikoaren profil oso desberdinak baitituzte (Hashikawa et al., 2020).



1. irudia. Habenulako nukleoak (Hb) kokapena eta egitura. (a) Giza garunaren irudia erdialdeko ikuspegitik. Namboodiri eta lankideen lanetik (2016) egokitua. (b) Saguaren Hben egitura anatomikoa koroa ebaketatik ikusita. Ezkerreko eta eskuineko alboko habenula (LHb) urdinez eta erdialdeko habenula (MHb) gorritz adierazten dira. Groos eta Helmchenen (2024) lanetik egokitua.

Funtzioari dagokionez, habenulako nukleoek egoera motibazional eta kognitibo desberdinetarako garrantzitsuak diren garuneko eskualdeak lotzen eta erregulatzen dituzte. Adibidez, emozio negatiboak, mendekotasunak, sari efektua, erritmo zirkadianoak eta abertsioa. Hala ere, LHbrekin alderatuta, MHbren funtzioei buruz oso informazio gutxi dugu; izan ere, MHbren forma txikiak eta bere kokapenak, ikerketa zailtzen dute (Namboodiri et al. 2016; Ables et al., 2023; Soria-Gomez et al., 2015). Garuneko beste egiturekin dituen konexioei dagokienez, batetik, MHbk nagusiki prosentzefaloko egitura kolinergikoetatik jasotzen ditu aferentziak. Bestetik, MHbren eferentzia gehienak, *retroflexus* faszikuluaren (FR) bitartez, pendukulu-arteko nukleora (IPN) proiektatzen dira. Aldi berean, IPNk mesentzefaloko beste eremu batzuekin konexioak eratzen ditu. Horien artean, bizkarraldeko errafeko nukleoarekin (DRN) eta erdiko errafeko nukleoarekin (MRN) (Ables et al., 2023; Korlatowicz et al., 2023; Loonen eta Ivanova, 2022).

MHbko zelula-populazioari dagokienez, %50a neuronez osatuta dago (Namboodiri et al., 2016). Gainontzekoa glia zelulek osatzen dute: astrozitoek, mikrogliek, oligodendrozitoek etab. (Ables et al., 2023). Aipatutako neuronek endokannabinoidesistemaren (EKS) parte den lehen motako hartzaile kanabinoida adierazten dutela ere jakina da (Soria-Gomez et al., 2015).

EKS ugaztunen sistema neuromodulatzaile nagusia da eta nerbio sistema zentrolean (NSZ) funtzio fisiologiko ugari erregulatzen ditu: oroimena, gogo-aldarte edota gosea. Sistema hau G-proteinetara atxikituriko bi hartzailek, hauen ligando endogenoek eta horiek degradatzen eta sintetizatzen dituzten entzimek osatzen dute. Horrela, bi hartzaile dira nagusi: lehen motako hartzaile kanabinoida (CB1R) eta bigarren motako hartzaile kanabinoida (CB2R). Hauen ligando endogeno edo endokannabinoida aipagarrienak anandamida (N-arachidonoiletanolamida, AEA) eta 2-arakidonoilglizerola (2-AG) dira. Endokannabinoiden sintesia neuronan alde postsinaptikoan gertatzen da eta seinaleztapena atzerakariari esker, neurona presinaptikoan eragiten dute. Bertan, ligando horiek CB1R edo CB2R presinaptikoetara lotzean, horiek aktibatu eta, neurotransmisoreen (GABA, glutamatoa) askapena murrizten da (Pertwee eta lankideek, 2010; Gerdeman eta lankideak, 2001).

Neuronetan ez ezik, CB1R garuneko beste egitura batzuetan dauden glia zeluletan ere adierazten dela jakina da; adibidez, astrozitoetan, non transmisio sinaptikoan eragiteko gai dela frogatu den, oligodendrozitoetan edota mikroglia (Navarrete eta Araque, 2010; Castillo eta lankideak, 2012). Nahiz eta adierazpen-maila desberdina izan egituraren arabera, CB1Rren funtzioak aktibatzen den zelula motaren arabera dira (Robledo-Menendez et al. 2022). Gainera, astrozitoak jardura sinaptikoan eta plastikotasunean garrantzi handia duten glia zelulak dira. Horien funtzio nagusia neuronan biziraupenerako eta garunaren funtzionamendu egokia mantentzea da (Busquets-García et al., 2017). Astrozitoak ekintza-potentzialik ez duten eta komunikazio-ahalmena duten glia-zelula kitzikagarriak dira. Zelula-barneko kaltzio-kontzentrazio aldaketen aurrean gliotransmisoreak (GABA, ATP, glutamatoa) askatzen dituzte, neuronetan eta gainerako astrozitoetan eraginez (Guillamón-Vivancos et al., 2015). Are gehiago, astrozitoek mikroglia zelulekin etengabe elkarrekin dute eta haien jarduerak elkarrekin koordinatzen dituzte. Hain zuzen ere, neuroinflamazio baldintzetan, bi zelula motek hainbat aldaketa jasaten dituzte. Batetik, garun-homeostasia aldatzean mikroglia zelulek hantura eragiten duten molekulen jariatzea eta zenbait aldaketa morfologiko jasaten dituzte, itxura ameboidea lortuz. Bestetik, astrozitoek fenotipo erreaktiboa aurkezten dute, morfologia, funtzioa eta kopurua aldatzen delarik (Garland et al., 2022).

Garunaren homeostasia aldatzen duten eta glia zelutetan eragina duen gaixotasunen artean depresioa dugu. Depresioa ohiko buru-nahasmendua da, etsipen sentimendu eta motibazio galerak bereizten duena. Gaixotasun konplexua da eta horren kausa fisiopatologikoak guztiz zehaztu ez diren arren, zenbait ikerketek aditzera eman dute sistema immunologikoaren aktibazioaren eta depresioaren artean lotura zuzena dagoela (Beurel et al., 2020; Guo et al., 2023). Gainera, neuroinflamazioa erantzun multizelular konplexua da, gaixotasun neurologikoekin eta psikiatrikoekin lotu dena (Diaz-Castro et al., 2021). Neuroinflamazioa ondorengo ezaugarrietan oinarritzen da: mikrogliaaren aktibazioa, periferiako zelula immunologikoen infiltrazioa nerbio sistema zentralera eta nerbio- ehunaren kaltea, besteak beste (Estes eta McAllister, 2014; Woodburn et al., 2021). Horrela, neuroinflamazioa eragiteko *E. coli* bakterioaren lipopolisakaridoak (LPS) erabili dira. Honek, jokabide aldaketak eragiten ditu eta saguetan depresio-eredu bezala erabili izan dira, LPSei infekzio periferikoa eragiten baitituzte. LPSei injekzioaren ondorioz, zelula-mota ezberdinetan aldaketak deskribatu dira, hala nola, gainadierazitako gene ugari, gehienak mikrogliaarenak. Horrek aditzera ematen du mikroglia LPSei bidez eragindako neuroinflamazioaren modulazioan parte hartu dezakeela (Diaz-Castro et al., 2021; O'Connor et al., 2009). Ildo beretik, hainbat ikerketek berretsi dute CB1Rrik ez duten saguak (CB1-KO) depresio-eredu egokiak izan daitezkeela depresio-antzeko nahasmenduak ikertzeko (Valverde eta Torrens, 2012).

Honekin guztiarekin, MHbk garuneko gaixotasunekin erlazionatutako fenotipoetan garrantzia duen ezagutzeko, maila zelular eta molekularrean egitura hau aztertzea beharrezkoa dela deritzugu.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Habenularen inguruan egindako ikerketa gehienak LHbn zentratu dira (Antunes et al., 2023). MHbren inguruan aldiz, ezagutza asko falta da eta nahasmendu emozionaletan jokatzeko duen paperaren garrantzia ikusita, zein sistema linbikoarekin eratzen dituen konexioetan oinarrituta, ezinbestekoa da MHbren osaketa anatomikoa eta funtzioa aztertzea. Gizakion emozioen oinarri biologikoa hobeto ulertu eta gaixotasunak tratatzeko estrategia terapeutiko berriak garatu ahal izateko. Ikerketa honen bitartez, MHbko glia zelula ezberdinetan (astrozito eta mikroglia zeluletan) partaidetza eragindako kalteak aztertuko dira, zelula hauei zehazki eragiten dieten aldaketak eraginez. Astrozitoen kasuan, CB1Rren parte-hartzea aztertuko da hartzaile hau ezabatuz. Mikroglia aztertzeko, ordea, LPSei injektatuko dira. Ondoren, erantzun emozionala aztertuko dugu zenbait portaera proben bitartez. Honez gain, aipatutako zelulen kontaketa eta analisi morfologikoa egingo da, CB1R ezak edota neuroinflamazioak sortarazitako aldaketak aztertzeko. Bukatzeko, arrak eta emeak bereizi dira, hauen arteko ezberdintasun posibleak ikusteko.

3. Ikerketaren muina

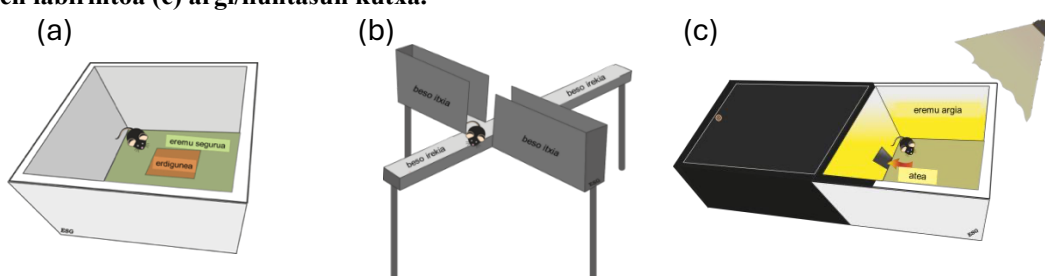
Esperimentuak egiteko bi sagu talde ezberdin erabili ziren. Alde batetik, astrozitoen CB1Rren funtzioa ezagutzeko, 8 asteko CB1flox anduiko sagu ar (n=12) eta emeak (n=7) erabili ziren. Aldi berean, sagu hauek bi taldeetan banatu ziren: kontrolak eta tratatuak. CB1 flox saguek CB1Rren proteina ekoizteaz arduratzen den genearen bi aldeetan loxP izeneko DNA sekuentzia bat atxikiturik daramate. Sekuentzia hauek, CRE entzima daraman birus batekin erreakzionatzen dute eta loxP guneen artean kokatzen den genea ebakitzen dute, gure kasuan CB1Rren genea. Hortaz, gene honek kodifikatzen duen proteinaren, hots, CB1Rren, *de novo* sintesia oztopatzen da. Erabili dugun birusa, AAV-(GFAP)Cre, CRE entzima atxikiturik darama eta kirurgia esterotaxikoa erabiliz MHbn injektatu zitzaizen saguei. Birus honek astrozitoetan adierazten den GFAP (glial fibrillary acidic protein) sustatzaileari esker, astrozitoetan espezifiki adierazten da. Honela, astrozitoen CB1Rren adierazpena ezabatzen da eta knockout (KO) saguak bihurtzen dira (MHb-(GFAP)-CB1R-KO). Sagu kontrolak (CTL), ostera, birus kontrol bat injektatu zitzaizen, CRE entzimarik gabekoa. Beraz, kontrol saguek ez dute CB1Rren ezabapena izan, CB1R adierazten dute. Injekzioa egokia izan dela frogatzen duten teknika immunohistokimikoak egiten ari gara.

Mikrogliako zelulak depresio gaixotasunean aztertzeko, 8 asteko 6 sagu eme arrunt erabili ziren. Sagu hauei portaera probak egin baino 24h lehenago LPS injektatu zitzairen peritoneo barneko bidetik. Kontrol saguei (KTL), berriz, soluzio gatzatua injektatu zitzairen peritoneo barneko bidetik.

3.1 Portaera probak

Saguen estimulu negatibo baten aurrean agertzen duten berezko erantzun emozionala aztertzeko hiru portaera-proba erabili ziren (2. irudia): eremu irekia, gurutze goratuaren labirintoa eta argi eta iluntasun kutxa. Saguen proba hauek sortzen dituzten estimulu negatibok (eremu irekiak, garaiak edo argiztatutak) arriskutsutzat joko dituzte eta, hortaz, hauek saihesteko joera izango dute. Proba hauek sortzen duten estimulu negatiboen arabera egin ziren, estimulu negatibo txikiena sortzen duen probatik hasita. Beraz, neurtutako hainbat parametroen artean, saguen eremu ez-seguruan egondako denbora aintzat hartu zen. Proba bakoitzak 5 minutu irauten du animalia bakoitzeko.

1. irudia. Berezko portaera emozionala aztertzeko egindako portaera-probak: (a) eremu irekia (b) gurutze goratuaren labirintoa (c) argi/iluntasun kutxa.

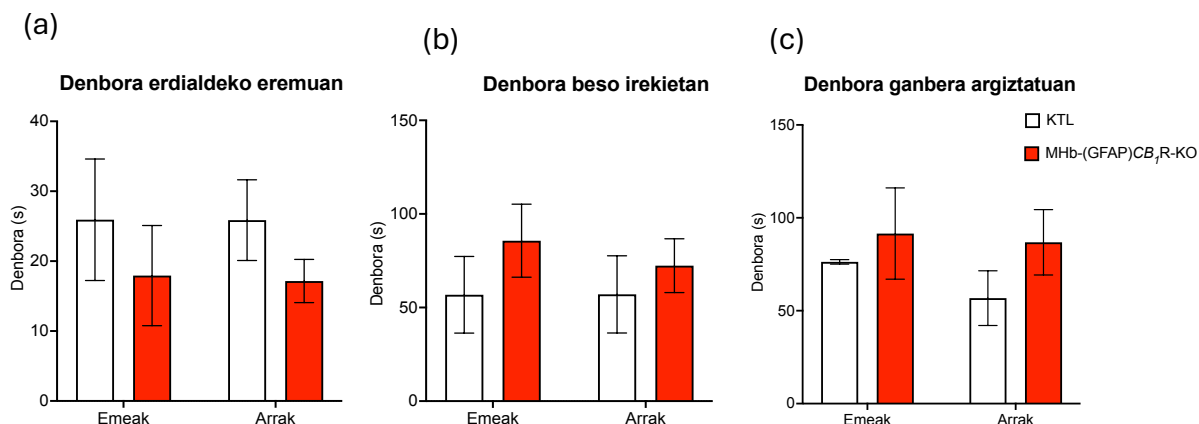


Eremu irekiaren proba egiteko, animaliak banaka kutxa huts batean (40 x 40 x 45 zm) jarri ziren eta erdigunean (eremu ez-seguruan) igarotako denbora neurtu zen (3a. irudia). Sagu emeen artean, kontrolek batez beste $25,89 \pm 5,32$ segundo igaro zituzten, eta MHb-(GFAP)-CB1R-KOek, aldiz, $17,55 \pm 6,88$ segundo. Sagu arren kasuan, kontrolek batez beste $25,83 \pm 3,74$ segundo igaro zituzten, eta MHb-(GFAP)-CB1R-KOek, berriz, $17,16 \pm 1,45$ segundo. Gurutze goratuaren proban (beso bakoitzaren neurriak: 5,5 x 40 zm) lurretik metro batera kokatutako gurutze formadun plataforma erabili zen. Plataforma honek bi beso itxi eta bi beso ireki ditu. Probaren hasieran animalia bakoitza gurutzearen erdian jarri eta beso irekietan (eremu ez-seguruan) igarotako denbora neurtu zen (3b. irudia). Sagu emeen artean, kontrolek beso irekietan egondako denboraren batezbestekoa $56,72 \pm 8,38$ segundo izan zen, MHb-(GFAP)-CB1R-KOena, aldiz, batez beste $85,70 \pm 6,67$ segundo. Sagu arren kasuan, kontrolek batez beste $57,04 \pm 5,44$ segundo igaro zituzten beso irekietan eta MHb-(GFAP)-CB1R-KOek, aldiz, batez beste $72,34 \pm 4,82$ segundo. Ondoren, argi eta iluntasun kutxa erabili zen. Proba honek (30 x 30 x 33,5 zm) bi ganbera ditu: iluna den ganbera bat eta oso argiztatuta dagoen beste bat (200 lux). Saguen ganbera argiztatuan (eremu ez-seguruan) igarotako denbora neurtu zen (3c. irudia). Sagu emeen artean, ganbera argiztatuan egondako denboraren batezbestekoa kontrol-saguetan batez beste $76,30 \pm 0,83$ segundo izan zen eta MHb-(GFAP)-CB1R-KOetan, berriz, $91,53 \pm 7,963$ segundo. Sagu arren kasuan, kontrolek $56,78 \pm 3,78$ segundo igaro zituzten batez beste, eta MHb-(GFAP)-CB1R-KOek $86,81 \pm 3,25$ segundo. Hortaz, MHb-(GFAP)-CB1R-KO saguen, batetik, eremu irekiko erdigunean denbora gutxiago egoteko joera adierazi zuten; eta, bestetik, gurutze goratuko beso irekietan eta argi eta iluntasun kutxako ganbera argiztatuan denbora gehiago egoteko joera adierazi zuten.

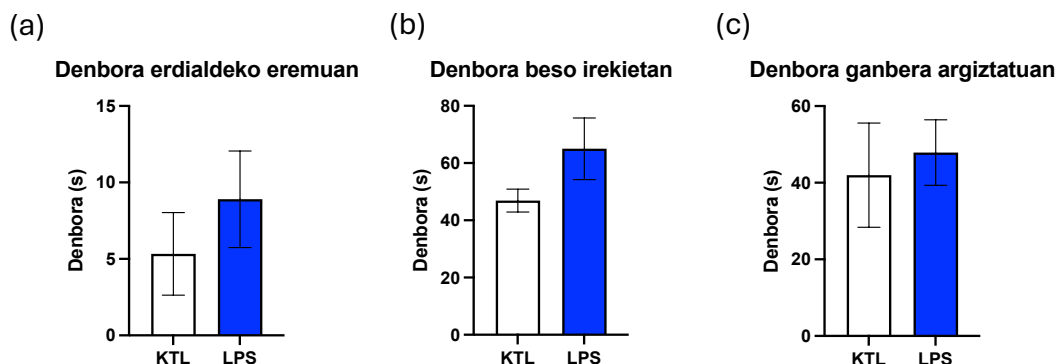
Bestalde, LPSein tratatutako saguen ere portaera desberdina erakutsi zuten. Eremu irekiaren proban, sagu-kontrolek kutxaren erdigunean batez beste $5,333 \pm 2,69$ segundo igaro zituzten. LPSein tratatutako saguen, berriz, $8,9 \pm 3,15$ (4a. irudia). Gurutze goratuaren labirintoan beso irekietan igarotako denborari dagokionez, kontrolek beso irekietan batez beste $46,9 \pm 3,98$ segundo igaro zituzten eta tratatutako saguen, aldiz, $65 \pm 10,79$ (4b. irudia). Argi eta iluntasun kutxan, kontrolek batez beste $41,97 \pm 13,59$ segundo igaro zuten argiztatutako kutxan eta tratatuek $47,87 \pm 8,54$ (4c. irudia). Hortaz, LPSein tratatutako saguen

denbora gehiago igaro zuten eremu ez-seguruan, gurutze goratuan izan ezik. Hala ere, sagu kopurua urria denez, ezin da esan aldaketa esanguratsurik dagoenik.

3. irudia. Portaera-probetan eremu ez-seguruan egondako denbora. Datuen batezbestekoa $\pm$ S.E.M. gisa adierazten da.



4. irudia. Portaera-probetan saguek eremu ez-seguruan egondako denbora. Datu guztien batezbestekoa $\pm$ S.E.M. gisa adierazten da.



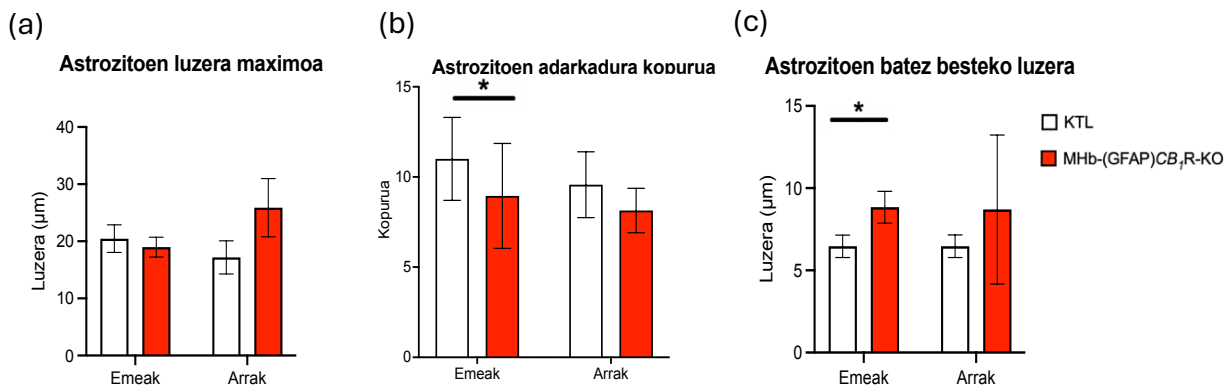
3.2 Laginen prestaketa eta analisisia

Portaera probak egin ostean eta garun-ehunak finka zitezen, animalia guztiak bihotz-barneko perfusioaz finkatu ziren, %4ko paraformaldehido (PFA) disoluzio bat erabiliz. Garunak 50 μ m-ko lodieradun mozketetan ebaki ziren bibratomoaren laguntzaz eta hauek immunohistokimikako tindaketarako prestatu ziren. Horrela, astrozitoen CB1R ezabatu dugun esperimentuan, astrozitoak tindatzeko astrozitoen GFAP proteinaren kontrako antigorputzak erabili ziren. LPSein tratatutako saguetan, ordea, mikroglia zelulak tindatu zitezen, IBA1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) proteinaren kontrako antigorputzak erabili ziren. Laginen azterketa, mikroskopioa erabiliz egin zen eta Fiji Image J programarekin aztertu ziren. CB1Rren ezabapena egin zen animalietan, astrozitoen morfologia aztertu eta mikroglia zelulen kontaketa egin zen. Morfologia aztertzeko, zoriz MHBko 7-10 zelula aukeratu eta hiru parametro neurtu ziren: adarkadura kopurua, adarkaduren luzera eta luzera maximoa.

Astrozitoen luzera maximoan ez zen ezberdintasun esanguratsurik antzeman KTL eta MHB-(GFAP)-CB1R-KO animaliak alderatzean. Eme kontrolen batez besteko luzera maximoa batez beste $20,45 \pm 2,41$ μ m izan zen, eta eme MHB-(GFAP)-CB1R-KOena $18,98 \pm 1,72$ μ m ($p = 0,6296$) (5a. irudia). Bestetik, ar kontroletan luzera maximoa batez beste $17,19 \pm 2,89$ μ m izan zen, MHB-(GFAP)-CB1R-KOetan, berriz, $25,88 \pm 5,08$ μ m ($p = 0,3176$). Bestetik, astrozitoen adarkadura kopuruari dagokionez, kontrol- eta MHB-(GFAP)-CB1R-KO saguen artean ezberdintasun esanguratsurik aurkitu ziren emetan, baina ez arretan (5b. irudia). Hain zuzen ere, sagu eme kontroletan astrozitoen batez besteko adarkadura kopurua $11 \pm 2,29$

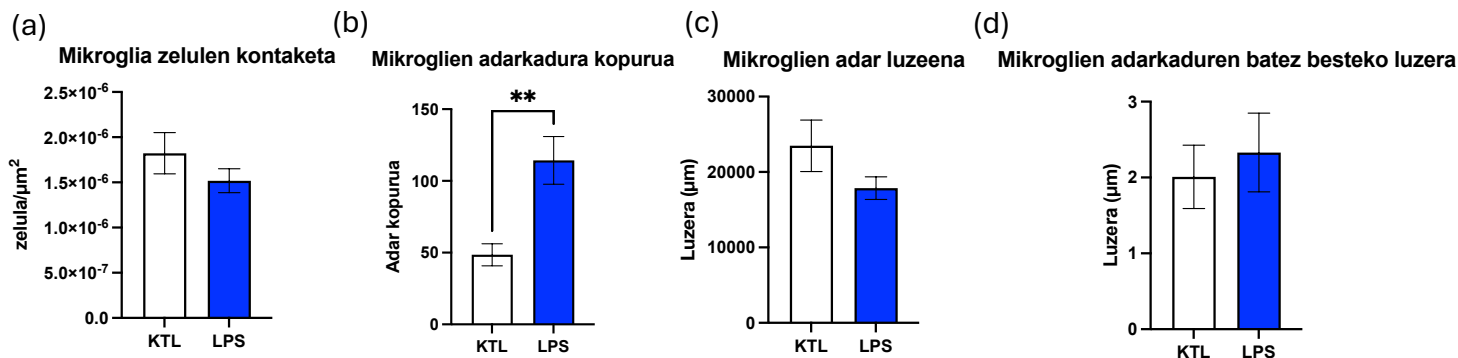
adarkadura izan zen, eta MHB-(GFAP)-CB1R-KOetan $5,71 \pm 0,35$ ($p = 0,028$). Sagu arren kasuan, kontrolen adarkaduren batez besteko kopurua $9,57 \pm 1,82$ adarkadura izan zen eta MHB-(GFAP)-CB1R-KOena, berriz, $6,85 \pm 1,16 \mu\text{m}$ ($p = 0,1037$). Astrozitoen adarkaduren luzerari dagokionez (5c. irudia), kontrol- eta MHB-(GFAP)-CB1R-KO saguen artean ezberdintasun esangarriak antzeman ziren emetan, baina ez arretan. Sagu emeen kasuan, adarkaduren batez besteko luzera kontroletan $6,46 \pm 0,68 \mu\text{m}$ izan zen eta MHB-(GFAP)-CB1R-KOetan, berriz, $8,84 \pm 0,96 \mu\text{m}$ ($p = 0,0055$). Arren kasuan, kontrol-saguen batezbestekoa $6,47 \pm 0,69 \mu\text{m}$ izan zen, eta KO MHB-(GFAP)-CB1R-KOetan $8,92 \pm 1,43 \mu\text{m}$ ($p = 0,4719$).

5. irudia. Saguen MHBko astrozitoen morfologia azterketako emaitzak. Datu guztien batezbestekoa $\pm$ S.E.M. gisa adierazten da. Esangura estatistikoa Mann Withney testaren arabera adierazten da ($p < 0,05$).



LPSein tratatutako saguetan (6a. irudia), mikroglia zelulen morfologia eta kontaketa egin ziren. Kontrolen laginetan batez beste $23 \pm 2,71$ zelula zeuden μm^2 -ko eta LPSein tratatutako saguetan aldiz, $19,3 \pm 1,14$ zelula/ μm^2 ($p = 0,4072$). Adarkadura kopuruan aldaketa esanguratsuak ikusi ziren kontrolen eta tratatutakoen zeluletan. Sagu-kontrolen mikroglia batez beste $48,5 \pm 7,72$ adarkadura zituen eta tratatutako saguen zeluletan adarkadura kopuruaren batez bestekoa $114,3 \pm 16,66$ zen ($p = 0,0017$) (6b. irudia). Mikrogliaaren tamaina auresateko aztertutako zelula bakoitzaren adarkadura luzeenaren datuak bildu ziren (6c. irudia). Kontrolen zelulen tamaina batez beste $23,48 \pm 3,4 \mu\text{m}$ -koa zen eta LPSein tratatutako zelulen tamaina $18,05 \pm 1,83 \mu\text{m}$ -koa ($p = 0,3562$). Honek, aditzera ematen du aztertutako mikrogliaaren tamaina kontroletan eta tratatuen artean ez dagoela ezberdintasun esanguratsutik. Adarkaduraren tamaina aztertzeko, zelulen adarkadura guztien batezbestekoa hartu zen (6d. irudia), baina ez zen aldaketa esanguratsurik aurkitu. Azken batean, kontrolen mikrogliaaren adarkaduren batez besteko tamaina $4,23 \pm 0,22 \mu\text{m}$ -koa zen heinean, tratatutako zelulen adarkaduraren tamaina $3,6 \pm 0,11 \mu\text{m}$ -koa zen ($p = 0,4072$).

6. irudia. Mikroglia zelulen kontaketa (a) eta morfologiari dagokien parametroak: (b) adarkadura kopurua (c) adarkaduren batez besteko luzera eta (d) adarkaduraren luzera maximoa. ** $p < 0,01$. Datu guztien batezbestekoa $\pm$ S.E.M. gisa adierazten da.



4. Ondorioak

Alde batetik, estimulu negatiboen aurrean saguen erantzuna ezberdina izateko joera duela esan dezakegu, ar eta emeetan MHBko astrozitoeko CB1R ezabatu ondoren, baita LPSak eragindako neuroinflamazioaren ondoren sagu emeetan. CB1Rren ezabapenak, sagu emeen kasuan, astrozitoen morfologian eragina du, eta mikroglia zelula kopuruan eragiteko joera duela ere ikusi da. Horrek iradokitzen du sagu emeen kasuan emandako aldaketa emozionalen oinarrian glia zelulen aldaketak egon daitezkeela, bereziki astrozitoen aldaketa-morfologikoak. Bestetik, egia da, eremu irekian KO animaliek kontrolek baino denbora gutxiago igaro zutela erdigunean, beste portaera-probekin alderatuta. Baina eremu irekia estimulu negatibo txikiena sortzen duen proba denez, beharbada, KO saguen portaera estimulu negatiboaren hautematearen arabera izan daiteke.

Are gehiago, LPSein injektatutako animalietan ikusi da adarkadura kopurua handitu dela. Lortutako emaitzek iradokitzen dute sortutako neuroinflamazioaren eraginez, MHBko mikroglia zelulak portaera-aldaketen mekanismoan inplikaturik dagoela.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Etorkizunera begira, ikerketa honetan abiatutako esperimentuak osatu beharko lirateke hauen lagin kopurua igoz; hau da, sagu gehiago erabiliz. Horretaz gain, esperimentu bakoitzean aztertu ditugun zelulez aparte, beste zelula mota batzuk ere aztertu daitezke. Esaterako, astrozitoen morfologia aztertu badugu, lagin berdinetan mikroglia morfologia aztertu daiteke, eta alderantziz, mikroglia aztertu ditugun laginetan, astrozitoak. Bestalde, LPSein esperimuntuan arrak gehitu beharko lirateke. Honela, informazio gehiago lortu ez ezik, sexuen arteko ezberdintasunak ere aztertuko. Bukatzeko, bestelako emozioak ere aztertuko asmarekin, ez soilik negatiboak edo abertsiboak izan daitezkeenak, portaera frogarriak erabili genitzake saguen berezko erantzun emozionalari buruzko informazio gehiago lortzeko.

6. Erreferentziak

Ables, J. L. et al. (2023). Understanding the habenula: A major node in circuits regulating emotion and motivation. *Pharmacological Research*, 190, 106734.

Antunes, G. F. et al. (2023). Unravelling the Role of Habenula Subnuclei on Avoidance Response: Focus on Activation and Neuroinflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13).

Beurel, E. et al. (2020). The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. In *Neuro*, 107 (2)

Busquets-García, A. et al. (2017). CB1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology*, 43(1), 4-20.

Castillo P.E. et al. (2012): Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron*. 76: 70-81.

Diaz-Castro, B. et al. (2021). Molecular and functional properties of cortical astrocytes during peripherally induced neuroinflammation. *Cell Reports*, 36 (6).

Estes, M. L., eta McAllister, A. K. (2014). Alterations in immune cells and mediators in the brain: It's Not always neuroinflammation! *Brain Pathology*, 24(6).

Garland, E. F., et al. (2022). Microglia and Astrocyte Function and Communication: What Do We Know in Humans? *Frontiers In Neuroscience*, 16.

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

Groos, D., eta Helmchen, F. (2024). The lateral habenula: A hub for value-guided behavior. *Cell Reports*, 43(4), 113968.

Guillamón-Vivancos, T. et al. (2015). Astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*, 30(2), 119-129.

Guo, B. et al. (2023). Neuroinflammation mechanisms of neuromodulation therapies for anxiety and depression. In *Translational Psychiatry*, 13 (1)

Hashikawa, Y. et al. (2020). Transcriptional and Spatial Resolution of Cell Types in the Mammalian Habenula. *Neuron*, 106(5), 743-758.e5.

Loonen, A. J. M., eta Ivanova, S. A. (2022). Circuits Regulating Pleasure and Happiness - Focus on Potential Biomarkers for Circuitry including the Habenuloid Complex. In *Acta Neuropsychiatrica*.

Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2007). Lateral habenula as a source of negative reward signals in dopamine neurons. *Nature*, 447(7148), 1111-1115.

Namboodiri, V. M. K. et al. (2016). The habenula. *CB1 Current Biology*, 26(19), R873-R877.

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

O'Connor, J. C. et al. (2009). Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Molecular Psychiatry*, 14(5).

Pertwee, R.G. et al. (2010): International union of basic and clinical pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacology Review*, 62: 588-631.

Robledo-Menendez, A. et al. (2022). Cannabinoid control of hippocampal functions: the where matters. *The α FEBS Journal*, 289(8), 2162-2175.

Soria-Gómez, E. et al. (2015). Habenular CB1 Receptors Control the Expression of Aversive Memories. *Neuron*, 88(2), 306-313.

Valverde, O. eta Torrens, M. (2012). *CB1 receptor-deficient mice as a model for depression*. *Neuroscience*, 204, 193–206.

Woodburn, S. C. et al. (2021). The semantics of microglia activation: neuroinflammation, homeostasis, and stress. *Journal of Neuroinflammation*, 18 (1).