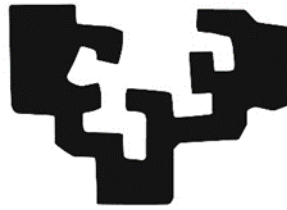


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Potentzial aldakorreko lehen motako
hartzaile vanilloidearen jatorrizko
ezabapenak saguaren bihurgune
horzduneko endokannabinoide
sisteman duen eragina**

Doktorego tesia

Jon Egaña Huguet

Leioan, 2020

Tesi honek Neurozientzien doktoretza- programako baldintzak betezen ditu.

Euskal Herriko Unibertsitatea

Egileak Euskal Herriko Unibertsitateko ikertzaile-aurrektore kontratu batekin burutu
zuen tesia

Lan hau burutzeko Eusko jaularitzaren beka (zenbakia: IT1230-19); MINECO/FEDER,
UE-ren beka (zenbakia: SAF2015-65034-R); Red de Trastornos Adictivos-ren beka
(Instituto de Salud Carlos III (ISC-III)) eta European Regional Development Funds-
European Union (ERDF-EU) erakundearen beka (zenbakia: RD16/0017/0012) jaso
dira.

Zuzendariak:

PEDRO ROLANDO GRANDES MORENO, MD, PhD

IZASKUN ELEZGARAI GABANTXO, PhD

Neurozientzien saila

Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea

Euskal Herriko Unibertsitatea (EHU/UPV) Leioa, 2020

Laborategian igaro ditudan bost urte hauetan, pertsona asko ezagutu ditut eta hauengandik ikasteko aukera izan dut, DANORI eskerrak eman nahi dizkizuet, horregatik norbait ahaztuz gero, parkatuko didazue. Bide honetan zientzia egiteaz gain beste hainbat gauza ikasi ditut, duela bost urteko gaztea aldatu duzuela pentsatu nahiko nuke.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores, el Dr. Pedro Grandes Moreno y la Dra. Izaskun Elezgarai Gabantxo, la oportunidad que me dieron de realizar la tesis doctoral y la confianza que depositaron en mí al apostar por este proyecto.

Pedro, quisiera trasmitirte mi más sincero agradecimiento porque sin tu ayuda y confianza jamás hubiera llegado hasta aquí. Me has dirigido siempre con rigor, marcándome el camino a seguir y centrándome cuando me desviaba, entusiasmado por las preguntas que van surgiendo cada vez que ese obtiene un nuevo resultado. Muchas gracias por todo.

Izas, zer esan, eskerrik asko den-denagatik. Zure eguneroko prestutasuna edozertan lagunduteko, edozein duda argitzeko, gauzak diren moduen zintzotasunez esateko eta oker nauenien bide zuzenera bueltatzeko, hauek denak asko asko miresten ditut. Askok gozatu ditut izan ditugun eztabaida zientifikoak, nahiz eta gehienetan oker egon nire paja mentalak direla eta. Zure laguntza eta konfiantza barik ez nintzateke hemen egongo, bihotzez nire eskerrik beroenak.

Bi zuzendariez gain, Nagore, mila esker denagatik. Elektrofisiologian (asko izan delako!) zein beste arlotan laguntzeko beti prest egoteagatik, humore onagatik (beti irribarretsu) eta nahiz eta nire zuzendaria ez izan arren, eskaini didazun denbora guztiagatik, plazer bat izan da. Eskerrik asko.

Itziar B y Svein, me habéis acompañado desde el principio en este camino, prácticamente lo empezamos a la vez y lo acabaremos igual y para mí siempre ha sido una suerte contar con compañeros, amigos, así en la poyata. Aitor, aunque menos a menudo, no recuerdo mal momento junto a ti, eskerrik asko lagun, es que sin duda no se puede trabajar más que tú, es imposible. vuestras ganas, maña e inteligencia son excepcionales y si seguís trabajando tal y como yo he visto, el límite lo pondréis vosotros.

Edgar, aunque tu incorporación al grupo haya sido más tardía, siento que tu llegada supuso aire fresco en mi perspectiva científica, en ser más crítico conmigo mismo. Tu ayuda para

Eskerrak

afrontar la estancia en Burdeos, tus consejos de la vida, y en general por todo, muchas gracias compadre.

Ya que no puedo dedicaros un párrafo a cada uno de vosotros a los que quisiera agradecer vuestra ayuda, sería otra tesis, permitirme que os agrupe. Como no, me gustaría dar las gracias por su ayuda para lo que fuera, a todos los compañeros que en algún momento han pasado por o que son permanentes en el grupo, como: Rafa (una firmilla?), Sonia (immuno vieja escuela), Almudena (que sería de los animales sin ti), Leire (cacho docente), Juan (beti prest behar denerako), Inma (imprescindible), Delbi (otra imprescindible), Elsa (gracias por preocuparte por nosotros, nuestra amaxu en el labo), Yolanda (trabajadora como ninguna), Ana, Sara (Referentes. mis madrileñas preferidas!!), Irantzu (jarraitzeko moduko eredua), Ianire (bizitzako eredu, betiereko borrokalaria), Naiara (pura fé), Itziar T (¡no dudes que acabarás!), Paula (motivación pura), Maria (brave, very, to achieve your goals in such conditions), Leire, Maitane, Amaia (mejor cambio generacional no se me ocurre, la vais a petar, animo neskak!). Todos habéis puesto vuestro granito de arena para que esta tesis pudiera llevarse a cabo, gracias de corazón.

También agradecer a los compañeros del departamento como la gente del grupo dirigido por el Dr. Carlos Matute o el Dr. José Vicente Lafuente ya que en más de una ocasión he precisado de vuestra ayuda y hemos compartido risas en más de una comida, eskerrik asko Andrea, Alazne, Mari Paz, Ana, Álvaro, Alejandro, Ane, Anita, Carolina, Saioa, Juan Carlos, Manu, Asier, Naiara.

Me gustaría agradecer el trabajo que se ha realizado en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Joan Sálles Alvira. Gracias tanto a Joan y Gontzal por vuestra cercanía y disponibilidad, siempre es un placer ¡y por el trabajo realizado claro! En especial me gustaría agradecer el esfuerzo y el empeño al doctorando Mikel Saumell, ya que tu gran trabajo le ha aportado un valor añadido a mi tesis dándome argumentos con los que explicar los cambios que observaba y reforzando lo que ya veía con nuevas evidencias. Te has implicado tanto o más que yo con el proyecto, lo sé, eta hori bene benetan eskertzen dizut lagun.

I would like to thank all the people that I met in the stay in Bordeaux for doing it unforgettable. This experience taught me lot of things, not just scientific stuff, and gave me the opportunity to know another way of doing, basically, everything! Gio, thanks for giving me the opportunity to join your lab, I really appreciate it. F6, thanks for everything, you are awesone! Ula, Paulita,

Eskerrak

Imane, Carlos, Ignacio, Fran, Marjorie, Bastien, Geoffrey, Yamuna, Roman, Nuria, Christina, Antonio, Jose, Luigi, Emma, Mari(Carmen), Christopher, Giangi, Zhe, Laurie, Arnau, Su, Astrich, Virginie, Mario, Dani, Ana and many others, you all deserve it, thanks a lot!

Azkenik, nire familia eta lagunei izandako pazientzia eta emandako laguntza guztia eskertu nahiko nieke, asko izan delako 5 urte hauetan zehar. Aita, Ama, Mikel, (Lur), la p*** NA, NRS, lagun danak, Andrea be, klaro, zeuek barik ez nintzatekeelako naizena izango eta ez nukeelako egiten dudana egingo, eta nahiz eta bide hau bere amaierara heldu hurrengoan ere nirekin batera egongo zariela badakidalako, beti ere nire eskerrik beroenak.

... Zure usain gozoa, lana,
amodioa, itsasoa,
nere baitan sartzen.
Atzo goizean entzun nuen
zure berbaren oihartzuna,
zure kantaren fereka,
bihotzean kilika
eta ohiartzunaren haunditasunean
murgilduz joan nintzen
jausika, hegaka...

B.L

Aurkibidea

Aurkibidea

Aurkibidea

1- Sarrera	1
1.1- Endokannabinoide sistema (ECS)	4
1.2- Kannabinoide hartzaileak	4
1.2.1- Kannabinoide hartzaile nagusiak.....	6
1.2.2- Beste kannabinoide hartzaileak	10
1.3- Endokannabinoideak (eCBak)	15
1.4- Hipokanpo egitura	17
1.4.1- Bihurgune horzduna eta ECS.....	19
1.5- ECS eta plastikotasun sinaptikoa	22
1.6- ECS eta epilepsia.....	26
2- Lan hipotesia.....	29
3- Helburuak	33
4- Material eta metodoak	37
4.1- Animaliak.....	39
4.2- Antigorputzak	39
4.2.1- Antigorputz primarioak (1. Taula)	40
4.2.2- Antigorputz sekundarioak (2. Taula)	41
4.3- Botikak	41
4.4- Prozedura immunohistokimikoak	43
4.4.1- Sagu-burmuin ehunaren kontserbazioa	43
4.4.2- Mikroskopia optikorako Avidina-Biotina peroxidasa metodoa	43
4.4.3- Erretxinan murgildu-aurreko urre bidezko immunomarkaketa simplea eta erretxinan murgildu-aurreko urre eta peroxidasa bidezko immunomarkaketa konbinatua mikroskopio elektronikorako	45
4.4.4- Azterketa semi-kuantitatiboa.....	49
4.5- Biokimika-metodoak	51
4.5.1- Hipokanpoko homogenatu osoen Western Blota.....	51
4.5.2- Hipokanpo-sinaptosomen Western Blota	52
4.5.3- Agonista bidez estimulatutako [³⁵ S] GTP _γ S binding saiakuntzak.....	53
4.6- <i>In vitro</i> elektrofisiologia	54
4.6.1- Ehun-xerren prestaketa	54
4.6.2- Zelulaz kanpoko jarduera elektrikoaren erregistroa	55
4.6.3- Datuen azterketa.....	55
4.7- Portaera probak	56

4.7.1- Objektu berrien ezagutza proba (NOR testa).....	56
4.7.2- Barnesen labirintoa: oroimen- eta estrategia-espazialen testa (BM).....	57
4.8- Konbultsio exzitotoxikoen azido kainikoaren (KA) eredia.....	58
4.8.1- Azido kainikoaren (KA) hipokanpo barruko administrazioa.....	58
4.8.2- Konbultsio larritasunaren ebaluaketa.....	59
5- Emaitzak.....	61
5.1- ECSko osagaien adierazpen-patroia WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoan.....	63
5.1.1- CB ₁ R-ren eta eCB-entzimen immunohistokimika WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoan.....	63
5.1.2- CB ₁ R-ren eta eCB-entzimen adierazpena WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoko homogenatu osoetan eta sinaptosometan.....	64
5.1.3- CP 55.940 bidez estimulatutako [³⁵ S] GTP _γ S binding entseguak WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpo-sinaptosometan.....	67
5.1.4- CB ₁ R-rekin erlazionatutako zelula barneko proteinen adierazpena WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpo-sinaptosometan.....	68
5.2- CB ₁ R-ren kokapen zelular eta azpizelularra TRPV1-KO saguen hipokanpoan. Bereizmen handiko mikroskopia elektronikorako immunizitokimika.....	71
5.2.1- CB ₁ R-ren banaketa MCFLko axoi bukaera presinaptikoetan.....	72
5.2.2- CB ₁ R-ren banaketa azpizelularra MCFLko mitokondrietan.....	77
5.2.3- CB ₁ R-ren banaketa MCFLko astrozitoetan.....	79
5.2.4- CB ₁ R-ren partikulen banaketa MCFLan.....	79
5.2.5- CB ₁ R-ren banaketa MLko kanpoko 2/3etako axoi bukaera presinaptikoetan.....	80
5.2.6- CB ₁ R MLko kanpoko 2/3etako mitokondrietan.....	85
5.2.7- CB ₁ R MLko kanpoko 2/3etako astrozitoetan.....	87
5.2.8- CB ₁ R-ren partikulen banaketa MLko kanpoko 2/3etan.....	88
5.3- Plastikotasun sinaptikoa TRPV1-KO saguen DGMLan.....	89
5.3.1- Plastikotasun sinaptikoa MCFLan.....	90
5.3.2- Plastikotasun sinaptikoa PPan.....	91
5.3.3- Transmisio sinaptikoa MPPan.....	101
5.4- Hipokanpoarekin erlazionatutako portaerak TRPV1-KO saguetan.....	102
5.4.1- Oroimenaren azterketa.....	102
5.5- TRPV1-KOen ebaluazioa baldintza patologikoetan: kainato bidezko konbultsio eszitotoxikoen eredia.....	104
6- Eztabaida.....	107
6.1- TRPV1-KOen hipokanpoan ECS eraldatuta dago.....	109

6.2- Plastikotasun sinaptikoaren aldaketak TRPV1-KOetan.	116
6.2.1- CB₁R MPP-GC sinapsietako LTPn parte hartzen du TRPV1-KOn.	119
6.3- Oroimen azterketa TRPV1-KOetan.	123
6.4- TRPV1-KOek konbultsio arinagoak dituzte.	125
7- Ondorioak	127
8- Bibliografia	131

Laburdurak

Laburdurak

Laburdurak

- **AA:** Azido arakidonikoa
- **ABC:** Avidina-biotina komplexua
- **ABHD6:** α/β -Hydrolasa domeinua daukan 6. entzima
- **AC:** Adenilil ziklasa
- **aCSF:** Garun-bizkarmuineko isurgarri artifiziala
- **AEA:** Arachidonoil-etanolamina edo anandamida
- **AMG:** Amigdala
- **AMPA:** Azido D-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionikoa
- **ANOVA:** Bariantzen analisisa
- **AP:** Aurre-atzeko
- **ATP:** Adenosine-trifosfatoa

- **BM:** Barnes-en labirintoa
- **BNST:** Bukaera ildaskaren nukleoa
- **BSA:** Behi serum albumina

- **CA:** Cornu ammonis edo Ammon-en adarra
- **CA1:** Cornu ammonis-eko 1. eremua
- **CA2:** Cornu ammonis-eko 2. eremua
- **CA3:** Cornu ammonis-eko 3 eremua
- **cAMP:** Adenosina monofosfato ziklikoa
- **Cb:** Garuntxoko kortexa
- **CB₁R:** Lehen motako kannabinoide hartzaila
- **CB₁R-eLTD:** CB₁R-ren bidezko epe luzeko depresio kitzikatzailea
- **CB₂R:** Bigarren motako hartzaila kannabinoidea
- **CBD:** Kannabidiola
- **CCK:** Kolezistokinina
- **CPu:** Caudate putamena
- **CPZ:** Capsazepina
- **CRE:** cAMPren erantzun elementua
- **CRIP1a:** Kannabinoide hartzailarekin elkareragiten duen 1a porteina
- **Ctx:** Kortexa

- **DAB:** Diaminobenzidina
- **DAG:** Diazilglicerola
- **DAGL:** Diazilglicerol lipasa
- **DG:** Bihurgune horzduna
- **DGML:** Bihurgune horzduneko molekula-geruza
- **DMSO:** Dimetil sulfoxidoa
- **DRG:** Bizkarraldeko sustrai gongoiak
- **DRN:** Bizkarraldeko errafe nukleoa
- **DSE:** Depolarizazioak eragindako kitzikpenaren murriztea
- **DSI:** Depolarizazioak eragindako inhbibizioaren murriztea
- **DV:** bizkarraldeko-sabelaldeko

- **EC:** Kortex entorrinala
- **eCB:** Endokannabinoidea
- **ECS:** Endokannabinoide sistema
- **eCB-LTD:** Endokannabinoideak bideratutako epe luzeko depresioa
- **ECL:** Elektrokimioluminiszentzia
- **eLTD:** Epe luzeko kitzikapenaren murriztea
- **EM:** Mikroskopia elektronikoa
- **ER:** Erretikulu endoplasmatikoa

Laburdurak

- **ERK:** Zelula-kanpoko seinaleen erregulazio kinasa
- **EtOH:** Etanola

- **FAAH:** Gantz azidoen amida hidrolasa
- **fEPSP:** Neurona-eremu bateko potentzial postsinaptiko kitzikagarrien erantzunak
- **FIJI:** Fiji is just IMAGE J

- **GABA:** Azido gamma-aminobutirikoa
- **GFAP:** Gliako zuntz proteina azidoa
- **GCL:** Zelula-pikorren geruza
- **GP:** Nukleo zurbila
- **GPCRs:** G proteinetara akoplaturiko hartzaila
- **GPR55:** G proteinetara akoplaturiko 55. hartzaila

- **HRP:** Horseradish-eri kojugatutako peroxidasa
- **HSP70:** Talka termikoko 70 proteina

- **ICRS:** Hartzaille kannabinoide ionotropikoak
- **iLTD:** Inhibizioaren epe luzeko depresioa
- **IML:** Barneko molekula-geruza

- **KA:** Azido kainikoa edo kainatoa
- **KO:** Knockout sagua
- **LC:** Locus coeruleus
- **LFS:** Frekuaentzia baxuko estimulazioa
- **LM:** Argi mirkoscopia edo mikroskopia optikoa
- **LPP:** Alboko bide-zulatzaila
- **LTD:** Epe luzeko depresioa
- **LTP:** Epe luzeko indartzea

- **MAGL:** Monozilglicerol lipasa
- **MCFL:** Goroldio-zelula axoien amaiera-eremua
- **mGluR:** Hartzaille glutamatergiko metabotropikoa
- **mGluR1:** 1. taldeko hartzaille glutamatergiko metabotropikoa
- **mGluR5:** 5. taldeko hartzaille glutamatergiko metabotropikoa
- **ML:** Molekula-geruza
- ***ML:** Erdialde-alboko ardatza kirurgia estereotaxikoan
- **MML:** Erdiko molekula-geruza
- **MPP:** Erdiko bide-zulatzaila
- **mRNA:** ARN mezularia

- **NAc:** Accumbens nukleoa
- **NADA:** N-arakidonoil dopamina
- **NAPE:** N-azilfosfatidil etanolamina
- **NAPE-PLD:** N-azil fosfatidil etanolamina hidrolizatze D fosfolipasa
- **NMDAR:** N-metil-D-aspartato hartzaila
- **NORT:** Objektu berrien ezagutza proba
- **NSP:** Nerbio sistema periferikoa
- **NSZ:** Nerbio sistema zentrala
- **NTS:** Traktu bakartiaren nukleoa

- **OB:** Usaimen-erraboila

- **OLM:** Oriens-lacunosum-moleculare geruza
- **OML:** Kanpoko molekula-gerua
- **OT:** usaimen-tuberkulua

- **PAG:** Ubide inguruko gai grisa
- **PB:** Fosfato disoluzioa
- **PBS:** Gatz fosfato disoluzioa
- **PKA:** A motako protein kinasa
- **PLC:** C fosfolipasa
- **PP:** Bide zulatzailea
- **PPAR:** Peroxisomen proliferazio bidez aktibaturiko hartzailea
- **PPR:** Pulsu-parekatuen ratioa
- **PTX:** Pikrotoxina
- **PTZ:** Pentylenetetrazola
- **PVDF:** Polivinilidene difluoridoa
- **RS:** Racineren eskala
- **RT:** Giro temeperatura
- **RTX:** Resiniferatoxina

- **SC:** Schaffer-en alboko bidea
- **SDS:** Sodio dodecil sulfatoa
- **SE:** Status epilepticus-a
- **SNC:** Gai beltza pars compacta
- **SNr:** Gai beltza pars reticulata
- **S.E.M:** Errore estandarraren media

- **TA:** Bide temporoammonikoa
- **TBS:** Tris-hidrogeno Klorido gatz disoluzioa
- **TBS-T:** Tris-hidrogeno Klorido gatz disoluzioa Twenn-20rekin
- **TF:** Objektu ezaguna esploratzen emandako denbora
- **THC:** Delta-9-tetrahidrokannabinol
- **tLTP:** "spike-timing" bidezko epe luzeko indarzte
- **TN:** Objektu berria esploratzen emandako denbora
- **TRP:** Potentzial aldakorreko kanala
- **TRPA:** Potentzial aldakorreko ankirina kanala
- **TRPC:** Potentzial aldakorreko kanal canonikoa
- **TRPP:** Potentzial aldakorreko polizistina kanala
- **TRPML:** Potentzial aldakorreko mukolipina kanala
- **TRPM:** Potentzial aldakorreko melastatina kanala
- **TRPV:** Potentzial aldakorreko kanal vanilloidea
- **TRPV1:** Potentzial aldakorreko lehen motako kanal vanilloidea
- **TRPV1-KO:** TRPV1 knockout sagua

- **VTA:** Sabelaldeko tegmentu eremua

- **WT:** Kumaldi bereko mutaziorik gabeko kideak
- **WB:** Western blota

- **2-AG:** 2-arakidonoil glizerola
- **[³⁵S] GTPγS:** [³⁵S] guanosine-5*-O-(3-thiotriphosphatoa)

Sendotasun genetikoa, organismo bizi batek, alterazio genetikoak izan baditu ere, bere bideragarritasunari eusteko duen gaitasunari deritzo (El-Brolosy eta Stainier, 2017). Geneen aldakuntza eboluzioan gertatzen den ohiko prozesua da, izan ere, organismo bizidunen artean hondo-genetikoan edo ingurumen baldintzetan ezberdintasunak gertatu arren, hauek antzeko garapena ziurtatzeko, konpentsazio sistemak behar dituzte (Mather, 1953; Waddington, 1959).

Kontzeptu hori, neurri batean, gene erredundanteetan oinarritzen da, hau da, gene batek funtzio eta banaketa baliokideak dituen beste gene baten gabezia konpentsatu dezakeela. Prozesu hori, hainbat organismo bizidunen mutante ezberdinetan deskribatu izan da (Cohen et al., 1987; Hoffman, 1991; Tautz, 1992; Cadigan et al., 1994; Gonzalez-Gaitan et al., 1994; Wang et al., 1996; Von Koch et al., 1997; Nedvetzki et al., 2004; Santamaria et al., 2007). Nolanahi ere, gene baten banakako konpentsazioa ez da genomari sendotasuna ematen dion gauza bakarra, beste sendotasun modu bat zirkuitu metaboliko, transkripzional edo seinaleztapen bide gisako zelula-sareetan ematen dena da. Sare edo zirkuitu batean gene jakin baten funtzioa hondatzeak, sare bereko parte diren beste gene batzuen adierazpenean eragin dezakeela frogatu da (Barabasi eta Oltvai, 2004; Davidson eta Levin, 2005).

Ingeniaritza genetikoan, berriki egindako aurrerapenei esker organismo bizi batean geneak eraldatzeko tresna genetiko sorta berri bat sortu da. Abantaila horien artean, alderantzizko erreminta genetikoek aurki ditzakegu hain zuzen, eta hauek sistema mutante ezberdinetan knockouten eta knockdownen arteko diferentzia fenotipikoak azaleratu dituzte. Adibidez, saguetan (De Souza et al., 2006; Young et al., 2009; McJunkin et al., 2011; Daude et al., 2012), *Drosophila* eulietan (Yamamoto, 2014), zebra-arrainetan (Law eta Sargent, 2014) eta giza zelula-lerroetan (Karakas et al., 2007; Evers et al., 2016; Morgens et al., 2016), besteak beste.

Aldaketa horiek edozein mutantetan gerta daitezkeela kontuan izanik, azterlan honetan TRPV1 hartzailearen jatorrizko ezabapen genetikoa duten saguetan, bihurgune horzdunekko endokannabinoiden sistemaren osagaietan sor litezkeen aldaketak aztertzea erabaki genuen.

1.1- Endokannabinoide sistema (ECS)

Cannabis sativa, marihuana izenez ezagunagoa, historian zehar, denbora luzez praktika medikorako erabilia izan da. Bere erabilera medikoari buruzko lehen aipamenak antzinako Txinakoak dira, duela 5.000 urte ingurukoak, non konbultsioak eta mina arintzeko belar estraktuak erabiltzen ziren (Mechoulan, 1986). Hala ere, 60. hamarkadaren hasierara arte ez zen gaiari buruz asko ikertu, Delta-9-tetrahidrocannabinolaren (THC) aurkikuntza eman zen arte, landarean identifikatutako 70 fitokannabinoide baino gehiagoren artean, osagai psikoaktibo nagusia dena (Gaoni eta Mechoulan, 1964; Kunos et al., 2006). Aurkikuntza erabakigarri honi esker, fitokannabinoideen antzeko edota bestelako egiturak zituzten kannabinoide sintetikoak garatu ziren, eta ondorioz, 1. motako kannabinoide hartzailea (CB₁R) identifikatu eta klonatu zen (Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990). Horrez gain, beste hartzaile kannabinoide bat identifikatu eta klonatu zen, gerora 2. motako kanabinoide hartzaile deitu zena (CB₂R) (Munro et al., 1993).

ECS duela hamarkada asko aurkitu bazen ere eta garunean dagoen neurotransmisio sistema nagusietako bat izanik, harritzekoa da 1990eko hamarkadaren hasierara arte sakonean ikertu gabe egon izana. Hori gertatu zen, alde batetik, landare-kannabinoideei buruzko ikerketarik ez zegoelako, batez ere legeek zailduta, eta, bestetik, kannabinoideek potentzial terapeutikoa zutela jakina bazen ere, haien ondorio psikoaktiboek, neurri handi batean, praktika klinikorako mugatzen zutelako (Zou eta Kumar, 2018). Aurrerago, ECSk gorputzean eta garunean zuen garrantzi fisiologikoaz jabetu ondoren, honen metabolismoa, biokimika eta farmakologia sakon ikertzen hasi ziren (Pertwee et al., 2010). Kannabinoide hartzaile moduan CB₁R eta CB₂R onartzen badira ere, beste hartzaile batzuk ere kannabinoide hartzaile gisa funtzionatzen dutela ikusi da. Horien artean G proteinetara lotutako beste hartzaile batzuk (GPCR), ioi-kanalak edota hartzaile nuklearrak daude. Oro har esan daiteke, ECSn barne kannabinoide hartzaileek; horiekin lotzen diren konposatu endogenoek, endokannabinoide (eCB) izenez ezagunak; eta endokannabinoideen biosintesi eta degradazioaz arduratzen diren entzimak daudela (Pertwee et al., 2010).

1.2- Kannabinoide hartzaileak

Bere izaera lipofilikoa dela eta, hasiera batean kannabinoideek euren efektu biologikoak mintz zelularra modu ez espezifikoa zeharkatuz gauzatzen zituztela pentsatu zen. Hala ere, THC

molekularen aurkikuntzarekin eta kimikoki sintetizatutako kannabinoideen garapenaren ondoren, burmuineko eCBen lotura guneen identifikazio eta karakterizazio farmakologikoa eman zen. Horrela, kannabinoideen ustezko hartzaille baten existentzia eta honek GPCR batekin zuen analogia deskribatu ziren (Gaoni eta Mechoulam, 1964; Devane et al., 1988; Matsuda et al., 1990; Kunos et al., 2006; Pertwee, 2006). Funtzionalki adierazi diren bi hartzaille kannabinoide nagusiak (Matsuda, 1997), CB₁Rk eta CB₂Rk, GPCR familiakoak dira, eta nagusiki Gi edo Go motako G-proteinetara lotuta daude (Howlet et al., 2002). Horien aktibazioak, adenilil ziklasa eta boltai-menpeko kaltzio kanalen inhibizioa eragiten du eta aldi berean, mitogenoek aktibatutako zenbait protein-kinasa aktibatzen dituzte, kokatuta dauden zelula motaren arabera zenbait bariazio direla medio. Hartzaille horiek aktibatzeak hainbat ondorio eragiten ditu fisiologia zelularrean, besteak beste, funtzio sinaptikoaren modulazioan, geneen transkripzioan eta zelulen mugigarritasunean ere (Howlet et al., 2002; Lu eta Mackie, 2016).

Hala ere, azken urteetan, zenbait frogek adierazi dute kannabinoide hartzailleak bideratutako maila zentralera zein periferikora ekintza asko, ezin direla CB₁R-ren eta CB₂R-ren aktibazioarekin soilik azaldu; izan ere, zenbait ekintza kanabimimetiko garrantzitsu aurkitu dira hartzaille horientzat generik ez dituzten sistema biologikoetan, hala nola, lerro zelular espezifikoetan edo sagu transgenikoetan (De Petrocellis, 2017). Adibidez, periferian kannabinoideek eragindako antihiperalgisia CB₁R / CB₂R hartzailleekiko knockout (KO) saguetan eraginkorra izaten jarraitzen du (Zimmer et al., 1999; Akopian et al., 2008), edo CB₁R-ren rimonabant antagonistaren efektu neurobabeslea garuneko iskemia eredu batean, non GPCR motako hartzailleekiko independentea dela frogatu den (Pegorini et al., 2006).

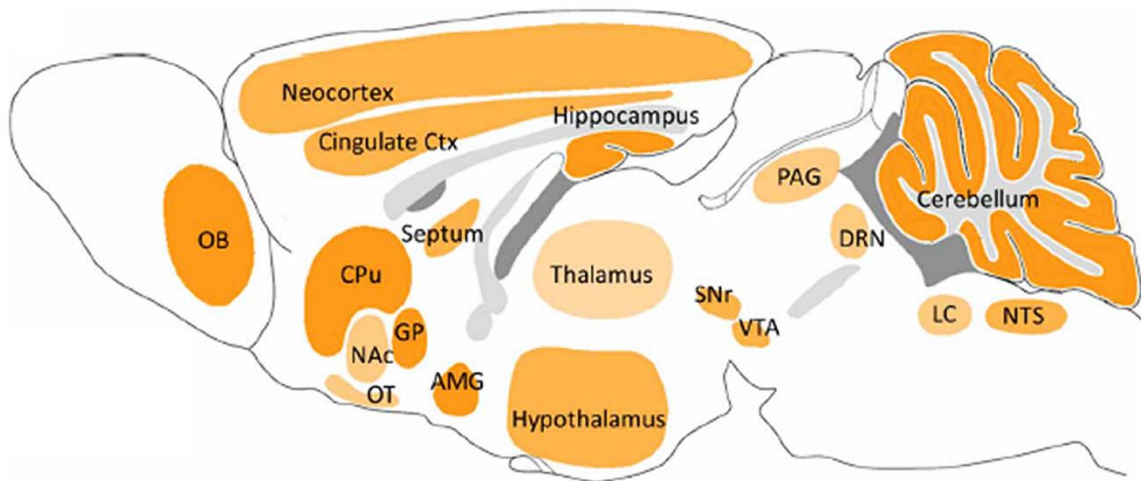
GPCRen prozesu klasikoaren bidez azaldu ezin diren ekintzen ondorioz, hartzaille kannabinoideen bigarren familia bat deskribatu zen, hartzaille kannabinoide ionotropikoak deritzenak (Akopian et al., 2009). Hartzaille horien artean, potentzial aldakorreko kanalen familiako kideek (TRP kanalak) funtsezko zeregina betetzen dute. Ioi kanaletara lotutako hartzaille hauek familia zabal bat osatzen dute, eta gradiente elektrokimikoaren arabera mintzean zeharreko katioien fluxua bideratzen dute; honen ondorioz, kaltzioaren eta sodioaren zelula barneko kontzentrazioa areagotzea eragiten dute (Montell, 2005).

1.2.1- Kannabinoide hartzaile nagusiak

Kannabinoide hartzaile hauek identifikatzen lehenak izan ziren, CB₁R, CB₂R, GPCR55 eta peroxisomek aktibatutako hartzaileak (PPAR) barne sartzen dira Matsuda, 1997; Sun eta Bennett, 2007; Ryberg et al., 2007). Hala ere, garunean, kannabinoideek euren ekintza ezagunak CB₁R-ren bidez gauzatzen dituzte batez ere.

1.2.1.1- Lehen motako kannabinoide hartzailea (CB₁R)

CB₁R burmuinean aurkitu zuten lehen aldiz. Geroago, autorradiografia, *in situ* hibridazioa eta immunohistokimikako teknikak erabiliz, garuneko GPCR familiako hartzaileen artean hedatuena zela frogatu zen (Mackie, 2005; Kano et al., 2009). Jakina da burmuinean, hartzailea hainbat eskualdetan dagoela, horien artean usaimen erraboilak, hipokanpoak, oinaldeko nukleoak eta garuntxoak CB₁R mailarik altuenak adierazten dituzte. Gainera, CB₁R-ren espresio moderatuak burmuineko kortexean, septumean, amigdalari, hipotalamoan eta bizkar muineko bizkarraldeko adarretan aurkitzen dira. Talamoko eta bizkar muineko sabelaldeko adarrek aldiz, hartzailearen espresio maila oso baxuak adierazten dituzte (Mackie, 2005) (1. irudia).



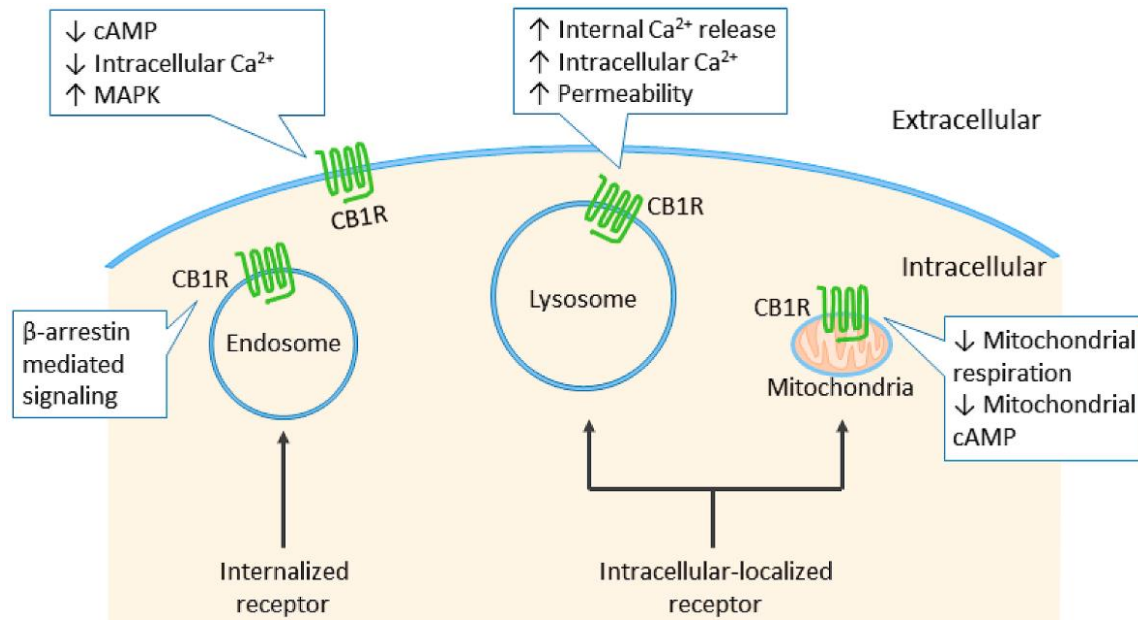
1. irudia: CB₁R adierazten duten eskualde nagusien irudikapen eskematikoa. AMG, amigdala; CPU, nukleo buztandun eta putamena; Ctx, kortexa; DRN, bizkarraldeko errafe-nukleoa; GP, nukleo zurbila; LC, locus coeruleus; NAc, accumbens nukleoa; NTS, traktu bakartiaren nukleoa; OB, usaimen-erraboi; OT, usaimen-tuberkulua; PAG, ubide inguruko gai grisa; SNr, gai beltzaren erretikulu-zatia ; VTA, sabelaldeko tegmentu eremua. Flores eta beste batzuen (2013) lanetik eraldatua.

Ikerketa ugarian, bukaera sinaptikoetan CB₁R-ren kontzentrazio altuak deskribatu dira (Tsou et al., 1998; Katona et al., 1999). Hori horrela izanik, eta eCBen sintesia alde postsinaptikoan gertatzen dela kontutan hartuta (Pertwee et al., 2010), eCBek bideratzen duten seinaleztapena atzerakaria dela iradoki zen. Honekin batera, jakina CB₁R-ren aktibazioak neurotransmisoreak bukaera sinaptikoetatik askatzea eragozten duela, bai GABA, glutamatoa edota edozein neurotransmisore motarena. Horrek CB₁R-ri neurotransmisioa erregulatzeko gaitasuna ematen dio (Katona et al., 1999; Gerdeman et al., 2001). Mekanismo hori gehiegizko kitzikapenaren aurkako jarduera neurobabesle gisa proposatu da. Hain zuzen ere, prozesu hori gaixotasun neurologiko askoren oinarrian dago, epilepsia eta neuroendekapenezko gaixotasunak kasu (Marsicano et al., 2003; Katona eta Freund, 2008; Chiarlone et al., 2014). Esan behar da gune postsinaptikoetan hartzailearen balizko existentzia ez dela erabat baztertzen, neokortexeko neuronetan egindako zenbait azterketa funtzionalek eCBen autoinhibizioa frogatu baitute (Marinelli et al., 2008; Marinelli et al., 2009; Castillo et al., 2012).

CB₁R-ren mintz plasmatikoko kokapen ezagunaz gain (GPCRen ohiko banaketa-patroia), zenbait ikerketek CB₁R-ren zelula-barneko kokapena deskribatu dute hainbat zelula motetan, horien artean transfektatutako zelula ez-neuronaletan, bereizi gabeko zelula neuronaletan eta hazkuntzan dauden hipokanpoko zeluletan (Rozenfeld, 2011). Etengabeko ikerketek ikusi zuten, zelula-barneko konpartimentuetan kokatutako CB₁Rk, ustez, azpipopulazio desberdin asko osatzen dituzte. Hauetako proportzio bat mintz plasmatikokoaren hartzaileen etengabeko barneratze dator (Leterrier et al., 2004). Gainera, berez edo agonistek eragindako barneratze horren ondorioz zelula barnean kokatzen diren CB₁Rez gain, hainbat probek zelulen barnean kokatuta dagoen CB₁R-ren multzo ezberdin bat iradokitzen dute, funtzio ezberdina duena. Hartzaile horiek azidoz betetako endo/lisosometan daude, eta ez diote zelularen gainazalean adierazitako azpipopulazioari eragiten (Rozenfeld eta Devi, 2008; Grimsey et al., 2010). Gainera, egiaztatu da hartzaile horiek zelulen barneko agonistek aktibatu ondoren, areagotu egiten dutela erretikulu endoplasmatikokoaren eta lisosomen kaltzio-askapena (Brailoiu et al., 2011).

CB₁R-ren beste azpipopulazioetako bat mitokondriak bezalako organuluetan dago. Aurretiaz egindako ikerketetan, THCak mitokondrietara lotutako entzima-jardueran duen eraginaren berri eman da, eta hipokanpoko neuronetako mitokondrietan bai hartzailearen presentzia zein honen

partaidetza zuzena arnasketa zelularrean egiaztatu dira (Benard et al., 2012; Hebert-Chatelain et al., 2014a, 2014b).



2. irudia: CB₁R-ren zelula-barneko kokapena. CB₁R zelula mintzean dago, eta aktibatzerakoan adenosin monofosfato ziklikoaren (cAMP) eraketa eta kaltzio-sarrera inhibitzen ditu. Zelula barneko CB₁R batzuk ez dira mintz plasmatikora lekualdatzen. Aldiz, mintz plasmatikoko kokatutako homologoen bestelako propietate farmakologikoak dituen azpipopulazioa osatzen dute. Lisosometan aurkitutako CB₁R-ek zelula barneko kaltzio-kontzentrazioak handitu ditzakete kaltzioaren barne-erreserbak askatuz eta lisosomen iragazkortasuna areagotuz. CB₁R mitokondrialek arnasketa zelular mitokondrial eta cAMP ekoizpena inhibitzen dituzte, horrela, zelularen energia metabolismoa erregulatuz. Zou eta Kumar (2018) lanetik hartua.

Neuronez gain, eta neurri txikiagoan bada ere, CB₁R glia zeluletan ere adierazten da, hala nola astrozitoetan, oligodendroitoetan edota mikroglia, non transmisio sinaptikoan eragiteko gai dela frogatu den (Navarrete eta Araque 2008; 2010; Stela, 2009; 2010; Castillo et al., 2012; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017). Gainera, astrozitoen mitokondrietan ere deskribatu da bere presentzia, eta oreka energetikoan duten papera kontutan hartuz, plastikotasun sinaptikoan ere eragin dezaketela iradokitzen da (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018; Bonilla-Del Río et al., 2019).

Hartaizleak gorputzean zehar duen banaketa zabala kontuan hartuta, zentzuzkoa da pentsatzea funtzio fisiologikoen espektro zabalean eragin dezakeela (Pacher et al., 2006; Kano et al., 2009; Macarrone et al., 2015; Di Marzo et al., 2015). Egia esan, ECSk nerbio sistema zentraleko (NSZ) neuronek bideratutako hainbat prozesutan eta asalduretan esku hartzen du, hala nola, gosea, ikaskuntza eta oroimena, antsietatea, depresioa, eskizofrenia, garun-hodietako istripuak, esklerosi

anizkoitza, neuroendekapena, epilepsia eta adikzioa (Iversen, 2003; Pacher et al., 2006; Kano et al., 2009; Di Marzo et al., 2015).

CB₁R-ren zelula barneko seinaleztapenari dagokionez, hauek nagusiki, G α i/o proteinetara akoplatuta daudela frogatu da. Hartzaille horiek aktibatzeak adenilziklasaren (AC)/cAMP/pKa/ERK seinaleztapena inhibitzen du (Jung et al., 1997; Demuth eta Molleman, 2006). Horrez gain, frogatu da CB₁Rk G α s proteinak aktibatzeo gai dela, ondorioz cAMP ekoizpena areagotuz (McAllister eta Glass, 2002) eta astrozitoen eta zelula endotelialen barne-erreserben kaltzio-askapena estimulatzeko gai dela ere (Fimiani et al., 1999). Litekeena da batetik C fosfolipasak eta bestetik CB₁Rk eta Gq/11 proteinen arteko akoplamentuak eragindako seinaleztapen-jauziek hau erregulatzea (Lauckner et al., 2005).

G-proteinen bidezko CB₁R-ren seinaleztapenak abiatutako bideak luze ikertu diren bitartean, ustezko CB₁R-ri lotzen diren beste proteina batzuk, egitura edo erregulatu gisa sailkatutako proteinak, CB₁R-ren jardueraren modulatuak potentzial moduan identifikatu dira (Smith et al., 2010). Kannabinoide hartzaillearekin elkarreragiten duen 1a proteinari dagokionez (CRIP1a), Deborah Lewisen laborategiak identifikatu zuela aipatzekoa da, hartzaillearen C-terminal distaleko aminoazidoak ezabatzerakoan. Proteina horrek goiko idun gongoileko neuronetan, boltaimenpeko kaltzio kanalen bidez CB₁Rk eragindako inhibizioaren areagotzea eragin zuen. Ondorioz, aurkikuntza horrek, C-terminal urruneko atalera lotzeak hartzaillearengan eragin inhibitzailea izan dezakeela iradoki zen (Nie eta Lewis, 2001a; 2001b). C-terminala proteina erregulatu bati lotzen zitzaiola behatuta, Lewisen laborategiak, CRIP1a proteina identifikatu zuen (Niehaus et al., 2007).

1.2.1.2- Bigarren motako hartzaille kannabinoidea (CB₂R)

Lehen hartzaillea aurkitu eta urte gutxira, ugaztunen barean kokaturiko makrofagoetan kannabinoideekin elkarreragiten zuen beste GPCR bat identifikatu zen, CB₂R (Munro et al., 1993). Ondorengo azterketek agerian utzi zuten hartzaille horren adierazpen nagusia zelula immunitarioetan gertatzen zela eta tarteko adierazpena erakusten zuela beste ehun periferiko batzuetan, hala nola, bihotz-hodietako sisteman, urdail-hesteetako traktuan, giblean, ehun adiposoan, hezurretan edota ugalketa-sisteman. Aitzitik, ez zen ikusi CB₂R NSZn, eta, beraz, "hartzaille kannabinoide periferiko" gisa izendatu zen (Howlet et al., 2002). Hala ere, baiezta

hori zalantzan jarri da, izan ere, azken urteotan ikerketa ugari ageri dira CB₂R-ren adierazpena garunean ere badela erakusten dutenak, nahiz eta CB₁R-rekin edo sistema immunologikoan dagoenarekin alderatuta neurri askoz txikiagoan izan (Gong et al., 2006). NSZn dagoen CB₂R-ren kopurua mugatua bada ere nerbio-sistema periferikoarekin (NSP) konparatuta, prozesu neurologikoetan CB₂Rk funtzio aktiboa betetzen duela ziurra da, besteak beste, nozizepzioan, droga-mendekotasunean edota neuroinflamazioan (Atwood eta Mackie, 2010; Dhopeswarkar eta Mackie, 2014). Gainera, berriki egindako ikerketek erakutsi dute eremu bekoki aurreko piramide-neurona kortikaletan CB₂R-ren zelula-barneko presentzia dagoela, non kaltzio kloruro kanalen modulazioaren bitartez, kitzikagarritasun neuronala erregulatzeko gai dela frogatu den (Den Boon et al., 2012).

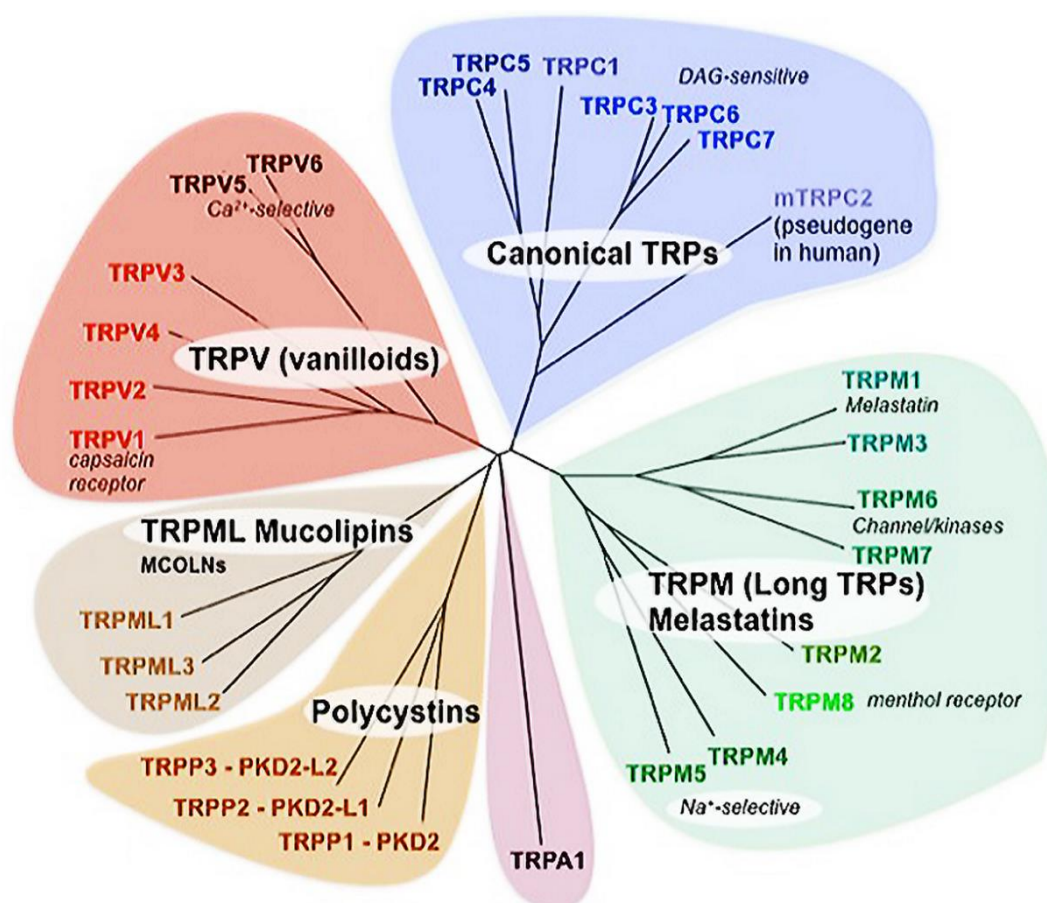
1.2.2- Beste kannabinoide hartzaileak

Azken hamarkadan, ugaztunen TRP kanaletako batzuk ECSri lotu zaizkio. Proba farmakologikoek iradoki dute kannabinoideak eta eCBak hartzaile kannabinoide metabotropiko klasikoez gain beste hartzaile batzuei ere lotzen zaizkiela (Morales et al., 2017a; Morales eta Reggio, 2017b; 2018).

TRP kanalen superfamiliak (3. irudia) sei azpifamilia barne hartzen ditu: kanonikoa (TRPC), vanilloidea (TRPV), polizistinikoa (TRPP), mucolipinikoa (TRPML), ankyrinikoa (TRPA) eta melastatinikoa (TRPM) (Winter et al., 2013). Familia hori 28 kanalez osatuta dagoen arren, horietatik sei baino ez dira, beste estimulu fisiko eta kimiko batzuez gain, jatorri begetaleko, jatorri endogenoko edo sintetikoko kannabinoideengandik aktiba daitezkeenak. Kanal horiek (TRPV1-TRPV4, TRPA1 eta TRPM8) hartzaile kannabinoide ionotropiko moduan ezagutzen dira (Muller et al., 2019). TRP kanalak aktibatzekeo gai diren konposatu ez kannabinoide exogenoen artean, kapsaizina eta alizina bezalako konposatu naturalak daude, piperretatik eta baratxuritik datozenak, hurrenez hurren.

Kanal hauekin elkarreragiten duten kannabinoideen artean, anandamida (AEA) eCBa izan zen deskribatu zen TRPV1ren lehen agonista endogenoa, AEAREN ekintza basodilatatzailea ikertzen zen lan baten identifikatua (Zygmunt et al., 1999). N-aracidonil-dopamina (NADA) eta AEA TRPM8ren antagonista endogeno bezala ere identifikatu ziren (De Petrocellis et al., 2007). THCak indar handiagoz aktibatzen du TRPV2; gainera, TRPV3, TRPV4, TRPA1 eta TRPM8 neurritz modulutzen

ditu. Aldiz, ez dirudi TRPV1 modulatu duenik (De Petrocellis et al., 2011). Beste fitokannabinoido bat den Kanabidiolak (CBD) berriz, propietate onuragarri asko dituela frogatu bada ere, hauen artean hanturaren aurkako ekintza adibidez, afinitate txikia agertzen du CB_1R eta CB_2R ekin, baina TRPV1 eta TRPM8 kanaletan potentzia handiz jarduteko gai dela jakinarazi da (De Petrocellis et al., 2011). Kannabinoide sintetikoek ere hartzaile horien bidez jarduteko gaitasuna dute; adibidez, CB_1R -ren agonista den WIN 55,212-2 botikak, efektu analgesikoak eragiten ditu TRPV1 eta TRPA1 desensibilizatzerakoan (Ruparel et al., 2011).



3. irudia: Ugaztunen TRP kanalen zuhaitz genealogikoa. Clapham (2003) lanetik hartua.

1.2.2.1- TRPV1

TRPV1 hartzailea, kapsaizina-hartzaile izenez ere ezaguna da, konposatu honekin duen kidetasunagatik. NSPko neurona nozizeptibo mota nagusiek adierazitako katio-kanal polimodal ez-selektibo bat da, eta berebiziko garrantzia du estimulu kaltegarriak detektatzeko (Vay et al., 2012; Caterina, 2014). Kanal ionikoak, TRPV1 barne, mintz plasmaticoan kokatuta daude, eta mintzaren

kanpoaldetik barrualderako pasartea osatzen dute (De Petrocellis et al., 2017). Aktibatu ondoren, TRPV1ren mintzean zeharreko poroa ireki egiten da eta horrela, katioiak mintzaren alde batetik bestera igarotzea ahalbidetzen du. TRPV1 kanala estimulu endogeno zein exogenoen bidez aktiba daiteke, horien artean beroa, pH baxua, N-azil amidak, azido arakidonikoaren deribatuak (AA), vanilloideak, kapsaizina, protoiak eta, jakina, kannabinoideak daude (De Petrocellis et al., 2017), baina litekeena da NSZn, baldintza fisiologikoetan, ezinezkoa izatea beroaren edo pH baxuaren bidez TRPV1 aktibatzea.

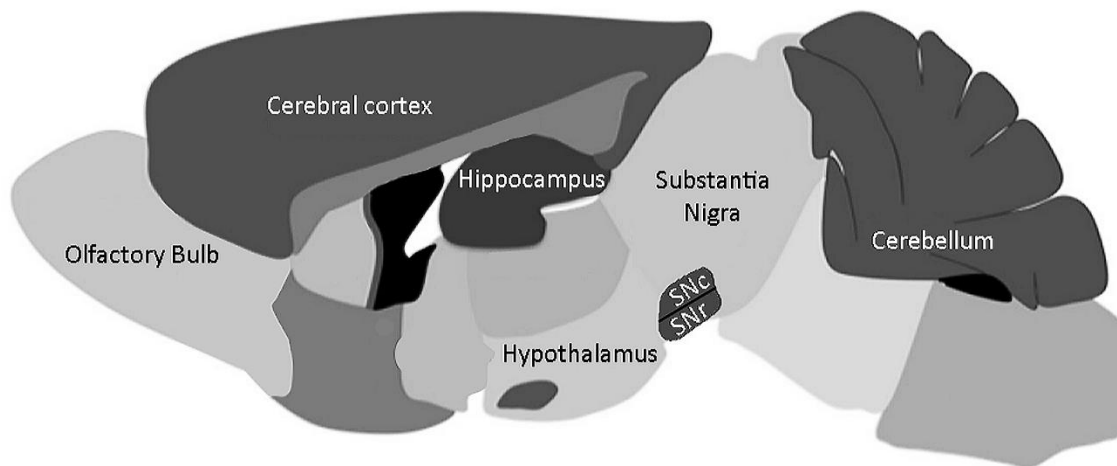
Kapsaizinak eta erretxiniferatoxinak (RTX), TRPV1 sendo aktibatzen duten bi agonistek, bero-sentsazio gogorrak eragiten dituzte. Kanala aktibatzen denean, kaltzioa poroan zehar mugitzen da eta zelulan sartzen da. Horrek kaltzioaren mendeko prozesu batzuk estimulatzen ditu kanala desentsibilizatzeraz daramatenak. Momentu horretan, kanala errefrakzio-epe batean sartzen da, eta ezin dio estimulazio handiagoari erantzun. Honek, konposatu hauen efektu analgesiko paradoxikora garamatza (Iannotti et al. 2014).

Bere banaketari dagokionez, NSPn, neurona sentsozial somatiko eta biszeral guztien artean, gutxi gorabehera % 50ek TRPV1 espresatzen dute, tamaina txikitik ertainera bitarteko neuronetara mugatuta dagoelarik bizkarraldeko sustraieko gangliotan, trigemino-gongoilean eta oinaldeko nukleoetan (Caterina et al., 1997; Helliwell et al., 1998). TRPV1 bizkar muineko bizkarraldeko adarren neurona sentikorren proiektzio zentraletan ere adierazten da, baita trigemino nerbioaren bizkar muin nukleoaren buztanaldeko zatian eta traktu bakartiaren nukleoan ere (Tominaga et al., 1998; Szallasi eta Blumberg, 1999).

Eztabaidagarria bada ere, frogatu da NSZn ere presente dagoela TRPV1, bereziki hipotalamoaren eremu preoptikoan, non hipertermia saihesteko funtsezkoa den bertan ematen den termoerregulazio-erantzunean (Jancso-Gabor et al., 1970; Szolcsanyi et al., 1971). *In situ* hibridazioak, gainera, TRPV1 garuneko hainbat nukleoetan dagoela adierazi zuen (Mezey et al., 2000). Sakonago aztertuta, eta antigorputz espezifikokoak eta RNAmko teknikak erabiliz, TRPV1ren espresioa garuneko eremu askotan dagoela frogatu zen. Hala nola, gai beltzeko neurona dopaminergikoetan, kortexeko eta hipokanpoko piramide neuronetan, hipotalamoan eta locus coeruleusean, usaimen kortexean edo alboko eta bizkarraldeko trenkada nukleoetan (Mezey et al., 2000 ; Cortright et al., 2001; Sanchez et al., 2001; Szabo et al., 2002; Roberts et al., 2004; Tóth et

al., 2005; Cristino et al., 2006) (4. irudia). Mintz neuronaletan kokatzeaz gain, zelula glialetan TRPV1 kanalen adierazpenaren berri ere eman dute, hala nola, astrozitoetan (Doly et al., 2004; Chen et al., 2009; Huang et al., 2010; Ho et al., 2012; Mannari et al., 2013). Horrez gain, karraskarien eta gizakien zelula mikroglialetan ere badagoela baieztatu da garuneko zenbait eremutan, hala nola, hipokanpoan, kortexean, hipotalamoan, garuntxoan, gai beltzean, usaimen-sisteman edota mesentzefaloan (Toth et al., 2005; Sun et al., 2013; Hironaka et al., 2014; Huang et al., 2015; Marrone et al. 2017).

TRPV1 kanalen funtzioak zelula barneko organuluetan ere deskribatu dira; mitokondriatan, erretikulu endoplasmaticoan, lisosomatan edota Golgi aparatuan (Huang et al., 2010, Miyake et al., 2015; Stueber et al., 2017). Ultraegitura mailan, hartzailearen adierazpena berretsi da terminal glutamatergiko zein gabaergikoetan, hipokanpoaren bihurtune horzduneko molekula-geruzan (Puente et al., 2015; Canduela et al., 2015) eta CA1eko Schaffer-en alboko zuntzen bukaera kitzikatzaileetan (Bialecki et al., 2020).



4. irudia: TRPV1 adierazten duten eskualde nagusien irudikapen eskematikoa. SNc, gai beltza pars compacta; SNr, gai beltza pars reticulata. Silvin eta beste batzuen lanetik (2018) eraldatua.

Kanalaren funtzionaltasunari dagokionez, batez ere periferiako nerbio-terminal sentikorretan kokatuta dagoenez, sinapsi sentikor primarioetan transmisio sinaptikoa modulatzeko duen hartzaile polimodal gisa jokatzeko duela esan daiteke (Tominaga et al., 1998). Zenbait azterlanek TRPV1 kanalek garunean duten funtzioan jarri dute arreta, zehazki, transmisio sinaptikoaren erregulazioan jokatzeko duten paperean. Izan ere, TRPV1ren aktibazioak transmisio sinaptikoa erregulatzeko duela frogatu da, sinapsi aurreko eta osteko mekanismoen bidez. Adibidez, locus

coeruleusaren aferenteetan presinaptikoki kokatutako TRPV1 aktibatzeak, glutamato eta adrenalina/noradrenalina askatzea eragiten duela frogatu da (Marinelli et al., 2002). Gainera, bukaera ildaskaren nukleoan (BNST), glutamatoaren transmisioan duen eragina presinaptikoa dela ere frogatu da (Musella et al., 2009). Aldiz, arratoi zein saguen bihurtze horzdunearan TRPV1k transmisio glutamatergikoa deuseztatzen duela frogatu da mekanismo postsinaptikoaren bidez, kaltzio eta kaltzineurinarekin menpeko AMPA hartzaileak barneratuz (Chavez et al., 2010). Gainera, mekanismo hau accumbens nukleoan TRPV1k bideratutako transmisio sinaptikoaren depresioan ere gertatzen dela deskribatu da (Grueter et al., 2010).

Transmisio glutamatergikoa inplikaturik egoteaz gain, agerian geratu da TRPV1 transmisio GABAergikoa modulazioan ere inplikaturik dagoela (Drebot et al., 2006). Kapsaizina (CAP) edo AEAk kanala aktibatzerakoan, bihurtze horzduneko transmisio inhibitzailea deprimitu egiten da mekanismo postsinaptikoaren bidez (Chavez et al., 2014). Gainera, frogatu da TRPV1 neokortexeko piramide-zeluletan "Spike-timing-dependent" delako epe luzeko indartzean inplikaturik dagoela. Horrek, hartzaile oroimen berriak eskuratzeko garrantzitsua izan daitekeela iradokitzen du (Cui et al., 2018). Bestalde, frogatu da interneuronek hipokanpoko oriens-lakunosum-molekulare (OLM) eremuan jasotzen dituzten proiektzio glutamatergikoen kopuruak behera egiten dutela, TRPV1 blokeatzaren ondorioz (Hurtado-Zavala et al., 2017). TRPV1 minarekin lotutako hainbat eremutan agertzen da, hala nola, neurona aferente primarioetan, bizkaraldeko sustrai gongoiletan (DRG) eta bizkar muineko atzeko adarrean. Hala ere, minaren modulazioari dagokionez, nabarmentzekoa da kanal hori ez dela protagonista bakarra, hainbat ikerketek adierazi baitute elkarrekintza konplexuak daudela kannabinoide eta opioide hartzaileen artean. Beste sistema neuromodulatzaile batzuekiko elkarrekintza horiek bi noranzkoetan izan daitezke; inhibitzaileak edo kitzikatzaileak; akutuak edo kronikoak, eta prozesu fisiologiko edo patologikoetan gertatu (Zador eta Wollemann, 2015).

NSPn duen funtzioari dagokionez, nahiz eta TRPV1ren partaidetza beharrezkoa den pertzepzio sentikor termikorako, tenperatura bidez ezin aktibatu daitekeen eskualdeetan duen banaketagatik, hartzaile horrek beste funtzio batzuetan ere parte hartzen duela iradoki da. Hala, odol-hodien eta bronkioen gihar leunean duen espresioa dela eta, basodilatazioan eta bronkio uzkurketan inplikaturik dagoela adierazi da (Mitchell et al., 1997; Zygmunt et al., 1999), edota urotelioan presente egoteak, mikzioan ere eragin dezakeela adierazten du (Birder et al., 2002).

Berriki proposatu da TRPV1k temperaturarekiko duen sentikortasunaren propietateak zeregin garrantzitsua izan dezakeela ez tul erreflexuaren erregulazioan (Lee et al., 2011) eta arnasbideen gaixotasunetan (Wortley et al., 2016).

1.3- Endokannabinoideak (eCBak)

CB₁R-ren identifikazio eta klonazio arrakastatsuen ondorioz, bere lehen agonista endogenoa aurkitu zen, N-arachidonoilethanolamina, anandamida edo AEA bezala ezagunagoa (Devane et al., 1992). Ondoren, 2-arachidonoilglicerol edo 2-AG, identifikatu zen, kannabinoide hartzailearekin elkareragiten duen beste molekula endogenoa, AEAk ezin baitzituen osorik erreproduzitu THC administrazioak eragindako efektuak (Sugiura et al., 1995; Mechoulam et al., 1995). ECSari buruzko azterlan gehienek bi eCB horietan jartzen dute arreta, baina badira, AAren deribatuak diren, beste peptido batzuk CB₁R-rekin elkareragiten dutenak eta eCBen antzeko efektuak eragiten dituztenak (Di Marzo eta De Petrocellis, 2012). Ondo aztertutako bi eCB horiek farmakologikoki karakterizatu dira, eta CB₁R-rekiko ezaugarri desberdinak dituztela aurkitu da. AEA, CB₁R-ren agonista partzial gisa jarduten duen kidetasun handiko molekula bat da CB₂R-rengan ia inaktibo dena; 2-AG berriz, agonista oso gisa jarduten du bi hartzaileetan, afinitate ezberdinarekin bada ere (Pertwee et al., 2010; Di Marzo eta De Petrocellis, 2012). Bi molekulek beste hartzaile batzuekin elkareragiten dutela ere jakinarazi da. Horien artean, transmisio sinaptikoan eta minaren erregulazioan jokatzen duen paper garrantzitsuagatik, AEAk aktibatzen duen TRPV1 hartzailea da ondoen dokumentatua dagoena; 2-AG eta hartzaile ez kannabinoideen arteko elkarekintzak berriz, berrikiago deskribatu dira eta ez dira hain sakonean ezagutzen (Di Marzo eta De Petrocellis, 2012).

Bi eCB horiek alde nabarmenak agertzen dituzte hartzaileen selektibotasunari dagokionez, baina biak eremu postsinaptikoan sortzen dira, zelula barneko kaltzioaren kontzentrazioak gora egiten duenean (Katona eta Freund, 2008; Kano et al., 2009; Castillo et al., 2012). Hala ere, bi molekula hauek modu ezberdinean sintetizatzen, garraiatzen eta metabolizatzen dira. AEAREN biosintesia, bere aitzindaria den N-arakidonoil-fosfatidiletanolaminatik (NAPE) abiatuta gertatzen da, neuronen despolarizazioarekin edo hartzaile ionotropikoen aktibazioarekin, eta NAPetik abiatuta, fosfolipasa D espezifiko batek katalizatzen du (NAPE-PLD). 2-AG, aldiz, triazilglicerolen metabolismotik sortzen da, diazilglicerol lipasaren (DAGL) ekintzaren bidez, bai α edo β isoformen

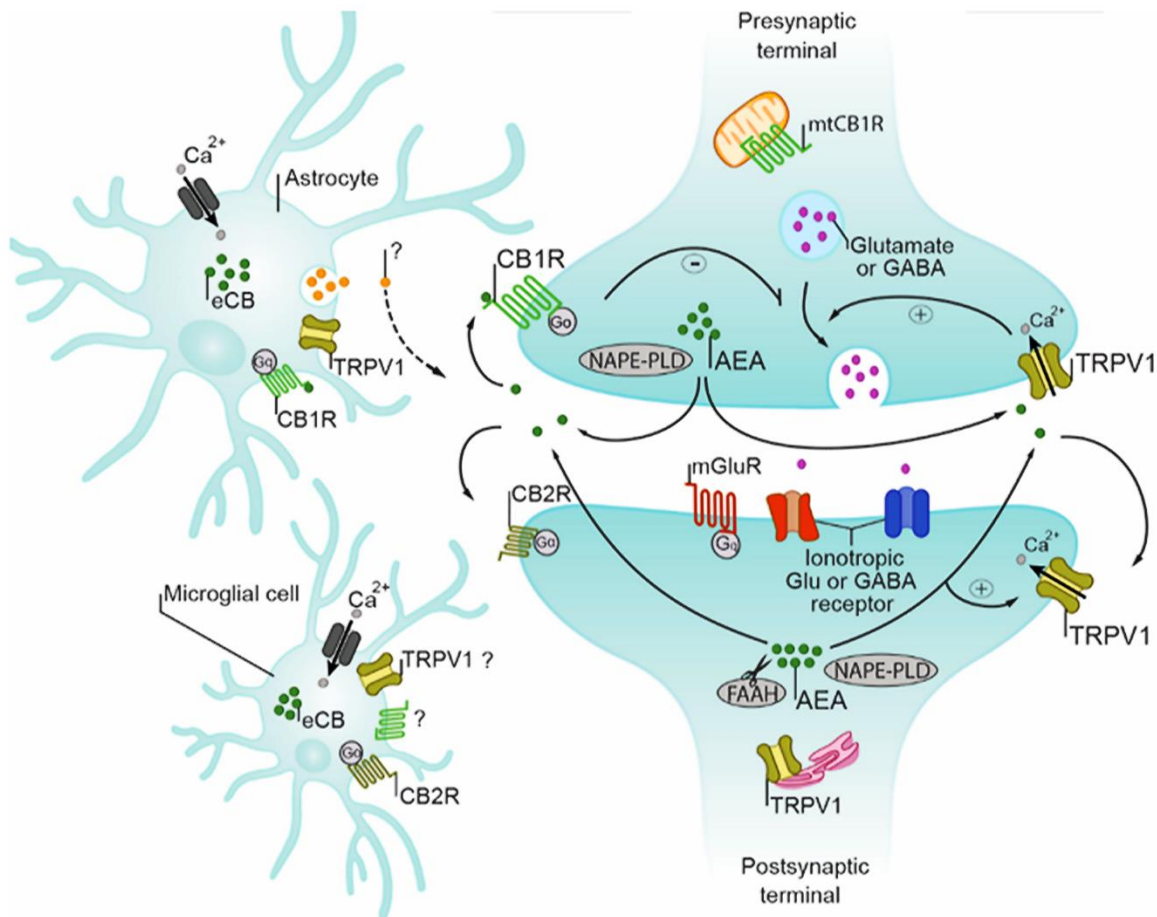
bidez. Sintesi hau, fosfodiesterasa 1-fosfatidilinositol-4,5-bifosfato beta entzimari (PLC β) akoplatutako hartzaile metabotropikoen aktibazioari erantzunez ematen da. Hartzaile metabotropiko hauen artean I. taldeko glutamato hartzaile metabotropikoak (mGluR1/5) eta I. (M1) edo III. (M3) motako azetilkolina hartzaile muskarinikoak aurki ditzakegu.

Sintesi prozesu horretan, NAPE eta DAG aitzindarien eraketa erabakigarria da eta hau kaltzioarekiko sentikorra denez, pausu hau eCBen ekoizpenerako murriztailea dela esan daiteke. NAPE fosfatidil-etanol-aminatik abiatuta, N-aziltransferasaren ekintzagatik eratzen den bitartean, DAG, fosfoinositidoetan C fosoflipasak duen ekintzagatik sortzen da (Pacher et al., 2006; Murataeva et al., 2014).

Sintetizatu ondoren, eCBak neurona postsinaptikoetatik tarte sinaptikora askatzen dira, baina euren karga gabeko izaera hidrofobikoa dela eta, beste neurotransmisore batzuk ez bezala hauek ezin dira alde presinaptikora euren kabuz garraiatu, eta oraindik identifikatu ez den arren, AEAREN garraioa argitzeko hainbat eredu proposatu dira (Nicolussi eta Gertsertsi, 2015). Horietako batzuk, adibidez, entzima-degradazioak sortutako kontzentrazio-gradiente desberdintasunek eragindako difusio sinplea iradokitzen dute, lipido-xixkuak inplikatzen dituen endozitosisia, edo garraio-proteinen laguntzaren bidez sortutakoak ere proposatu dira, hala nola, gantz-azidoekin lotzen diren proteinek edota talka termikoko 70 proteinek bideratutako garraioak (HSP70) (Kano et al. 2009). 2-AGren kasuan, AEAK dituen garraio-sistema berberak proposatu dira, nahiz eta ez den ondo ulertzen (Huang et al., 2016). Neuronek eCBak barneratu ondoren, hidrolisi edo oxidazio prozesuen bidez metabolizatzen dituzte. AEA, gantz-azidoen amida hidrolasak (FAAH) degradatzen du, AA eta etanolamina askean banatuz (Ahn et al., 2008; Di Marzo, 2009). 2-AG berriz, gehienbat monoazilglizerol lipasak (MAGL) hidrolizatzen du AA eta glizerolean (Blankman et al., 2007; Rouzer eta Marnett, 2011). Hala ere, eta proportzio txikiagoan bada ere, beste entzima batzuek ere esku hartzen dute eCB honen degradazioan, hala nola, α/β -Hydrolase domain-containing 6 entzima (ABHD6) (Dinh et al., 2002; Marrs et al., 2010).

Lehen aipatu bezala, eCB horiek neurona postsinaptikoetan sintetizatzen dira, estimulu fisiologiko edo patologikoei erantzunez (Kano et al., 2009; Castillo et al., 2012; Katona eta Freund, 2012; Araque et al., 2017). Hala ere, froga batzuk ere badaude, 2-AGk eta AEAK sintetizatzen diren egituran bertan jardun dezaketela adierazten dutenak (Castillo et al., 2012); 2-AGk CB₁R edo CB₂R

postsinaptikoak aktibatzen ditu, eta AEak berriz TRPV1 aktibatzen du. Gainera, neuronek askatutako eCBek zirkuitu presinaptiko eta postsinaptikoko elementuak modulatu ditzakete astrozitoetan adierazitako CB₁R aktibatuz (Navarrete et al., 2014; Metna-Laurent eta Marsicano, 2015) (5. irudia).



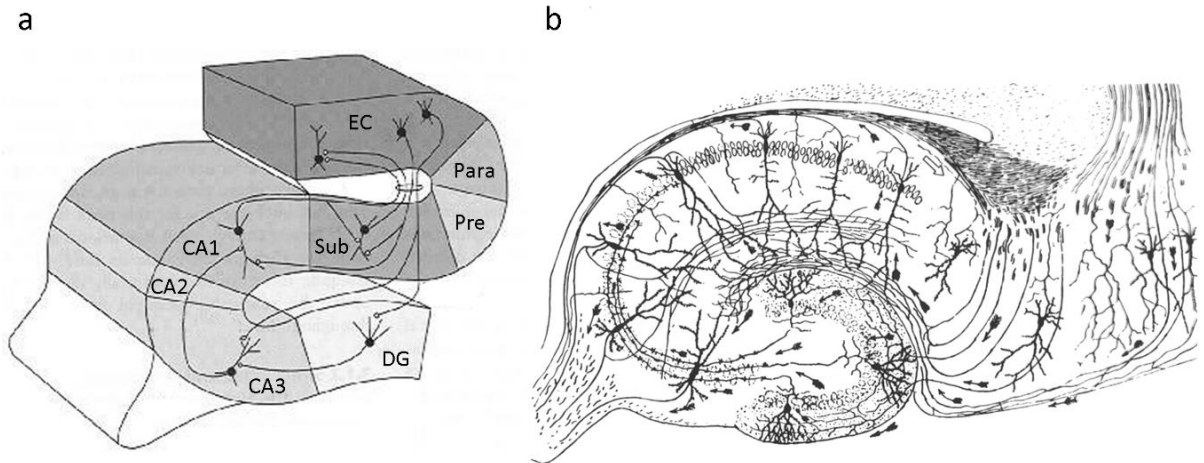
5. irudia: Endokanabinoide sistemaren konposatuek neuronetan eta glia zeluletan duten banaketaren irudi adierazgarria. Geziek TRPV1 kanalaren papera adierazten dute endokannabinoidieen seinaleztapenean. AEA molekula ligando endogeno gisa jokatu dezake bai CB₁R-rako zein TRPV1 kanalerako. Terminal presinaptikoetan CB₁R aktibatzeak, neurotransmisoreen askapena etetea dakar. TRPV1 aktibatzeak berriz, neurotransmisorea gehiago askatzea dakar (presinaptikoki adierazten bada) edota terminal postsinaptikoaren despolarizazioa sustatzen du (postsinaptikoki adierazten bada). TRPV1 eta CB₁Rek, terminal glutamatergiko zein gabaergikoetan duten papera erlatiboa da, ligandoaren kontzentrazioaren araberakoa izanik. Patel eta beste batzuegandik hartua (2017).

1.4- Hipokanpo egitura

Egitura hau hipokanpoa bera eta horrekin konektatzen diren garun-kortexeko eremuek osatzen dute. Hipokanpoak "Cornu ammonis" (CA) deritzen eremuak barne hartzen ditu: gehien aztertu direnak CA1 eta CA3 eremuak dira, eta txikiena, gutxien ikertu dena, CA2 eremua. Horrez gain,

egitura honetan kortex entorrinala, alboko eta erdiko kortexetan ezberdinduta; bihurtune horzduna (DG); subikulua, subikuluaurrea eta parasubiculua aurkitzen dira.

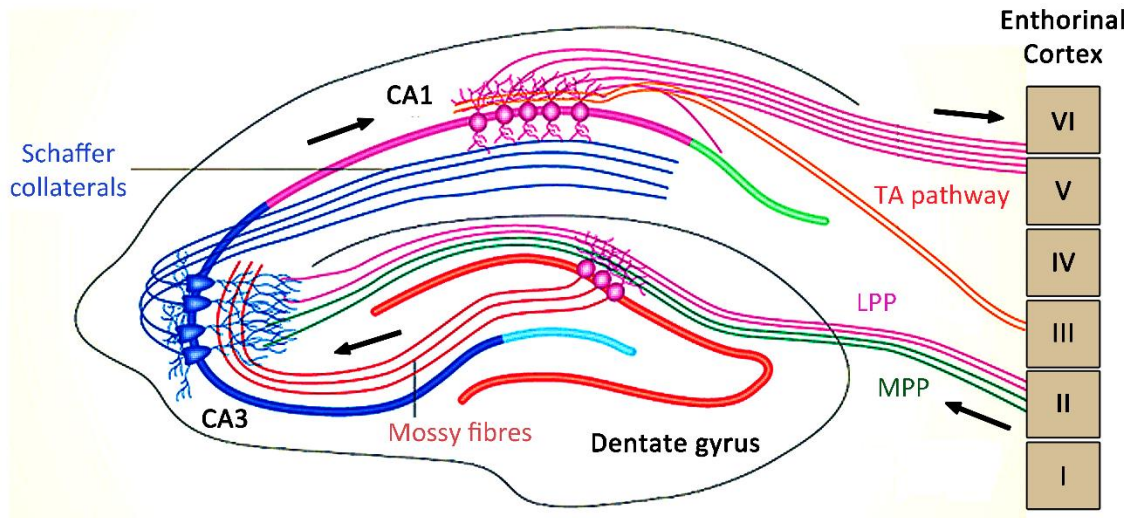
Egitura hau eta eratzten dituen konexioak nahiko bereziak izateak zirkuituan dauden elementuen identifikazio ona ahalbidetu zuten (Cajal, 1955). Neokortexarekin alderatzen denean, hipokanpoaren sinpletasunak, plastikotasun sinaptikoa (Bliss eta Lomo, 1973) eta orimenaren gaitasun funtzionalak (Marr, 1971; Gardner-Medwin, 1976) aztertzeraz eraman zituen ikertzaile goiztiarrak. Nabarmenezkoa da, egitura hori bakarrik egiten duen ezaugarrietako bat bere proiektzioak direla, hein handi batean norabide bakarrekoak direnak, eta funtsezkoa izan zena lehen ikerketa haietan (Andersen et al., 2006) (6. irudia). Hipokanpoan sartzen den informazioa, kortex entorrinaleko gainazaleko geruzetatik datorren proiektzio nagusi batetatik bideratzen da, bide zulatzailea (PP) moduan ezaguna dena. Aldiz, kortex bereko geruza sakonek eta subikulua, hipokanpoari gainerako burmuinerako irteera ematen diote (Harley et al., 2014).



6. irudia: Hipokanpo egituraren irudia. a) Hipokampoko konektio nagusien irudikapen eskematikoa. B) Giza hipokanpoaren marrazkia. David S.Touretzky (2015): "Hipokanpoaren anatomiaren alderaketa" lanetik hartua.

Bide zulatzailea, oro har, alboko bide-zulatzailean (LPP) eta erdiko bide-zulatzailean (MPP) banatzen da, alboko kortex entorrinaletik eta erdiko kortex entorrinaletik jasotzen dituzten proiektzioen ondorioz (Hjorth-Simonsen, 1972) (7. irudia). Bide zulatzailearen bi alde horiek ezberdintasunak erakusten dituzte antolaketa anatomikoari dagokionez. Horrela, Timm metodoaz tindatutako garuneko ebaketa batzuek tindaketa dentsuagoa erakusten dute LPPan MPPan baino

(West eta Andersen, 1980; Fredens, 1981) eta Witter eta lankideek (1989) fisiologian eta antolaketa histokimikoan ezberdintasunak ere deskribatu zituzten.



7. irudia: Hipokanpoaren zirkuitu orokorra. Bihurgune horzdunak (DG) bere sarrera gehienak kortex entorrinaleko II. geruzatik jasotzen ditu erdiko eta alboko bide zulatzailetik hurrenez hurren (MPP eta LPP). Pikor-zelulen axoiak cornu ammoniseko (CA) 3. eskualdeko piramide-zeluletara hedatzen dira, zuntz goroldiosu glutamatergikoak eratu. CA3 piramide-zelulen proiektzioek Schaffer-en alboko zuntzak eraten dituzte, CA1 piramide-zelulen arantza dendritikoekin sinapsi kitzikagarriak eraten dituztenak. Azkenik, CA1 neuronek hipokanpoaren zirkuitua ixten dute, euren axoiak kortex entorrinalaren geruza sakonetara zuzenduz. CA1ak, halaber, kortex entorrinaleko III. geruzatik proiektzio zuzena jasotzen du, bide tenoroamoniokotik (TA) hain zuzen. Pinar eta lankideak (2017) lanetik hartua.

1.4.1- Bihurgune horzduna eta ECS

Bihurgune horzduneko neurona nagusiak pikor-zelulak dira, eta egitura hau hipokanpoaren gainerako eremuetatik bereizten da zelula glutamatergiko mota gehigarri bat duelako, goroldio-zelulak. Golgiren teknikarekin tindatu ondoren, zelula hauen bereizgarri nagusia eta "goroldio" deituraren erantzuleak nabarmentzen dira, izan ere, dendritek arantza antolaketa konplexua erakusten dute, multzoak eraten dituztelarik. Arantza-multzo hauek "Eskreszentzia arantzatsu" bezala ezagutzen dira. Goroldio-zelulak baldintza patologiko askotan inplikaturik daudela frogatu da, baina euren funtzio fisiologikoak oraindik ez daude erabat argi (Scharfman, 2016).

Pikor-zelulak (GC) modu estereotipikoan orientatuta daude. Horrela, euren dendritak molekula-geruzan (ML) kokaturik dauden bitartean, modu jarraituan eta estuan kokatutako zelula-gorputzek pikor-zelula geruza (GCL) osatzen dute. GCL eta CA3aren artean, "hilus" izeneko geruza

polimorfiko bat dago, goroldio-zelulak barne hartzen dituenak. Molekula-geruza, kanpoko molekula-geruzan (OML), erdiko molekula-geruzan (MML) eta barneko molekula-geruzan (IML) banatzen da. Antolaketa anatomiko hori antzekoa da karraskari eta primateetan (Scharfman, 2016). Esan bezala, bihurtune horzadun sarrera nagusia bide zulatzaile glutamatergikotik dator, II. geruza entorrinaletik. Proiekzio hori da OMLren (LPP) eta MMLren (MPP) parte diren proiekzio gehien arduraduna (Steward eta Scoville, 1976; Amaral et al., 2007; Witter, 2007). Gainera, hiluseko goroldio-zelulen axoiak IMLren aferente nagusiak dira (Ribak et al. 1985; Buckmaster et al., 1996; Scharfman eta Myers, 2012). Pikor-zelulen axoiak, zuntz goroldiotsuak deritzenak, CA3 eremuko piramide-neuronetara eta alboko goroldio zeluletara proiekzioak bidaltzen dituzte (Amaral et al., 2007).

Hainbat ikerketek garuneko ECSko hartzaile metabotropiko eta ionotropiko nagusien kokapen immunohistokimikoa frogatu dute, eta badirudi garuneko hainbat eskualdetako zelula-gorputzen, axoien eta dendriten mintzetan ko-adierazten direla. Horrela, CB₁R/TRPV1 hartzaileen kokapen neuronalerako bi eredu orokor deskribatu dira: bata, bi hartzaileen adierazpena mintz plasmaticoetan eta konpartimentu perinuklearretan gain jartzen dituenak, eta bestea, bi hartzaileak mintz plasmaticoetan eta prozesu zelularretan ko-adierazten dituenak (espresio perisomatikoa eta axonala). Lehen patroia hipokampo egiturako interneuronetan, neurona talamiko eta hipotalamikoetan eta garuntxoko nukleo sakonetako neuronetan gertatzen da. Bigarren banaketa-eredua berriz, hipokampoaren piramide-neuronetan, oinaldeko nukleoetako neuronetan, garuntxoko Purkinje zeluletan eta akueduktu inguruko gai grisaren sabelaldeko neuronetan (PAG) aurkitzen da (Cristino et al., 2006). Hipokampo egitura garunean CB₁R-ren immunorreaktibitate handienetakoa duen egituretako bat da, eta, horregatik, CB₁R-ren adierazpena hipokampoan hainbat azterlanetan deskribatu da (Herkenham et al., 1990; Mailleux eta Vanderhaeghen, 1992; Matsuda et al., 1993; Tsou et al., 1998; Marsicano eta Lutz, 1999; Egertova eta Elphick, 2000; Katona et al., 2006; Kawamura et al., 2006; Ludanyi et al., 2008; 2011; Katona eta Freund, 2008; 2012; Steindel et al., 2013; Hu eta Mackie, 2015). Nagusiki, baina ez soilik, CB₁R, axoi terminal gabaergiko zein glutamatergikoetako alde presinaptikoko mintzetan kokatzen da (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017). Hein handi batean, molekula-geruzako IML eremuan, goroldio-zelula glutamatergikoen bukaeretan adierazten da, eta neurri txikiagoan, gainerako geruzako eremuetan bukaera kitzikatzaile eta inhibitzaileetan (MML eta OML) (Kawamura et al., 2006; Monory et al., 2006; Katona eta Freund, 2008; 2012; Peñasco et al., 2019).

Gainera, CB₁Rk prozesu astrozitikoetan (Bosier et al., 2013; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2018) eta hipokanpoan kokatutako mintz mitokondrialetan espresatzen direla frogatu da (Benard et al., 2012; Hebert-Chatelain et al., 2014a, b).

TRPV1ri dagokionez, azterketa immunohistokimikoek erakutsi dute batez ere, arratoien neurona zentralen arantza dendritikoen mintz postsinaptikoetan adierazten dela (Tóth et al., 2005). Gainera, mikroskopia elektronikorako sentsibilitate handiko urre-partikula bidezko erretxinan murgildu aurreko markaketa metodoa erabiliz, TRPV1 bihurtune horzduneko sinapsi inhibitzaile eta kitzikagarrietan dagoela frogatu da (Canduela et al., 2015; Puente et al., 2015). Azterlan horretan, sinapsi inhibitzaileen % 30 inguru TRPV1rekiko immunopositiboak direla ikusi da molekula-geruzan, eta gehienak perisinaptikoki kokatuta daudela IMLko sinapsi simetrikoek jasotzen dituzten mintz dendritiko postsinaptikoetan (Canduela et al., 2015). Sinapsi kitzikagarrietan duen presentziari dagokionez, TRPV1 seinalatzen duten immunopartikulak oso kontzentratuta ageri dira MLren kanpoko bi herenetan, PPko terminal sinaptikoek jasotzen dituzten arantza dendritikoetan (Puente et al., 2015).

Azkenik, gure laborategiak berriki frogatu duenez, TRPV1 CA1 eremuko Schaffer-en alboko zuntzak deritzen terminaletan ere badago (Bialecki et al., 2020), eta horrek aurretik burututako azterlanak berresten ditu, izan ere, garunaren beste eremu batzuetan TRPV1 presinaptikoaren kokapena deskribatu da (Marinelli et al., 2002; Musella et al., 2009; Kawahara et al., 2011). Gainera, TRPV1 partikulen pilaketa handia ikusten dugu pikor-zelulen zitoplasman (Canduela et al., 2015), garuneko hainbat eskualdetan erakusten den bezala (Tóth et al., 2005; Cristino et al., 2006; 2008). Hala ere, oraindik ez da argitu zelula barruko TRPV1ren funtzioa: plastikotasun sinaptiko glutamatergikorako beharrezkoak diren zelula barneko hainbat garun prozesuetan eta kaltzio erreserben askapenean parte har dezakeela iradokitzen da, (Chavez et al., 2010) zein mitokondrien bideragarritasunerako beharrezkoa delarik (Athanasίου et al., 2007). CB₁R eta TRPV1 hartzaileen arteko elkarrekintza funtzionalei dagokienez, egile batzuek frogatu dute hauek zelula berean adierazten direnean, bi hartzaileen arteko elkarreragin funtzionalak gertatzen direla. Adibidez, CB₁R eta TRPV1 aktibatzeak kontrako ondorioak eragiten ditu zelula barneko kaltzio-kontzentrazioetan (Szallasi eta Di Marzo, 2000). Hala, agonista dual batzuek, AEA edo NADA kasu, aktibatutako hartzailearen arabera, kontrako ondorioak eragin ditzakete neurotransmisoreen askapenean, gai beltzaren atal trinkoan frogatu denez transmisio glutamatergikoaren kasuan

(Marinelli et al., 2003). Hipokanpoan ere, CB₁R eta TRPV1 hartzailen aktibazioak kontrako efektuak eragiten ditu neurona eta interneuronetan. Kannabinoide agonistak potentzial postsinaptiko kitzikatzailea murrizten zuten bitartean agonista vanilloideek LTParen indukzioa areagotzen zuten (Tahmasebi et al., 2015). Bi agonisten aldi bereko aplikazioak, TRPV1 agonistak eragindako eCBen ekoizpena alda dezakeela ikusi da, bi sistemen arteko elkarrenergina dagoela edo hipokanpoan ohikoak diren seinaleztapen-bide batzuk partekatu ditzaketela iradokiz (Tahmasebi et al., 2015). GABAren transmisioaren kasuan adibidez, datuek iradokitzen dute kontrako ekintzak gertatzen direla “paired pulse” bidez eragindako depresioaren testuinguruan (Al-Hayani et al., 2001). AEA edo NADA eCBak *in vivo* emateak antzeko jokabideak eragin ditzake bi hartzailen bidez, hipolokomozioa kasu, CB₁R eta TRPV1 hartzailak oinaldeko nukleoetan elkarrekin kokatzearen ondorioz gertatzen dena (Di Marzo et al., 2001; de Lago et al., 2004). Horrez gain, emesia kontrolatzen duten entzefalo enborreko nukleoetan bi hartzailen presentziak (area postrema eta traktu bakartiaren nukleoan), agonista dualen efektu antiemetiko sendoak azal ditzake (Sharkey et al., 2007).

Ondorioz, litekeena da zelula berean adierazitako CB₁R eta TRPV1 hartzailen arteko elkarrenerginek, geneen adierazpenean ere isla izatea. Horren adibide, CB₁R ezabatuta duten saguetan aurki dezakegu. Izan ere, sagu hauetan ikusi da TRPV1 kanalaren espresio maila murriztu egiten dela hipokanpoko bihurtune horzdunean eta aldiz, garuntxoko pikor-zelula geruzan, gora egiten duela (Cristino et al., 2006). Horrek iradokitzen du CB₁R oinarritzko erregulazioa eragiten dutela TRPV1ren adierazpenean.

1.5- ECS eta plastikotasun sinaptikoa

Plastikotasun sinaptikoa, garunean gertatzen den funtsezko prozesu bat da, zirkuitu neuronalek esperientzia berrietara egokitzeko eta horietatik ikasteko duten gaitasunean oinarritzen dena. Garunaren funtzionamendu normalaren adierazle ere bada. Enbrioi-fasetik helduarora, ingurumen-estimuluek aldaketak eragiten dituzte funtzio sinaptikoan, eta banakako esperientziak ezinbestekoak dira oroitzapen berriak eratzeko, gaitasun berriak garatzeko edo egokitze hobea ekarriko duten jokabide berriak sortzeko. ECS, transmisio sinaptikoaren funtsezko modulatzaila dela erakutsi du, eta, beraz, plastikotasun sinaptikoan duen parte-hartzea ukaezina da.

eCBak mobilizatzearen ondorioz sortutako transmisio sinaptikoaren erregulazioa epe laburrean zein luzean gertatzen da. Segundoetan gertatzen diren aldaketa sinaptikoak epe motzeko aldaketak dira, eta barne hartzen dute despolarizazioak eragindako kitzikapena murriztea (DSE) edo inhibizioa murriztea (DSI), eCBak jarduten duten terminal motaren arabera, terminal glutamatergikoetan edo gabaergikoetan (Kano et al., 2009; Castillo et al., 2012). Epe luzeko aldaketa sinaptikoak, minutuetatik orduetara gertatzen direnak, bi terminal mota hauetan ere gerta daitezke, ekintza presinaptiko edo postsinaptiko mota desberdinei erantzunez (Araque et al., 2017). Beraz, eCBak funtzio sinaptikoaren bitartekari boteretsuak dira garunean, eta bertan hainbat funtzio modulatzeko gai direla erakutsi dute; besteak beste, kognizioa, kontrol motorra, emozioak, sari-efektua eta elikatzeko portaerak. ECSren deserregulazioa berriz, gaixotasun neuropsikiatrikoekin lotu da, hala nola, depresioa, autismoa, eskizofrenia, adikzioa, estresa edo antsietatea moduko gaixotasunekin (Hillard et al., 2012; Mechoulam eta Parker, 2013; Parsons eta Hurd, 2015; Volkow et al., 2017).

Esan bezala eCBek funtzio sinaptikoa erregulatzen dute CB₁Rak aktibatuz bukaera sinaptiko gabaergiko zein glutamatergikoetan (Kano et al., 2009; Castillo et al., 2012). Hipokanpo egituraren barruan, CB₁Rak nagusiki terminal inhibitzailetan adierazten direnez (Freund et al., 2003), eCBek eragin sendoa dute inhibizioaren gainean, eta GABAren askapena epe laburrera (Wilson eta Nicoll, 2001) zein epe luzera murrizten da, inhibizioaren epe luzeko depresioa (iLTD) eraginez (Chevalleyre eta Castillo, 2003). GABA askapenaren inhibizio horrek eragin sakona izan dezake zirkuituko oreka kitzikatzaile-inhibitzailean eta honek ikaskuntza prozesuan ere eragin dezake (Letzkus et al., 2015). Jakina da, eCB delakoek interneuronak inhibitzerakoan, epe luzeko indartzea (LTP) eragiten dutela Schaffer-en alboko zuntzak (SC) eta CA1 (SC-CA1) eremuen arteko piramide-zelulen sinapsietan (Carlson et al., 2002; Chevalleyre eta Castillo, 2004). Kortex entorrinalaren eta hipokanpo egituraren artean eratutako zirkuituan, eCBak “input-timing” mendeko plastikotasunetan inplikaturik daudela ikusi da (Xu et al., 2012; Basu et al., 2013), SC-CA1 sinapsietan ematen den plastikotasun heterosinaptikoan hain zuzen (Dudman et al., 2007). Plastikotasun horretan, eCBek kolezistokinina (CCK) interneurona positiboetan (CB₁R positiboak) bideratutako iLTDa, eta lehen aipatutako SC-CA1 sinapsietan ematen den LTPa barne hartzen dira (Carlson et al., 2002; Chevalleyre eta Castillo, 2004; Basu et al., 2013). Horretarako, neuronon sinkronizazio zehatza behar da, bai CCK interneuronek SC-tik jasotako proiektzioena, bai eta CA1eko piramide-zelulek PPTik jasotako proiektzioena ere. Presinaptikoki CCK interneuronetan ematen den eCB-iLTDak CA1

piramide-zelulen aktibazioa erraztu dezakeelarik (Basu et al., 2013). Saguaren neokortexean, eCBek sinapsi kitzikatzailletan epe luzeko depresioa eragiten dute (eLTD) “spike-timing” mendeko indukzio protokoloen bidez (Caporale eta Dan, 2008; Heifets eta Castillo, 2009). Horren antzera, *Accumbens* nukleoan eCBek biderautako LTD forma bat aurkitu zen (Grueter et al., 2010) eta bukaera ildaskaren nukleoan (BNST) ere (Puente et al., 2011). eCBek bideratutako epe laburreko plastikotasuna (DSI/DSE), CB₁Rk eragiten duen kaltzio presinaptikoaren fluxuaren inhibizioan oinarritzen da, boltai-menpeko kaltzio kanalen bidez gauzatzen dena (Kano et al., 2009).

Oraindik ez da ulertu nola CB₁R-ren aktibazioak, neurotransmisoreen liberazioa modu iraunkorrean inhibitzen duen (eCB-LTD) (Castillo et al., 2012; Araque et al., 2017). Duela gutxi, saguaren bihurtune horzdunean, gure taldeak MPP-GC sinapsi kitzikatzailletan CB₁R-ren mendeko depresio iraunkor bat deskribatu du (Peñasco et al., 2019). Lan horretan, eCB-eLTDaren indukziarako erabilitako estimulazio-protokoloa, aurretiaz ere erabilia izan da garunaren beste eskualde batzuetan eCBek bideratutako LTDak eragiteko, hala nola, bekoki aurreko kortexean edo BNST eremuan (Lafourcade et al., 2007; Puente et al., 2011). Plastikotasun mota horretan, eCBek bideratutako eLTDaren magnitudea ez zen aldatu NMDAR-ren antagonista (D-APV izenez ezaguna) aplikatu ondoren. Horrek iradokitzen du, beste sinapsi batzuetan ez bezala, NMDAREk ez dutela eCB-eLTD mota horretan parte hartzen MPPko sinapsietan (Bender et al., 2006; Sjöström et al., 2003). Gainera, terminal glutamatergikoetan CB₁R presinaptikoak aktibatuz, LTD hori 2-AG endokanabinoidearen mende dagoela frogatu zen (Peñasco et al., 2019). Bitxia bada ere, goroldio-zeluletatik jasotzen dituen proiektzioak direla eta IMLan terminal glutamatergikoetan CB₁R-ren proportzioa altua bada ere (Katona et al., 2006; Kawamura et al., 2006; Monory et al., 2006; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017), MPPan eLTD eragiten duen indukzio protokolo berbera ez da gai MCFL-GC sinapsietan eLTDak eragiteko (Chiu eta Castillo, 2008; Peñasco et al., 2019).

Ikerketek erakutsi dute eCBek ere LTPa eragin dezaketela mekanismo ez-konbentzionalen bidez, bai hipokanpoan, bai neokortexean. Horrela, SC-CA1 sinapsietan, endokannabinoideek glutamato askapenaren epe luzeko indarzteia (LTP) eragiten dute, astrozito-neurona seinaleztapena estimulatu (Navarrete eta Araque, 2008; Gomez-Gonzalo et al., 2015). Bihurtune horzdunean, LPParen maiztasun handiko estimulazioak eremu presinaptikoko LTP bat sortzen du, NMDAR-ren, kaltzio postsinaptikoaren eta mGluR5 hartzaileen mendekoa, eta horrek 2-AG postsinaptikoa mugiaraztea eta CB₁R presinaptikoak aktibatzea eskatzen du (Wang et al., 2016). Ez dago argi nola

CB₁R-ren aktibazioak glutamatoaren askapena modu iraunkorrean areagotu dezakeen, baina LPPko terminaletan iradoki da beharrezkoa izan daitekeela aktina zitoeskeleto presinaptikoa berrantolatzea (Wang et al., 2018).

Species	Synapse type	Induction protocol	Induction requirement	Reference
Rat	MCF inputs to dentate granule cells (DGC)/(MCF-DGC synapses)	Depolarization step (from -70 mV to 0 mV) of 3-5 s	eCB-DSF, calcium-dependent, modulated by cholinergic and group I mGluRs, DAGL independent	Chiu and Castillo-2008
Rat	MCF inputs to DGC/(MCF-DGC synapses)	Theta-burst stimulation or high frequency stimulation or spike-timing dependent plasticity	No eCB-LTD	Chiu and Castillo-2008
Rat	GABAergic inputs to DGC/(GABAergic-DGC synapses)	Depolarizing step of 1-3 s or a series of short (500 ms) repetitive depolarizations	eCB-DSI, calcium dependent, involves ryanodine receptor (RyR)-mediated Ca ²⁺ release	Isokawa and Alger-2005
Rat	GABAergic inputs to hilar mossy cells (HMC)/(GABAergic-HMC synapses)	Depolarization step of 5-s	eCB-DSI, confined to very small spaces (e.g., $520 \mu\text{m}$), Ca ²⁺ dependent and facilitated by activation of mAChRs	Hofmann et al. (2006)
Rat, mouse	MPP inputs to DGC/(MPP-DGC synapses)	Brief postsynaptic depolarizations (1 Hz)	Anandamide-mediated TRPV1-LTD in a CB1 receptor-independent manner, Ca ²⁺ calcineurin and clathrin-dependent internalization of AMPA receptors	Chávez et al., (2010)
Rat, mouse	LPP inputs to DGC/(LPP-DGC synapses)	2 trains of 100 Hz, each lasting 1s	2-AG-mediated CB1-LTP via small GTPases and the assembly of latrunculin A-sensitive actin filaments	Wang et al. (2016)
Rat, mouse	LPP inputs to DGC/(LPP-DGC synapses)	1 or 2 trains of 100 Hz, lasting 1s	2-AG-mediated CB1-LTP involving β 1 integrins and presynaptic actin regulatory signaling	Wang et al. (2018)
Mouse	MPP inputs to DGC/(MPP-DGC synapses)	1 train of 10 Hz, lasting 10 min	eCB-LTD, is group I mGluR-dependent and requires intracellular calcium influx and 2-AG synthesis	Peñasco et al. (2019)

1. taula: eCBen mendeko plastikotasun sinaptikoaren hainbat forma bihurgune horzduneko sinapsi glutamatergiakoetan eta GABAergiakoetan. Peñasco eta lanekideen lanetik egokituua (2019).

1.6- ECS eta epilepsia

Epilepsia, helduen % 1 inguruk pairatzen duen gaixotasun neurologiko arrunta da (Hauser eta Hesdorffer, 1990), eta bertan hainbat patologia barne hartzen dira, konbultsioak amankomuneko sintoma izanik. Epilepsia mota desberdin horiek sorrera eremuan, adinean, sintoma fisiopatologikoetan eta abiatzen dituzten mekanismoetan ezberdintzen dira. Oro har, epilepsien erdia, hartutako epilepsia gisa sailkatzen dira, non burmuineko irain zein isuri batek edota garuneko traumatismo batek plastikotasun neuronalaren etengabe aldatzea eragiten duen (Hauser eta Hesdorffer, 1990). Epilepsiak, hainbat nahasmendu patologikotan bana daitezkeen arren, populazio neuronal jakin batean gertatzen den transmisio neuronal kitzikatzailaren eta inhibitzailearen arteko desoreka baten ondorioz gertatzen dira eta bat-bateko eraso errepikakorren deskargekin batera agertzen dira (Lothman et al., 1991; Scharfman, 2007; Badawy et al., 2009a; 2009b). Azken urteotan, epilepsiaren aurkako sendagaiak eta tratamenduak ugartu diren arren, diagnostikatu berri diren paziente epileptikoen % 25 eta % 40a bitartean egungo terapietik erresistenteak diren konbultsio errefraktarioak jasango dituztela aurreikusi da (Schmidt eta Sillanpaa, 2012). Horregatik, konbultsioen krontol hobeago bat bermatzeko, ito terapeutiko berrien beharra azpimarratzen da (Wilcox et al., 2013). Esan bezala, ECSk funtsezko eginkizuna betetzen du burmuinean, hainbat prozesu modulatzeko dituelako, baldintza fisiologiko zein patologikoetan (Di Marzo et al., 1998; Alger, 2006; Mackie eta Stella, 2006; Kano et al., 2009; Castillo et al., 2012). Bat-bateko konbultsio errepikakorrek aldizkako jarduera bat dutela kontutan hartuta, iradokitzen da garunaren eremu jakin batean transmisio sinaptikoaren aldi baterako deserregulazioa gertatzen dela (konbultsio fokalak) edo aldi berean garunaren eskualde askotan (konbultsio orokortuak). Azterlan askok ECSk bai egoera fisiologikoan zein patologikoetan konbultsioak kontrolatzeko duen eginkizunean jarri dute arreta (Blair et al., 2015).

Animalia ereduak frogatu dute CB₁R-ren aktibazioak konbultsioen larritasuna gutxitzen duela. Bekoki aurreko lobuluko neurona kitzikatzaille nagusietan CB₁R adierazten ez duten sagu mutanteetan, kainatoak (KA) eragindako konbultsioak, animalia kontroletan baino larriagoak izan ziren (Marsicano et al., 2003). Hipokanpoan, CB₁R-ren adierazpena bukaera glutamatergikoetan eta ez GABAergikoetan, beharrezkoa eta nahikoa izan zen KAK eragindako konbultsioetatik babesteko (Monory et al., 2006). Horrez gain, bektore biralen bidez CB₁R-ren adierazpen mailak areagotuz, KAK hipokanpoan eragindako konbultsioen larritasuna eta hilkortasuna murrizten dira

(Guggenhuber et al., 2010). Oro har, emaitza horiek erakusten dute CB₁Rek krisi epileptikoak kontrolatu ditzaketela eta neuronak ondorengo heriotza zelularretik eta gliosi erreaktibotik babestu ditzaketela (Rosenberg et al., 2015). TRPV1 hartzaileari dagokionez, hipokanpoaren sinaptosometan TRPV1 aktibatzeak GABAren askapena murrizten duela deskribatu da, piramidezelulen kitzikagarritasuna areagotuz (Kofalvi et al., 2006; Gibson et al., 2008). Aldiz, TRPV1 presinaptikoaren aktibazioak CA1 piramide-neuronak inhibitu zituen, transmisio GABAergikoa areagotuz (Al-Hayani et al., 2001; Kofalvi et al., 2006). TRPV1 hartzailearen agonisten bidezko estimulazioaren ondoren, ematen den jarduera epileptiformearen eta hiperkitzikagarritasunaren gorakada, hartzaile vanilloideen antagonistek ezabatu zuten (Chen et al., 2007; Bhaskaran eta Smith, 2010; Gonzalez-Reyes et al., 2013). Gainera TRPV1ren agonista den CAPak eragindako jarduera pro-konbultsiboa, capsazepina (CPZ) antagonistak blokeatu zuen, are gehiago, hau pentilentetrazolak (PTZ) eragindako konbultsioak ere prebenitzeko gai dela frogatu da (Manna eta Umathe, 2012), TRPV1 hartzailea ezabatuta duten saguetan gertatzen den bezala (Kong et al., 2014). Bitxia bada ere, TRPV1ren espresioak nabarmen gora egin zuen loki lobuluaren epilepsia duten karraskarien eta pazienteen hipokanpoan eta kortexean (Bhaskaran eta Smith, 2010; Sun et al., 2013). Oro har, datu horiek iradokitzen dute hipokanpoan TRPV1 kanalak eginkizun garrantzitsua izan dezakeela epilepsian; izan ere, TRPV1ren aktibazioak epileptogenesia areagotzen du, eta TRPV1ren antagonismoak, berriz, ondorio onuragarriak ditu konbultsioen aurrean (Fu et al., 2009).

2- Lan hipotesia

Lan-hipotesia

Bi hamarkada baino gehiago igaro dira hartzaille kanabinoide nagusiak (CB₁R eta CB₂R) eta haien mekanismo farmakologikoak identifikatu zirenetik (Matsuda, 1997; Howlet eta Mukhopadhyay, 2000). Horrez gain, nerbio sistema zentralean zein periferikoan kannabinoide efektu ugari deskribatu eta ezaugarritu badira ere, ekintza farmakologiko batzuk ezin izan dira bi hartzaille horien aktibazioagatik soilik azaldu, izan ere, hartzaille baten edo bien generik ez dituzten lerro zelularretan edo sagu mutanteetan kannabinoide motako hainbat ekintza aurkitu dira. Horrekin bat etorritik, kannabinoideak beste hartzaille mota batzuek aktibatzen direla frogatu da, horien artean zenbait estekatzaile bidez aktibatutako kanal ionikoak (De Petrocellis et al., 2017), gerora hartzaille kannabinoide ionotropikoak (ICRs) deitu direnak (Akopian et al., 2009). Hartzaille kannabinoide ionotropikoen barruan (ICRs), potentzial aldakorreko kanalen familiako kideek (TRP) zeregin garrantzitsua betetzen dute beste batzuekin alderatuta, TRPV, TRPM eta TRPA azpifamilien kanalak gehienbat (De Petrocellis et al., 2017). Kanal horiek, mintzean zeharreko katioien fluxua gradiente elektrokimikoen bidez doitzen dute, kaltzioaren eta sodioaren zelula barneko kontzentrazioak areagotuz (Montell, 2005). Ugaztunen zeluletan identifikatutako lehen kanaletako bat, eta beraz, gehien ikertutakoa ere, TRPV1 kanala izan da (Nilius eta Szallasi, 2014). Ebidentzia ugari kanal horren eta kannabinoide hartzaileren arteko elkarreraginen konplexutasuna deskribatu dute. Elkarreragin horiek, bi norabideko gisa definitu dira, inhibitzaileak edo kitzikatzaileak, akutuak edo kronikoak dira, eta, gainera, ultraegitura mailan gertatzen dira, funtzionaltasunari erekin (Zador eta Wollemann, 2015).

Bihurgune horzduneko molekula-geruzan, CB₁Rak bukaera sinaptiko glutamatergikoetan eta gabaergikoetan agertzen dira, batez ere kokapen presinaptikoan baina ez eskusiboki, eta astrozitoetan baita ere (Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017; Bonilla-Del Río et al., 2019). TRPV1 hartzailleak berriz, sinapsi glutamatergiko eta gabaergikoetako alde postsinaptikoan agertzen dira batez ere (Puente et al., 2015; Canduela et al., 2015). Gainera, CB₁R eta TRPV1 hartzailleak molekula-geruzan, plastikotasun sinaptiko mota desberdinak erregulatzen dituztela frogatu da (Chavéz et al., 2011; 2014; Peñasco et al., 2019). Kontutan hartuta bi hartzailleek molekula bereberekin elkarreragiten dutela, tesi honetako lan-hipotesia hartzailleetako edozein ez egoteak ECSren osagaietan konpentsazio-mekanismo batzuk eragin beharko lituzkeela izan zen, baldintza fisiologikoetan zirkuitu neuronalen bidezko informazioaren prozesamenduan eragina izan beharko luketenak.

Lan-hipotesia

Hipotesi hori TRPV1 kanalaren ezabatze genetikoa daraman sagu eredu batean probatu dugu. Tresna biokimikoak erabili ditugu ECSren proteinen adierazpena zehazteko; analisi immunohistokimikoak CB₁Ren banaketan eman daitekeen ultraegitura mailako berrantolaketa deskribatzeko; teknika elektrofisiologikoak CB₁Rk bideratutako transmisio sinaptikoa eta plastikotasuna ebaluatzeko; eta portaera-probak hipokanpoarekin lotutako jokabideak ebaluatzeko. Azkenik, TRPV1-KO saguen erantzuna kainato bidezko konbultsio-ereduan aztertu da.

3- Helburuak

Helburuak

Lan honen helburu nagusia TRPV1 hartzailaren ezabapen genetikoaren eragina zehaztea izan da, bihurgune horzdunaren molekula-geruzan, CB₁R-ren adierazpenean eta funtzioan. Ikerketa honetarako, diziplina anitzeko estrategia bat prestatu dugu, biokimikako, anatomiako, elektrofisiologiako eta portaerako teknika ugari konbinatuz. Doktore-tesi honen helburu zehatzak hauek izan dira:

1. Endokannabinoiden sistemaren osagaiek TRPV1-KO saguen hipokanpoan duten adierazpen orokorra aztertzea, argi-mikroskopiarako immunoperoxidasa-metodo baten eta western blot tekniken bidez.
2. TRPV1-KO saguen bihurgune horzduneko molekula-geruzako CB₁R-ren banaketa ezartzea, kokapen zelularretan zein azpizelularretan, mikroskopia elektronikorako urre bidezko erretxinan murgildu aurreko immunomarkaketa-metodo baten bidez.
3. TRPV1-KO saguen bihurgune horzdunaren molekula-geruzako plastikotasun sinaptikoaren aldaketak eta haren oinarrian dauden mekanismoak ezaugarritzea, korrante postsinaptikoen zelulaz kanpoko erregistro elektrofisiologikoen bidez.
4. Hipokanpoarekin lotutako jokabideak ebaluatzea, TRPV1-KO saguen portaera-probak eginez
5. Azido kainikoak eragindako konbultsio epileptimorfeak ebaluatzea TRPV1-KO saguetan.

4- Material eta metodoak

4.1- Animaliak

Esperimentuak, Sinapsiaren neuroanatomia funtzional eta ultrastruktureko laborategian egin ziren, Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko, Neurozientziak Sailean. Protokolo guztiak UPV/EHUko Animalien Ongizaterako Etika Batzordeen oniritzia zuten (CEEA/M20/2015/105; CEIAB/M30/2015/106), eta bat zetozen Europar Batasuneko Kontseiluaren 2010eko irailaren 22ko Zuzentarauarekin (2010/63/EU) eta Espainiako araudiarekin (53/2013 Errege Dekretua, 2013-02-08ko BOE). Ahalegin guztiak egin ziren mina eta sufrimendua ahalik eta gehien murrizteko, eta erabilitako animalia kopurua baxuena izateko. Esperimentuak egiteko, 6 eta 8 aste bitarteko sagu mutante helduak (TRPV1^{-/-}) eta kumaldi bereko mutaziorik gabeko kideak (WT) erabili ziren. Sagu horiek umatze-bikote heterozigotoen ondorengoak ziren, B6.129X1-Trpv1tm1Jul/j (The Jackson Laboratory) eta C57BL/6j (Janvier-labs) saguen arteko gurutzaketatik sortuak, Bizkaiko Campuseko Animaliategi zerbitzu orokorreko instalazioetan. Erabilitako animalia guztiak Unibertsitateko “Sekuentziazio eta genotipo azterketen unitatea” SGiker zerbitzu orokorrean genotipatu zituzten.

Saguak, gehienez ere, binaka edo hiru saguko taldetan kaiolatu ziren, plexiglas estandarreko kaiolatan (17 cm × 14,3 cm x 36,3 cm), gutxienez, astebetez, esperimentuak hasi aurretik ingurunera egokitzeko. Animaliak esperimentu guztietan zehar baldintza estandarretan mantendu ziren *ad libitum* janari eta iturriko urarekin, eta tenperatura konstantedun gela batean (22 °C). Saguak 12/12ko argi/iluntasun-zikloan egon ziren, argiak gaueko 9:00etan itzalita zeudelarik. Portaera-esperimentuak saguen argi-fasean egin ziren, goizeko 9:30etik 15:00etara bitartean.

4.2- Antigorputzak

Antigorputz primarioak dagozkien antigorputz sekundarioekin konbinatuta erabili ziren honako teknika hauetarako: argi mikroskopiarako immunoperoxidasa metodoa (LM); urre bidezko erretxinan murgildu aurreko immunomarkaketa metodoa mikroskopia elektronikorako (EM) immunoperoxidasa metodoarekin konbinatuta eta Western blot (W.B) teknikorako.

4.2.1- Antigorputz primarioak (1. Taula)

Antigorputza	[Kontzentrazioa]	Fabrikatzailea; espezia; mota, katalogo zenbakia; RRID
Anti-cannabinoid receptor type-1 (CB ₁ R)	2 µg / ml IHC	Frontier Institute co., ltd; ahuntza, poliklonala; CB1-Go-Af450; AB_2571592
Anti-cannabinoid receptor type-1 (CB ₁ R)	0.2 µg / ml W.B	Frontier Institute co., ltd; untxia, poliklonala; CB1-Rb-Af380; AB_2571591
Anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP)	20 ng/ ml IHC	Sigma-Aldrich; sagua, monoklonala; G3893; AB_257130
Anti-Gephyrin	4 µl/ ml IHC	Synaptic Systems; sagua, monoklonala; 147021; AB_2232546
Anti-monoacylglycerol lipase (MAGL)	2 µg/ ml IHC 0.2 µg/ ml W.B	Frontier Institute co, ltd; untxia, poliklonala; MGL-Rb-Af200; AB_2571798
Anti-diacylglycerol lipase alpha (DAGL α)	2 µg/ ml IHC 0.2 µg/ ml W.B	Frontier Institute co, ltd; untxia, poliklonala; DGLa-Rb-Af380; AB_2571691
Anti- N-acetylphosphatidylethanolamine-hydrolysing phospholipase D (NAPE-PLD)	4 µg/ ml IHC 0.2 µg/ ml W.B	Frontier Institute co, ltd; akuria, poliklonala; NAPE-PLD-Gp-Af720; AB_2571806
Anti-fatty acid amide hydrolase (FAAH)	1 µg/ ml IHC 0.2 µg/ ml W.B	Cayman Chemical; untxia, poliklonala; 101600-1; AB_327842
Anti-CNRIP1 (Y-12)	0.4 ng / µl W.B	Santa Cruz Biotechnology; untxia, poliklonala; sc-137401; AB_10709018
Anti-Go	0.04 ng/ µl W.B	Santa Cruz Biotechnology; untxia: K-20; AB_2314438
Anti-Gi1	0.2 ng/ µl W.B	Santa Cruz Biotechnology; untxia poliklonala; sc-391, AB_2247692
Anti-Gi2	0.2 ng/ µl W.B	Santa Cruz Biotechnology; untxia poliklonala; sc-7276, AB_2111472
Anti-Gi3	4 pg/ µl W.B	Santa Cruz Biotechnology; untxia poliklonala; sc-262, AB_2279066
Anti-actin	0.2 µg/ ml W.B	Sigma-Aldrich; untxia poliklonala; A2066; AB_476693
Anti-PLC β	42 pg/ µl W.B	BD Biosciences; sagua monoklonala; 610924, AB_398239

4.2.2- Antigorputz sekundarioak (2. Taula)

Antigorputza	[Kontzentrazioa]	Fabrikatzailea;; katalogo zenbakia; RRID
Biotinilatutako saguaren aurkako antigorputza	7.5 µg/ ml ICH	Vector Labs; BA-2000; AB_2313581
Biotinilatutako ahuntzaren aurkako antigorputza	7.5 µg/ ml ICH	Vector Labs; BA.5000; AB_2336126
Biotinilatutako untxiaren aurkako antigorputza	7.5 µg/ ml ICH	Vector Labs; BA-1000; AB_2313606
1.4 nm-tako urre partikulari atxikitutako ahuntzaren aurkako IgG antigorputza (Fab' zatiarekin)	0.8 µg/ ml ICH	Nanoprobes Inc; ; Cat-2005; AB_2617133
Ahuntzean eginiko akuriaren aurkako HRPar atxikitutako IgG antigorputza	1 ng/ ml W.B	Bioss; bs-0358G; AB_10860553
Ahuntzean eginiko untxiaren aurkako HRPar atxikitutako IgG antigorputza	1 ng/ ml W.B	Cell Signalling Technology; 7074; AB_2099233
Untxian eginiko ahuntzaren aurkako HRPar atxikitutako IgG antigorputza	1 ng/ ml W.B	Sigma-Aldrich; untxi poliklonala; A5420, AB_258242
Ardian eginiko saguaren aurkako HRPar atxikitutako IgG antigorputza	1 ng/ ml W.B	GE Healthcare; ardia; NA9310, AB_772193

4.3- Botikak

Elektrofisiologiarako botika guztiak dimetilsulfoxidoan (DMSO; Sigma-Aldrich) disolbatu ziren, eta amaierako kontzentrazioan gainperfusio-medioari gehitu zitzaizkion (3. taula).

Hipokanpoaren barne-administrazioarako kainato-dosia prestatzeko, azido Kainikoa (KA) % 0.9ko sodio klorurozko gatz-disoluzioan disolbatu zen.

4.3.1- Elektrofisiologiarako botikak (3. Taula)

Botika	Deskribapena	Erabilera kontzentrazioa	Inkubazio epea	Hornitzailea
Pikrotoxina (PTX)	GABA _A hartzaileen antagonista	[100 µm]	Neurketa osoan zehar	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua)
AM251	CB ₁ R-ren antagonista	[4 µm]	20 min inkubazio gehigarria	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma

Material eta metodoak

	indartsua eta GPR55 hartzaillearen agonista		neurketa baino lehen	Batua)
WIN 55.212-2	Hartzaille kannabinoideen agonista indartsua	[5 µm]	20 min inkubazio gehigarria neurketa baino lehen	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua)
CP 55.940	Hartzaille kannabinoideen agonista indartsu orokorra	[10 µm]	Neurketa osoan zehar	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua)
JZL 184	MAGL entzimaren inhibitzaile indartsu eta selektiboa	[50 µm]	Ordu beteko inkubazio gehigarria neurketa baino lehen	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua)
URB597	FAAH entzimaren inhibitzaile indartsu eta selektiboa	[2 µm]	20 min inkubazio gehigarria neurketa baino lehen	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua)
THL	DAGLα entzimaren inhibitzaile indartsua	[10 µm]	20 min inkubazio gehigarria neurketa baino lehen	Santa Cruz Biotechnology Inc (Espainia)
AMG9810	TRPV1 kanalren antagonista	[3 µm]	Neurketa osoan zehar	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua)
D-APV	NMDA hartzaillearen antagonista selektibo eta indartsua; DL-APV-ren forma aktiboa	[50 µm]	Neurketa osoan zehar	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua)
Latrunculin A	G-aktina monomero polimerizazioaren inhibitzailea	[0.5 µm]	20 min inkubazio gehigarria neurketa baino lehen	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua))
LY 354740	mGluR-II hartzaillearen agonista indartsua	[100 µm]	Neurketa osoan zehar	Tocris BioScience (Bristol, Erresuma Batua)

4.4- Prozedura immunohistokimikoak

4.4.1- Sagu-burmuin ehunaren kontserbazioa

Kumaldi bereko TRPV1-KO eta WT saguak (baldintza bakoitzetik hiru gutxienez), peritoneo barneko ketamina/xilazina nahasketa baten bidez (80/10 mg/kg gorputz-pisua) sakonki anesthesiatu ziren.

Bihotzean zeharreko perfusioa egin zen ezkerreko benterikulutik, lehenik, gatz fosfato-disoluzio bat pasaraziz (0.1 M PBS, pH 7.4) giro tenperaturan 20 segundoz, eta, ondoren, osagai hauek dituen hoztutako disoluzio finkatzailea pasarazi zen: % 4 formaldehidoa (unean paraformaldehidotik despolimerizatua), % 0.2 azido pikrikoa eta % 0.1 glutaraldehidoa, dena fosfato-gatzezko disoluzioan disolbatuta (0.1 M PBS, pH 7.4). Gero, garunak kontu handiz atera ziren garezurretik, eta ondoren, aste batez, finkatze-soluzioan murgildu ziren, 4°C-tara mantenduz. Ondoren, garunak 0.1 M-eko tanpoi fosfatozko (PB) disoluzio finkatzaile diluitu batean (4 °C-tan) biltegitatu ziren, harik eta erabili arte. Disoluzio horri % 0.025 sodio azida gehitu zitzaion kontserbaziorako.

4.4.2- Mikroskopia optikorako Avidina-Biotina peroxidasa metodoa

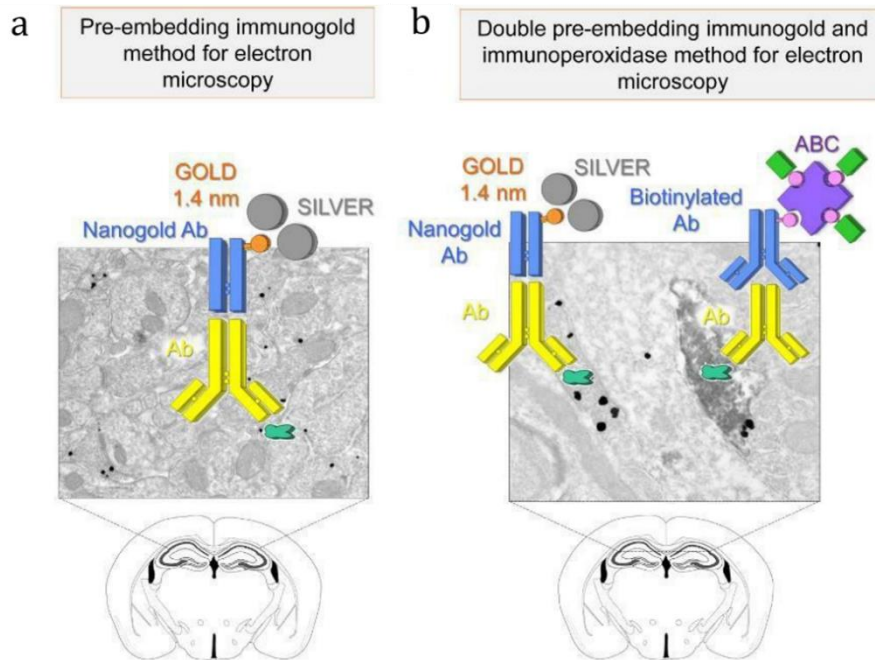
Metodo immunohistokimiko horrek avidina-biotina konplexua (ABC) erabiltzen du alde zurretik gehitutako antigorputz biotinilatu sekundarioaren seinalea amplifikatzeko. Lehenik, antigorputz honek intereseko proteina identifikatzeko erabiltzen den antigorputz primarioa ezagutu duelarik. ABC teknika hori, biotinari lotzen zaion peroxidasa eta avidina nahastean datza, eta erabiltzen den proportzio horretan, avidinari biotina lotzeko zenbait leku libre geratzen zaizkio. Antigorputz sekundarioaren biotina, avidinaren balentzia askeekin elkartzean, AB konplexuak eratzen ditu. Konplexu horiek elkarren segidan elkartzen dira, eta antigorputz sekundarioaren seinalea indartzen dute. Horrez gain, 3,3'-diaminobenzidina (DAB) seinale hau ikusarazteko erabiltzen da. Kromogeno hori hidrogeno peroxidoa duen ingurune batean oxidatzen da, eta prezipitazio marroi gorri bat sortzen du. AB konplexuaren peroxidasak hidrogeno peroxidoaren deskonposizio-erreakzioa katalizatzen duenean eta oxigeno askeko espezieak eratzen ditutenean, prezipitazioa agertzen da. Positibo faltsuak baztertzeko, aldi bereko kontrol negatiboak egin ziren esperimentu guztietan. Hauek dira protokoloan jarraitutako pausuak:

Material eta metodoak

1. Burmuina bibrotomoz egindako 50 μm -ko lodierako koroa-ebaketetan moztu zen (Leica VT 1000s), eta giro tenperaturan (RT) 0.1 M-ko tanpoi fosfatoan (PB, pH 7.4) bildu ziren.
2. Hipokanpo ebakinak aurrez inkubatu ziren blokeo-soluzio batean 30 minutuz RTn: % 10 behi albumina (BSA), % 0.1 sodio azida, eta % 0.5 X-100 tritoi dituen tris-hidrogeno kloruroz bahetutako gatz-disoluzioan (TBS 1X, pH 7,4) .
3. Ondoren, ebakinak dagokien antigorputz primarioan inkubatu ziren (1. taula). Blokeo-soluzioan prestatu ziren, eta 2 egunez 4°C-tan emeki mugitzen mantendu ziren, blokeo-soluzioan soilik inkubatutako kontrol negatiboekin.
4. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen (30 minutuz), gehiegizko antigorputza kentzeko garbiketa-soluzio bat erabiliz: BSA % 1ean eta X-100 trittoa % 0.5ean, 1X TBSn disolbatuta.
5. Ebakinak garbiketa-soluzioan prestatutako antigorputz sekundario biotinilatuearekin inkubatu ziren (1:200) (2. taula) ordubetez RTn, garbiketa-soluzioan prestatuta, etengabeko mugimendu konstante batean.
6. Berriro ere, ehuna hainbat aldiz garbitu zen garbiketa-soluzioan.
7. Ebakinak avidina-biotina konplexuan (1:50; avidina-biotina peroxidasa konplexua, Elite, Vector Laboratories, Burlingame, CA, AEB) inkubatu ziren ordu batez RTn, garbiketa-soluzioan prestatuta.
8. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen lehenik garbiketa-soluzioan, eta azken garbiketak 0.1 M PBa eta % 0.5 X-100 trittoa dituen disoluzio bat erabiliz egin ziren.
9. Ehunak 5 minutuz inkubatu ziren DABa % 0.05ean, hidrogeno peroxidoa % 0.01ean eta X-100 trittoa % 0.5ean dituen 0.1 M PBtan prestatutako disoluzioan.
10. Ehunak behin baino gehiagotan garbitu ziren X-100 tritoi % 0.5eko proportzioan duen 0.1 M PB disoluzioan.
11. Laginak alde zurretik gelatinizatutako portetan muntatu ziren.
12. Ebakinak alkohol gradiente gorakor batean deshidratatu ziren, eta portak 5 minutuz mantendu ziren graduazio bakoitzeko (50°, 70°, 96° eta 100°).
13. Portak xilolez argitu ziren (3 x 5 min).
14. Ebakinak, DPXa medio gisa erabiliz estali ziren. Azkenik, laginak aztertu eta argazkiak atera ziren Zeiss Axiocam mikroskopio konposatu batekin, mikroskopiora akoplaturiko Zeiss AxioCamHRc kamerari esker.

4.4.3- Erretxinan murgildu-aurreko urre bidezko immunomarkaketa simplea eta erretxinan murgildu-aurreko urre eta peroxidasa bidezko immunomarkaketa konbinatua mikroskopia elektronikorako

Teknika horretan, urrezko partikula nanometrikoak erabiltzen dira proteinen kokapena deskribatzeko ultraegitura mailan (Baude et al., 1993; Lujan et al., 1997; Mateos et al., 1999; Elezgarai et al., 2003; Puente et al., 2010a, 2010b; Reguero et al., 2011, 2014; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017, 2018; Puente et al., 2019). Tesi-lan honetan, CB₁R-ren kokapen zelularra eta azpizelularra deskribatzeko urrezko partikulen bidezko immunomarkaketa erabili da. Immunomarkaketa bikoitzen kasuan, antigorputz sekundarioetako bat 1.4 nm-ko urrezko partikula batekin konjugatutako Fab' frakzio bat den bitartean, bigarrena, antigorputz biotinilatu bat da, aldi bereko bi markaketa ahalbidetuz. Urezko partikulen tamaina txikiak ehunean sakonago sartzea ahalbidetzen du, eta, beraz, metodoaren sentikortasuna handia da. Gainera, aldi berean bigarren epitopo bat identifikatuz gero, bi proteinak batera ikusi daitezke, eta, hala, hobeto identifika daitezke astrozitoak eta mikroglia esaterako (1. irudia). Horrez gainera, antigorputza eta epitopoaren arteko lotura, osmio tetroxidoaren eraginpean egon aurretik eta erretxina tenperatura altuetan polimerizatu aurretik gertatzen denez, erretxinan murgildu-aurreko metodoak mikroskopia elektronikoko beste metodo batzuek baino hobeto mantentzen ditu antigeno-antigorputz erreakzioak. Esperimentu bakoitzean aldi bereko kontrol negatiboak egin ziren.



1. irudia: Mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunomarkaketa sinplearen (a) eta konbinatuaren (b) metodoan antigorputzen erreakzioak nola funtzionatzen duen adierazten duen irudia. Puente eta lankideen (2019) lanetik egokitua.

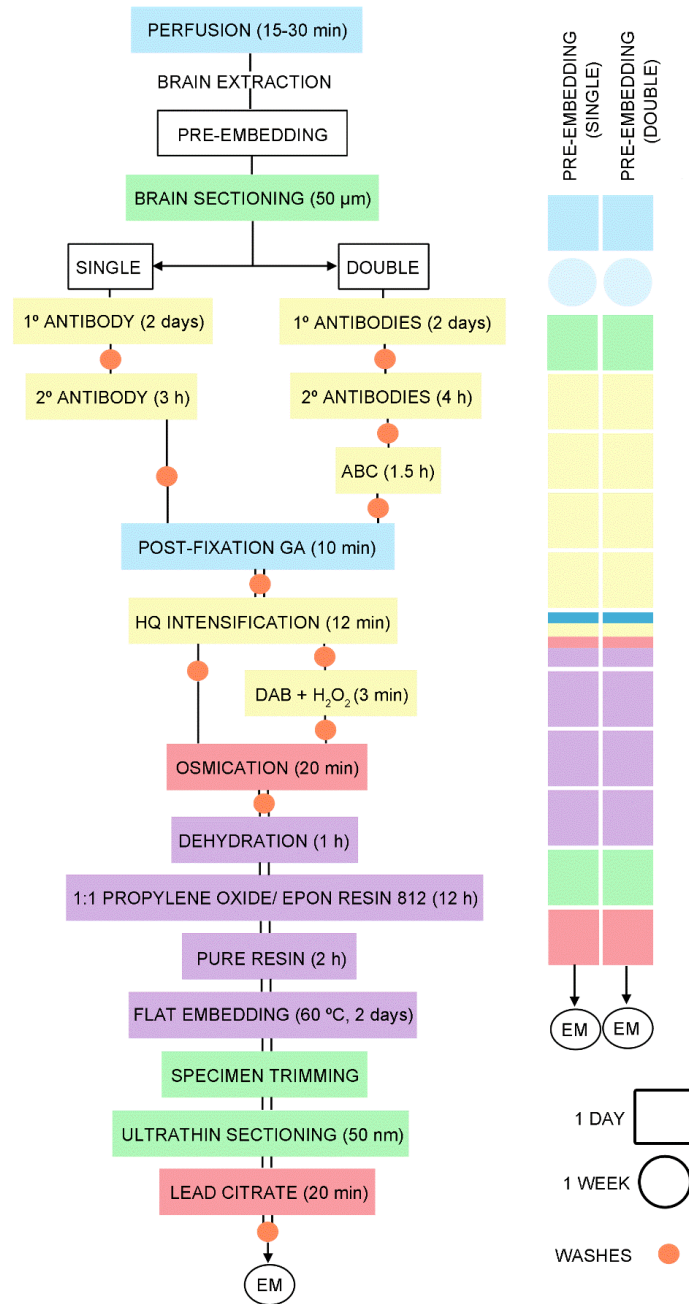
Protokolo hau aplikatu zen (2. irudia):

1. Burmuina bibrotomoz egindako 50 µm-ko lodierako koroa-ebaketetan moztu zen (Leica VT 1000S), eta 0.1 M-ko tanpoi fosfatoan (PB, pH 7.4) bildu ziren RTn.
2. Hipokanpo ebakinak aurrez inkubatu ziren blokeo-soluzio batean 30 minutuz RTn: % 10 behi-albumina (BSA), % 0.1 sodio azida, eta % 0.02 saponina dituen eta tris-hidrogeno kloruroz bahetutako gatz-soluzioan (TBS 1X, pH 7.4).
3. Jarraian, ebakinak dagokien antigorputz primarioan (1. Taula) inkubatu ziren: ahuntzean eginiko anti-CB₁R antigorputz poliklonala (1:100) bakarrik edo beste antigorputz batekin batera immunomarkaketa bikoitzen kasuan, hala nola, sagan garatutako anti-Gephyrin antigorputz monoklonala (1:300) edo saguaren anti-GFAP antigorputz monoklonala (1:1000). Horiek, blokeo-soluzio ezberdin batean (% 10 behi-serumaren albumina (BSA), % 0.1 sodio azida eta % 0.004 saponina dituen eta tris-hidrogeno kloruroarekin bahetutako gatz-disoluzioan (TBS 1X, pH 7.4)) prestatu eta 2 egunez 4°C-tan emeki mugitzen mantendu ziren, blokeo-soluzioan soilik inkubatutako kontrol negatiboekin.

4. Ehunak % 1 BSA duen TBS 1X gatz-disoluzioan prestatutako garbiketa-soluzio batekin garbitu ziren 30 minutuz.
5. Ebakinak nanourrea zuen antigorputz sekundarioan inkubatu ziren (2. Taula), eta immunomarkaketa bikoitzaren kasuan, antigorputz sekundario biotinilatuarekin batera. Bi antigorputz sekundarioak % 1 behi-serumaren albumina (BSA), % 0.1 sodio azida eta % 0.004 saponina dituen 1X TBS (pH 7.4) blokeo-soluzio batean prestatu ziren, eta 3 orduz mantendu ziren sinpleen kasuan eta 4 orduz bikoitzetan, RTn etengabeko mugimendu batean.
6. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen garbiketa-soluzioan (TBS 1X eta % 1 BSA) 30 minututan zehar.
7. Ondoren, immunomarkaketa bikoitzen kasuan, prozesatutako ebakinak garbiketa-soluzioan prestatutako avidina-biotina konplexuarekin (1:50) inkubatu ziren 1.5 orduz, etengabeko mugimenduan RTn.
8. Ehuna hainbat aldiz garbitu zen garbiketa-soluzioan, eta gau osoan utzi zen azken garbiketari, 4°C-tan zegoen irabiagailu batean.
9. Ebakinak 1X TBStan prestatutako % 1eko glutaraldehidoarekin finkatu ziren 10 minutuz RTn.
10. Ur ultrapuruarekin hainbat aldiz garbitu ziren 30 minututan zehar.
11. Urrezko partikulen seinalea areagotu egin zen HQ zilar-kitarekin (Nanoprobes Inc., Yaphank, NY, AEB).
12. Ehunak ur ultrapuruarekin garbitu ziren 10 minutuz.
13. Azken garbiketari 0.1 M PBtan (pH 7.4) egin ziren 30 minutuz.
14. Markaketa bikoitzen kasuan, ehunak % 0.05 DABA eta hidrogeno peroxidoa % 0.01ean dituen 0.1 M PBtan prestatutako soluzioan inkubatu ziren 5 minutuz RTn.
15. Tindatutako ebakinak 0.1 M PBtan prestatutako osmio tetraoxidoarekin osmifikatu ziren 20 minutuz RTn.
16. Ehunak behin baino gehiagotan garbitu ziren 0.1 M PBtan 30 minutuz.
17. Ebakinak deshidratatu egin ziran alkohol gradiente gorakor batean, 5 minutuz mantendu ziren graduazio bakoitzeko (50°, 70°, 96°) eta 15 minutuz 100°ekoan (3 aldiz 5') eta, azkenik, propileno oxidoarekin beste 15 minutuz (3 aldiz 5').
18. Sekzioak 1:1 proportzioa duen epoxi 812 erretxina eta propileno oxidoaren nahasketa batean murgildu ziren irabiagailu batean gau batez RTn.

Material eta metodoak

19. Ebakinak Epon 812 erretxinan murgildu ziren 2 orduz etengabeko mugimendu batean RTn.
20. Ehunak 60°C-tan zegoen labean sartu ziren 48 orduz, erretxina polimerizatzeko.
21. 50 nm-ko lodierako ebakin ultrafinak ultramikrotomo batean moztu ziren (RMC Products, PowerTome XL) eta nikelezko sareetan bildu ziren.
22. Sareak % 2.5 berunezko zitratoan kontrastatu ziren 20 minutuz RTn.
23. Azkenik, laginak mikroskopio elektronikoan aztertu eta argazkiak atera ziren. Bi mikroskopio elektroniko erabili ziren: Philips EM208S eta JEOL JEM 1400 plus. Phillips EM208S mikroskopio elektronikoak argazki kamera digital bat du integratuta, Olympus markako MORADA kamera hain zuzen, eta lortutako mikrografiak 22,000x handipenekoak izan ziren, bakoitzean hartutako azalera 20 μm^2 -koa delarik. JEOL mikroskopio elektronikoak bere kamera propio darama, kasu horretan eginiko argazkiak 8.000x handipeneko 16 argazkiko konposizioak izan ziren, 300 μm^2 -ko azalera bat hartuz, Morada kamerarekin hartutako 15 mikrografien baliokidea.



2. irudia: Erretxinan murgildu-aurreko mikroskopia elektronikorako teknikaren urrats orokorren kronologia. Puente eta lankideen lanetik (2019) egokitua.

4.4.4- Azterketa semi-kuantitatiboa

TRPV1KO eta WT animalia mota bakoitzeko hiru sagutan lortutako immunohistokimika-teknikekin prozesatutako ehunen hipokanpoak bistarazi ziren mikroskopia konposatuan, eta bihurtune

Material eta metodoak

horzdunaren geruzak identifikatu eta isolatu ziren ziren: IML eta MLko kanpoko 2/3ak, PParen amaiera-eremuari dagozkionak.

Aukeratutako eremuek CB₁R-ren, GFAParen eta gephyrinaren immunomarkaketa ona eta erreproduzigarria zuten, eta ultraegitura ona erakutsi zuten kuantifikazio fidagarri baterako. Gainera, analisiaren baldintzak are gehiago normalizatzeko, ehun sakoneraren lehen 1.5 µm-ak baino ez ziren behatu. Partikula metalikoak bukaera sinaptikoen mintzetan, mitokondrien kanpoko mintzetan eta astrozitoen mintzetan zenbatu ziren. Laginketa beti modu berean egin zen aztertutako sagu guztietan. Bukaera sinaptikoak identifikatzeko, ultraegitura mailako ezaugarriak eta kimikoak hartu ziren kontuan. Hots, sinapsi glutamatergikoak ezaugarritzen dituzten sinapsi asimetrikoek, dentsitate postsinaptiko lodiek eta besikula sinaptiko argi, esferiko eta ugariengatik identifikatu ziren. Sinapsi inhibitzaileak, bestalde, sinapsi simetrikoak osatzen dituzte, eta aktibo daudenean gephyrinaren immunomarkaketa erakusten dute (sinapsi mota honetan soilik agertzen dena); gainera, ohiko besikula sinaptiko pleomorfikoak dituzte. Baldintza bakoitzean CB₁R-rako bukaera sinaptiko positiboen proportzioa zehazteko, positibotzat jo da mintz presinaptikoan edo mintz plasmaticoan gutxienez urrezko partikula bat duen edozein amaiera sinaptiko, 30 nm-ko gehienezko distantziara.

Astrozitoak, zelula-profilen barruan GFAParen immunomarkaketaren produktua agertzen dutelako identifikatu dira (GFAP positibotzat joz). Image j (Fiji) software librea erabili da honako parametro hauek neurtzeko: CB₁R-rako bukaera sinaptiko positiboen ehunekoa; CB₁R-rako mitokondria positiboen ehunekoa; CB₁R-rako prozesu astrozitiko positiboen ehunekoa; CB₁R-ren partikulen dentsitatea bukaera sinaptikoen mintzetan eta prozesu astrozitikoen mintzetan; bukaera sinaptikoen perimetroa; azalerako bukaera sinaptikoen eta prozesu astrozitikoen kopurua, eta CB₁R-ren immunopartikulen guztizko adierazpenaren banaketa konpartimendu ezberdinetan. Desberdintasunen esangura estatistikoa Student-en t probaren edo Mann-Whitney-ren probaren bidez aztertu zen. Emaitzak batez bestekoa ± S.E.M. moduan adierazi ziren, software estatistiko pakete bat erabiliz (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, AEB). $p < 0.05$ balioak estatistikoki esanguratsutzat jo ziren.

4.5- Biokimika-metodoak

4.5.1- Hipokanpoko homogenatu osoen Western Blota

Saguak (7-8 bat talde bakoitzeko) isofluranoa (% 2-4) arnastuta anesthesiatu ziren burua moztu aurretik. Bi hemisferioen hipokanpoak eskuz disezionatu eta plastikozko makila batekin homogeneizatu ziren, 10 mM PB (pH 7.4), 5 mM etilenglicol-bis (2-aminoetileter) -N, N, N', N' azido tetraazetikoa, 5 mM azido etilen-diamino-tertaazetikoa, 1mM dithiotriol eta proteasa inhibitzaileen nahaste bat daraman (Erref. P-8340, Sigma-Aldrich) homogeneizazio-lisiaren buffer batean. Ondoren, laginak 30 minutuz eduki ziren tanpoiarekin izotzetan, eta 15 minutuz zentrifugatu ziren 13.000 rpm-tan. Zentrifugazio horretatik sortutako gainjalkina proteina disolbagarriaren aterakin gisa erabili zen, eta proteina kontzentrazioak Bio-Rad protein Assay tresna erabiliz neurtu ziren (Erref. 500-0006, Bio-Rad Laboratories SA). Proteina kopuru bera (15 µg) kargatu zen edozein kD-tako poliakrilamidazko geletan (Erref. 456-9036, Bio-Rad Laboratories Inc.). Elektroforesiaren ondoren (150 V-tara 60 minutuz), laginak 3 minutuz transferitu ziren polibinilideno difluorurozko mintz batera (PVDF) (Erref. 170-4157, Transfer Pack Trans-Blot Turbo, Bio-Rad Laboratories Inc.), Trans-Blot Turbo (Bio-Rad) sistema erabiliz. Mintzak blokeo-soluzio batean murgildu ziren 2 orduz. Disoluzio hori TBS-T indargetzaile batek (tris-hidrogeno kloruroarekin indargetutako gatz disoluzioa) (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl) eta % 0.1 Tween-20a eta % 5eko gaingabetutako esnearen hautsak (Sveltesse, Nestle) osatzen dute.

Gau oso batez inkubatu zen antigorputz primarioarekin (anti-CB₁R; anti-MAGL eta anti-FAAH), 4°C-tan, 1:1000 diluzioan. Hainbat garbiketa egin ondoren, mintzak ordubetez inkubatu ziren peroxidasari lotutako antigorputz sekundarioarekin, 1:2000 diluzioan. Immunoblota kimioluminiszentzia bidez bistaratu zen (Erref. Li-Cor, Bonsai Advanced Technologies SL) eta dentsitometria bidez kuantifikatu zen Image Studio Lite 4.0 softwarea erabiliz (Li-Cor, Bonsai Advanced Technologies SL). Proteina-karga bera bermatzeko, blot mintzei garbiketa-tanpoi bat aplikatu zitzaion (100 mM-ko glizina, pH 2.3), garbitu egin ziren eta anti-aktina antigorputzarekin inkubatu (1:2000). Bi saguen arteko ezberdintasunen esangura estatistikoa Student t probaren edo Mann-Whitney probaren bidez aztertu zen. Esangura estatistikoa % 95eko konfiantza-mailan finkatu zen. Emaitzak batez bestekoa ± S.E.M. moduan adierazi ziren software estatistiko pakete

bat erabiliz (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc, San diego, AEB). $p < 0.05$ balioak estatistikoki esanguratsutzat jo ziren.

TRPV1 hartzailearen ezabapen genetikoak ECSrengan dituen ondorioen azterketan sakontzeko, honako teknika hauek aplikatu ziren Joan Sallés Alvira doktorearen laborategiarekin lankidetzan (Farmakologia Saila, Farmazia Fakultatea, UPV/EHU, Gasteiz, CIBERSAM). CB₁R-ren, MAGL, FAAH, DAGL α , NAPE-PLD, CRIP1a eta Gi/o α azpiunitateen western blot analisiak egin zituzten hipokanpoko mintzetan (P2 frakzioa) eta sinaptosometan, bai eta [³⁵S] GTP γ S binding saiakuntzak sinaptosometan ere. Lortutako emaitzak hemen deskribatzen dira Joan Sallés Alvira doktorearen, Gontzal García del Caño doktorearen eta Miquel Saumell Esnaolaren baimenarekin.

4.5.2- Hipokanpo-sinaptosomen Western Blota

8 asteko saguen (WT eta TRPV1-KO) hipokanpo-sinaptosomak aurretik Dodd eta lankidek (1981) deskribatu bezala prestatu ziren, aldaketa txiki batzuekin (Garro et al., 2001). Saguak isofluranoarekin anestesiatu eta burua moztu zitzaizen; berehala atera zen garuna, eta 0.32 M-eko hoztutako sakarosazko disoluzio batean murgildu zen, pH 7.4, 80 mM Na₂HPO₄ren, 20 mM NaH₂PO₄ren (sakarosazko fosfato tanpoia) eta proteasaren inhibitzaileekin (50 mM Iodoacetamida eta 1 mM PMSF). Ehuna sakarosa-fosfatozko 10 tanpoi-bolumenetan txikitu eta homogeneousatu zen. Ehuna sakarosa-fosfatozko 10 tanpoi bolumenetan homogeneousatu zen, beirazko Potter Evelhem baten eta teflonezko enbolo batetara aklopaturiko homogeneousagailu motorizatu bat erabiliz (motorraren abiadura 800 b/min; goranzko eta beheranzko 10 kolpe; une oro, morteroa izotz-ur nahasketa batean hoztuta) birrindu zen. Homogeneousatua 1.000x g-ra zentrifugatu zen 10 minutuz, eta lortutako pelleta (P1) berriro esekitu eta peletizatu zen. Gainjalkinak (S1 + S1' frakzioak) 15.000x g-ra (P2) peletizatu ziren eta berriro homogeneousazio-tanpoian esekitu, 16 ml-ko azken bolumenean. P2 frakzio hori populazio heterogeneoa da, eta mielina zatiak, sinaptosomak eta mitokondria askeak dituena. Esekidura zuzenean 8 ml sakarosa-fosfatozko tanpoia (1.2 M) zuten hodietan jarri zen, eta 180.000x g-ra zentrifugatu zen 20 minutuz. Gradiente-interfazeaz atxikitako materiala (sinaptosoma + mielina + mikrosoma) kontu handiz jaso zen Pasteur pipeta batekin, eta 0.32 M-ko sakarosa-fosfatozko tanpoi hotzarekin diluitu zen, 16 ml-ko azken bolumenean. Jarraian, esekidura diluitua 8 ml-ko sakarosa-fosfatozko tanpoian (0.8 M) jarri zen, eta zentrifugatu egin zen, lehen deskribatu bezala. Lortutako pelleta, berriz ere,

tanpoi fosfato izoztuarekin (pH 7.5) esekitu zen, eta mikrozentrifugazio-hodietan alikuotatu zen. Ondoren, alikuotak 40.000x g-ra zentrifugatu ziren 30 minutuz, gainjalkinak jaso ziren eta nerbio-bukaeren mintzei dagozkien pelletak -80°C-tan biltegitatu ziren. Proteina-edukia Bio-Rad koloratzaile-erreaktiboa erabiliz zehaztu zen, behiaren γ -globulina estandar gisa erabiliz.

Western blota aurretik deskribatu bezala egin zen, aldaketa txiki batzuekin (Garro et al., 2001; López de Jesús et al., 2006). Labur-labur, hipokanpo-sinaptosomen frakzioak urea-tanpoi desnaturalizatzaile batean irakin ziren (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, % 12 glizerola, % 12 urea, % 5 ditiotreitola, % 2 sodio dodezil sulfatoa (SDS), % 0.01 bromofenol urdina) 5 minutuz.

Desnaturalizatutako proteinak elektroforesiaren bidez zehaztu ziren SDS-poliakrilamida (SDS-PAGE) geletan, eta nitrozelulosa edo PVDF mintzetara transferitu ziren, 30 V-eko tentsio konstantean, gau oso batez, 4°C-tara. Mintzak % 5eko esne hauts gaingabetu, % 0.5 BSA eta % 0.1 Tween zituen gatz-disoluzio batean (TBS 1X) blokeatu ziren ordubetez, eta gauean zehar antigorputz primarioekin inkubatu ziren, 4°C-tan. Ondoren, blotak giro tenperaturan inkubatu ziren 1.5 orduz, blokeo-tanpoian diluitutako peroxidasarekin konjugatutako antigorputz sekundarioekin. Banda immunorreaktiboak ECL sistemarekin inkubatu ziren, fabrikatzailearen jarraibideen arabera. Esperimentu horietan, erregresio-linealen maldak konparatzeko metodoaren bidez aztertu ziren proteinen adierazpen erlatiboaren arteko aldeak, software estatistikoko pakete baten bidez (GraphPad Software Inc, San diego, AEB).

4.5.3- Agonista bidez estimulatutako [³⁵S] GTP_γS binding saiakuntzak

[³⁵S] GTP_γS binding saiakuntzak aurretik argitaratutako lanetan deskribatutako prozedurari jarraituz egin ziren (Barrondo eta Sallés, 2009; Casado et al., 2010). Labur-labur azalduz, hipokanpo-sinaptosomak desizoztu eta inkubazio-tanpoian inkubatu ziren 30°C-tan, 2 orduz (0.5 nM [³⁵S] GTP_γS, 1 mM EGTA, 3 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.2 mM DTT, 50 μM GP, % 0.5 BSA eta 50 mM Tris-HCl, pH 7.4). CB₁R-ren CP 55.940 agonista (10⁻⁹ - 10⁻⁵ M) gehitu zen estimulazio bidezko hartzailearen [³⁵S] GTP_γS lotura zehazteko. Lotura ez-espezifikoa, hau da, oinarrizko lotura, erradiaktibitate gabeko [³⁵S] GTP_γS 10 μM-ren presentzian definitu zen. Agonistarik ez dagoeneko kasuan, oinarrizko lotura [³⁵S] GTP_γS lotura espezifikoa zela onartu zen. Erreakzioa,

Material eta metodoak

hutsaldi azkar baten bidez eta Whatman GF/B beira-zuntzeko iragazkien bidez gelditu zen, eta gainerako erradioaktibitatea, eszintilazio-espektrofotometria likidoaren bidez neurtu zen.

[³⁵S] GTPγS binding saiakuntzen datuak aztertzeko, CP 55.940 kontzentrazio-erantzun kurbak erregresio ez-linealaren bidez egokitu ziren lau parametroko Hillen ekuaziora.

$$E = \text{Oinarrizkoa} + E_{\text{max}} \cdot \text{Oinarrizkoa} / (1 + 10^{(\text{Log EC}_{50} - \text{Log [A]}) \cdot nH})$$

Non E-k efektua adierazten duen, log [A] agonistaren kontzentrazioaren logaritmoa, nH erdiko puntuaren malda, Log EC₅₀ erdiko puntuaren kokapen-parametroaren logaritmoa, eta E_{max} eta oinarrizkoaren goiko eta beheko asintotak, hurrenez hurren. [³⁵S] GTPγS binding saiakuntza guztiak hirukoiztuta egin ziren, eta emaitzak hiru esperimentu independente horietatik lortu ziren. Datuak batez bestekoa ± S.E.M. gisa adierazten dira. Datu esperimentalak prozedura iteratibo konputarizatu baten bidez aztertu ziren (GraphPad Prism 6.0 bertsioan), datuak zuzenean aurrez deskribatutako eredu matematikora egokituz. E_{max} balioen eta pEC₅₀-en arteko diferentzien esangura estatistikoa Student t probaren, eta Tukey-Kramer konparazio anizkoitzeko probaren bidez aztertu zen. Esangura estatistikoa % 95eko konfiantza-tartean ezarri zen, software estatistiko pakete bat erabiliz (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, AEB).

4.6- *In vitro* elektrofisiologia

4.6.1- Ehun-xerren prestaketa

Saguak isofluranoarekin (% 2-4) anestesiatu ziren eta burua moztu zitzairen. Garunak berehala atera eta 4°C-ko sakarosa disoluzio batean murgildu ziren (mM-etan): 87 NaCl, 25 glukosa, 75 sakarosa, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 2.5 KCl eta 1.25 NaH₂PO₄. Bibratomoa (Leica Microsystems S.L.U.) burmuina koroa-xerretan (300 μm-tako lodieran) ebakitzeko erabili zen; xerrak jaso eta erregistro-ganberan kokatu aurretik garun-bizkarmuineko isurgarri artifizialean (aCSF) murgildu ziren (mM): 130 NaCl, 3 NaHCO₃, 11 glukosa, 1.2 MgCl₂, 2.4 CaCl₂, 2.5 KCl eta 1.2 NaH₂PO₄, % 95 O₂/ % 5 CO₂ duen gas nahastearekin batera. Esperimentu guztiak 32-35°C-tan egin ziren, eta Picrotoxina (PTX; 100 μM, Tocris Bioscience UK) aCSFra gehitu zen GABA_A hartzaileak blokeatzeko.

4.6.2- Zelulaz kanpoko jarduera elektrikoaren erregistroa

Zelulaz kanpoko neurona-eremu bateko potentzial postsinaptiko kitzikagarrien erantzunak (fEPSPak) hipokanpoaren bihurtune horzduneko molekula-geruzan erregistratu ziren. Estimulazio-elektrodoa (borosilikatozko beirazko kapilarra, Harvard UK 30-0062 GC100T-10 kapilarrak) MCFLan, MPPan edo LPPan, jarri zen, eta erregistratzeko borosilikatozko beira-kapilarra berriz, aCSFz beteta, betiere MCFLan kokatu zen. Elektrodoak MPPan behar bezala kokatzen zirela bermatzeko, mGluR2 hartzaileen LY354740 agonista indartsua aplikatu zen, aldez aurretik frogatu izan baita zehazki MPPko sinapsiak deprimitzen dituela irmoki, eta ez beste geruza batzuetakoak (Chavez et al., 2010). fEPSPak eragiteko, 0.1 Hz-ko kontrol-estimulu errepikakorrek aplikatu ziren, (Stimulus Isolater ISU 165, Cibertec, Espainia; Master-8 batek kontrolatua, A.M.P.I. isolamendu-unitate batekin). Axopatch-200B bat (Axon Instruments/Molecular Devices, Union City, CA, AEB) erabili zen 1-2 kHz-ra iragazitako datuak erregistratzeko, 5 kHz-ra DigiData 1440A interfaze batean digitalizatuak, PC batean jasoak Clampex 10.0 softwarea erabiliz eta Clampfit 10.0 softwarea baliatuz aztertuak (guztiak Axon Instruments/Molecular Devices-tik lortuak, Union City, CA, AEB) izan ziren. Esperimentu bakoitzaren hasieran sarrera-irteera kurba bat ezarri zen. Kurba hori kontrol estimuluaren intentsitatea aukeratzeko erabili zen, intentsitate ezberdinetan sortzen ziren erantzunak aztertuz, kontrol estimulua erantzunaren intentsitate handienaren % 40 eta % 60 artean egokituz. Hipokanpoak jasotzen dituen sarrera glutamatergikoetan eCBek bideratutako eLTD bat eragiteko, maiztasun txikiko estimulazio tetanikoko protokolo bat aplikatu zen (LFS, 10 minutuz 10 Hz-ean), aurrez deskribatu den “oinarrizko-lerro” egonkor bat erregistratu ondoren (Robbe et al., 2002; Puente et al., 2011; Peñasco et al., 2019, 2020).

4.6.3- Datuen azterketa

Estimulazio tetanikoaren ondorengo eCB-eLTDraiko fEPSP azaleraren magnitudea honela kalkulatu zen: oinarrizko lerroaren azaleraren (LFS baino 10 minutu lehenago emandako oinarrizko erantzun kitzikagarrien batezbestekoa) eta tetanizazioaren osteko erantzun egonkorren azken 10 minutuen (LFSa amaitu eta ondorengo 30 minututara erregistratuak) arteko aldaketak, ehunekotan adierazita. Gutxienez hiru sagu erabili ziren baldintza experimental bakoitzeko. Esperimentuetan zehar kumaldi bereko WT eta TRPV1-KO saguak tartekatuz ziren.

Pultsu-parekatuen (PPR) ratioa kalkulatzeko, binakako 30 estimuluen (50 ms-ko pultsu arteko tarte) fEPSPen (P2/P1) hasierako eta bukaerako malden batez bestekoa egin zen, non P2, fEPSP2 maldei zegokien (eragindako 2. erantzuna) eta P1, fEPSP1 maldei (eragindako 1. erantzuna).

4.7- Portaera probak

Portaera probak 7-8 asteko saguetan (10-11 baldintza bakoitzeko) egin ziren. Proba hasi baino 30 minutu lehenago, tenperatura eta aire jario kontrolatua zuen gela batean eduki ziren animaliak, girora egokitzeko. Baldintza berberetan egin ziren probak; gela berean, betiere argi fasean eta denbora-tarte berean. Animalia genotipoekikoitsu ziren bi ikerlariak proba guztiak gainbegiratu zituzten eta kronometro bat erabili zuten denbora neurtzeko. Esperimentu guztiak kamera digital batekin grabatu ziren (Panasonic Lumix). Usaimen seinaleak saihesteko, labirintoak eta objektuak EtOH % 70ekin garbitu ziren, eta, gero, urarekin garbitu ziren proba bakoitzari hasiera eman aurretik.

4.7.1- Objektu berrien ezagutza proba (NOR testa)

Proba hau oroimen ez-espazialaren ebaluaketa egiteko erabili zen. Hipokanpoaren funtzioaren araberakoa da jokabide hori, eta karraskariak objektu berriak ezagun dituztenak baino gehiago esploratzeko duten joeran oinarritzen da.

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. Lehena, ohitzeko eguna izan zen; non saguak bi besoen elkargunean jarri ziren, eta besoak libreki esploratzen utzi zitzairen. Bigarren egunean, bi objektu berdinar 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.

Genotipoekiko (WT eta TRPV1-KO) itsu zen ikertzaile batek, gutxienez, sagu bakoitzak esploratutako denbora neurtu zuen. Saguak sudurrarekin objektua 1 cm baino gutxiagora begira igaro zen denbora jo zen miaketa positibotzat; ez zen positibotzat hartu objektu gainera igotzea edo hau murtxikatzea. Oroimen errendimendua ebaluatzeko, diskriminazio-indizea honela kalkulatu zen: objektu berria (TN) esploratzen emandako denboraren eta objektu ezaguna (TF) esploratzen emandako denboren arteko aldea zati miaketan emandako denbora osoa (TN+TF)(Puighermanal et al. 2009).

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

4.7.2- Barnesen labirintoa: oroimen- eta estrategia-espazialen testa (BM)

Ingurune lehorrean eginiko portaera-proba bat da, saguen oroimen espaziala aztertzeko (Bach et al., 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 lankideek (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, eta forma eta kolore ezberdineko bi ikusmen-pistaren bidez adierazi zen, gainerako 19 zuloak hutsik utzi ziren. 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 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, seriekoa eta espaziala).

Eguneroko saiakuntzetan, eskarmentudun eta genotipoarekikoitsuak ziren bi behatzailek, gutxienez, saguek erakutsitako estrategiak puntuatu zituzten, eta zeregin bakoitza osatzeko erabilitako denbora neurtu zuten. Lehenik, saguak ihes-kutxan jarri ziren minutu batez, gero labirintoaren erdian jarri ziren eta libreki arakatzen utzi zitzaizen 4 minutuz, ihes-kaxa aurkitu arte. Emaitzak honela puntuatu ziren: 1) estrategiarik gabe (NS): non ihes-kaxa ez zen aurkitu esplorazio-aldian; 2) ausazko estrategia (RM): ihes-kaxa ausazko bilaketa baten ondoren aurkitu zen hainbat zuloren miaketa eta gero; 3) serieko estrategia (SE): ihes-kaxa atzera itzuli gabeko eta

segidan kokaturiko zuloak esploratu ondoren aurkitu zen; estrategia-espaziala (SP): saguak, labirintoaren erditik, ikusmen-pistak baliatuz ihes-kaxa aurkitzen duenean. Proba bakoitzean, saguek ihes-kaxan sartzeko behar izan zuten denbora neurtu zen. WT eta TRPV1-KO saguen arteko aldean esangura estatistikoa bi bideko ANOVA probak aztertu zuen. Emaitzak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazi ziren software estatistiko pakete bat erabiliz (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, AEB). $p < 0.05$ balioak estatistikoki esanguratsutzat jo ziren.

4.8- Konbultsio exzitotoxikoen azido kainikoaren (KA) eredia

Konbultsio exzitotoxikoen KA eredia asko erabiltzen da loki lobuluko epilepsia simulatzeko. Eredu horrek epileptogenesiaren azpian dauden mekanismo molekularrak, zelularrak eta farmakologikoak ulertzen lagundu du, loki lobuluko epilepsia duten pazienteetan ikusten diren ezaugarri neuropatologikoak eta elektroentzefalografikoak erakusten baititu (Lévesque eta Avoli, 2013).

4.8.1- Azido kainikoaren (KA) hipokanpo barruko administrazioa

KA (20mM) aurretik Sierra eta lankideek (2015) garatutako protokoloan oinarrituta hipokanpoan zuzenean administratu zen.

Sei asteko sagu arrak erabili ziren ($n=15$ sagu mota bakoitzetik, WT eta TRPV1-KO). Peritoneo barneko ketamina/xilazina injekzio baten bidez anestesiatu ziren (100/10mg/kg-ko gorputz-pisua), gero marko-estereotaxikoan jarri ziren eta garezurra zabaldu zitzairen. Injektorea (Drummond Scientific enpresako Nanoject II Auto-Nanoliter) beso estereotaxikoan jarri ondoren, KA injektatu zen bizkarraldeko hipokanpoan, koordinatu hauen arabera: aurre-atzekoa (AP) -1.7 mm, erdialde-albokoa (ML) +1.6 mm, bizkarralde-sabelaldekoa (DV) -1.9 mm. 20 mM KA disoluzioaren 50 nl ($11 \times 4,6$ nL, 10 s-ko) eskuineko hipokanpoan injektatu ziren Nanojecta erabiliz. Bi minutu igaro ondoren injektorearen orratza burmuinetik atera zen, likidoak atzera egin ez zezan. Saguak marko estereotaxikotik atera ziren, ebakia josi eta bero-kuxin batean jarri ziren anestesiatik berreskuratu arte.

4.8.2- Konbultsio larritasunaren ebaluaketa

Saguak kirurgia ondorengo 4 orduetan ebaluatu ziren. Jasandako konbultsioen larritasuna 30 minuturo sailkatu zen Racineren eskala eraldatu baten arabera (1972). Racinek eskala bat (RS) garatu zuen konbultsioak amigdalaren estimulazio-ereduan ebaluatzeko, EEGan gertatzen diren aldaketen eta konbultsio motorren garapenaren arteko erlazioa ezarriz. Gaur egun, RS erabiltzen jarraitzen da, eta askotan konbultsio- eta epilepsia- eredu ezberdinetara egokitzen da (Clement et al. 2003; Vinogradova eta van Rijn, 2008; Lüttjohann et al., 2009).

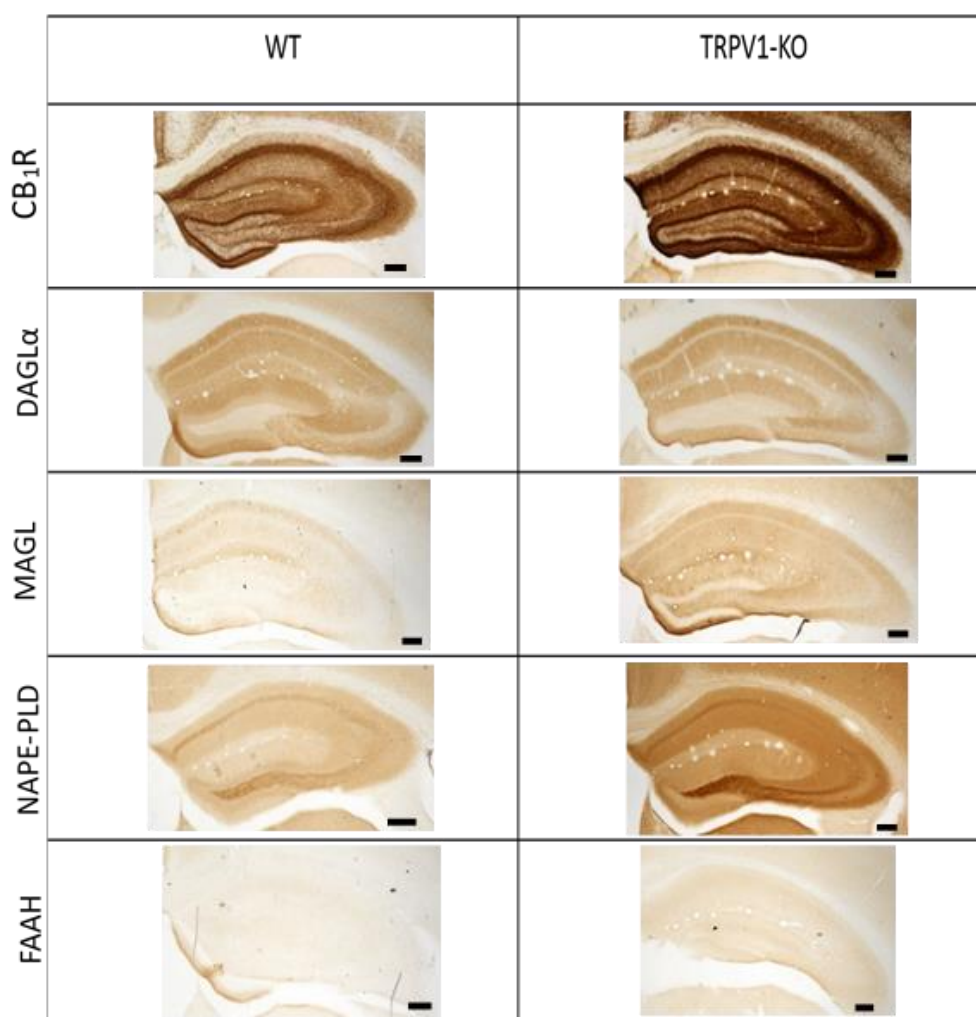
Zazpi intentsitate-maila zehaztu ziren Racine eskala eraldatuan, behin anestesiaren efektuetatik berreskuratuta zeudelarik, animaliek pairatzen zituzten sintometan oinarrituta: "Begirada galdua eta mugiezintasuna" (1. maila); "isatsa tente edukitzea eta aurreko gorputz-adarraren klonusa" (2. maila); "altxatzea eta mugimendu errepikakorrak izatea" (3. maila); "altxatzea eta erortzea" (4. maila); "etengabe altxatzea eta erortzea" (5. maila); "konbultsio toniko-klonikoak gorputz-jarrera galerarekin, korrika basatia eta saltoak ematea" (6. maila); eta "heriotza" (7. Maila). 30 minuturo, animalia bakoitzak denbora tarte horretan izandako gehieneko puntuazioa hartu zen kontutan. WT eta TRPV1-KO saguen arteko aldean esangura estatistikoa bi bideko ANOVA probaren bidez aztertu zen. Emaitzak batezbestekoa \pm S.E.M. moduan adierazi ziren software estatistiko pakete bat erabiliz (GraphPad Prism, GraphPad Software Inc, San Diego, AEB). $p < 0.05$ balioak estatistikoki esanguratsutzat jo ziren.

Emaitzak

5.1- ECSko osagaien adierazpen-patroia WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoan

5.1.1- CB₁R-ren eta eCB-entzimen immunohistokimika WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoan

CB₁R-ren eta bi endokannainoide nagusien (2-AG eta AEA) sintesi- eta degradazio-entzima nagusiak WT eta TRPV1-KO saguetan aztertu ziren mikroskopio konposaturako immunoperoxidasa-metodo baten bidez (LM) (1. irudia).



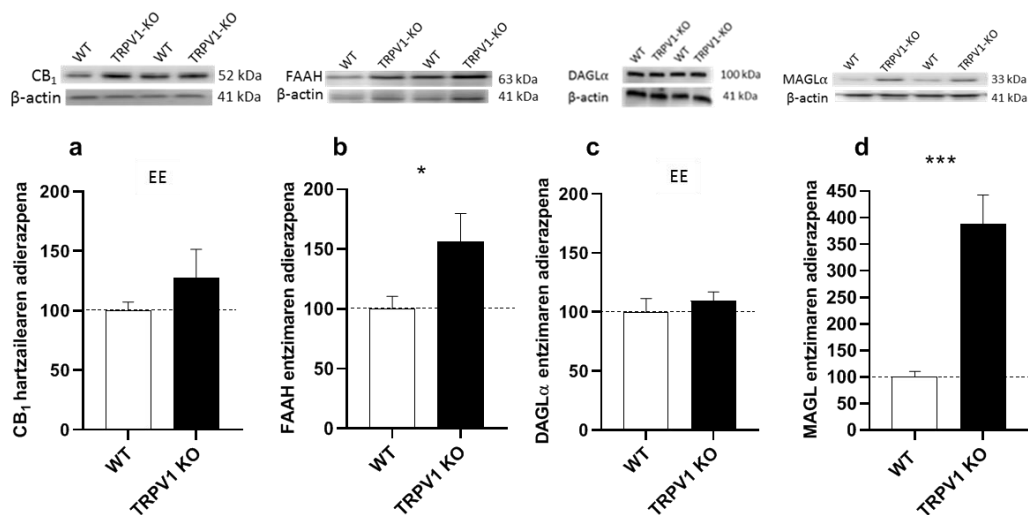
1. irudia: Endokanabinoide sistemaren osagaien adierazpen-ereduak WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoan. Mikroskopio konposaturako immunoperoxidasa-metodoa. Tindaketak: CB₁R; DAGL α entzima; MAGL entzima; NAPE-PLD entzima eta FAAH entzima. Oro har, proteina-tindaketan handipen bat (nahiz eta FAAH oso eskasa izan) behatzen da, DAGL α entzimat izan ezik, murrizketa orokor diskretua erakusten baitu, bereziki CA1 geruzan nabarmentzen dena. Eskala barrak: 500 μ m.

Lehenik eta behin, TRPV1-KO saguen hipokanpoan adierazpen-eredua aldatu egin zela ikusi zen, WTeekin alderatuta. Horrela, igoera bat aurkitu zen CB₁R-ren, MAGLren, NAPE-PLDren eta FAAH proteinen adierazpenean; DAGLaren espresioa apur bat murriztu zen bitartean.

Mikrografia guztiak argi-intentsitate eta esposizio-denbora berarekin hartu ziren, konparazioak ahalbidetzeko. MAGL eta FAAH entzimentzat lortutako tindaketa ahula izan zen WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoan, beste tindaketekin alderatuta. MAGL, FAAH eta NAPE-PLD entzimek igoera orokorra zuten TRPV1-KO saguen hipokanpo osoan. MAGLren adierazpena FAAHrena eta NAPE-PLDrena baino gehiago handitu zen, are nabarmenagoa hilus eta CA3ko stratum lucidum eremuetan, hots, zuntz goroldiotsuen amaiera-eremuan. CB₁R-ren adierazpena nabarmen handitu zen, oro har, eta bereziki indartsua zen bihurtzeko horzduneko molekula-geruzan, CA3ko erradiodun geruzan eta CA1eko piramide-zelula-geruzan.

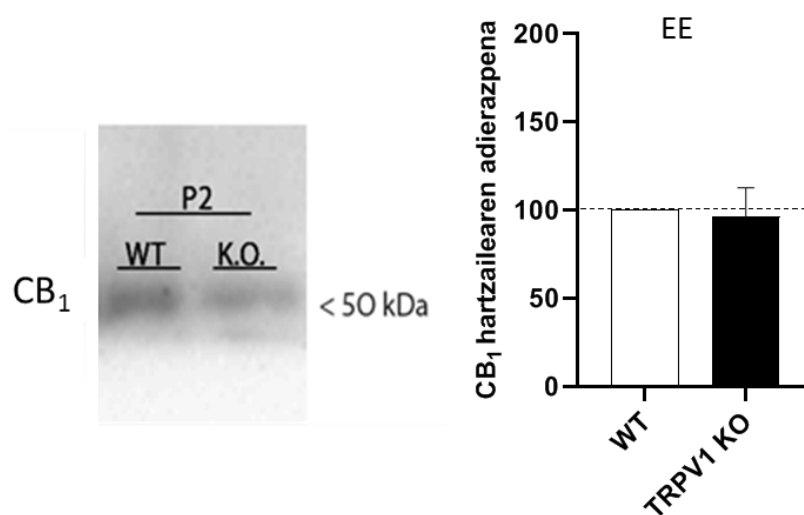
5.1.2- CB₁R-ren eta eCB-entzimen adierazpena WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoko homogenatu osoetan eta sinaptosometan

CB₁R-ren, DAGLaren, FAAHren eta MAGL entzimen adierazpena WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoetatik lortutako homogenatu osoetan aztertu zen (2. irudia). CB₁R-ren adierazpenak % 27.5 egin zuen gora TRPV1-KOetan (balioak: kontrola (% 100) vs % 127.5 ± 23.83; p = 0.301 ns; n = 8), baina ez zen estatistikoki esanguratsua izan (2. irudia a). Hala ere, FAAH nabarmen handitu zen (% 56) TRPV1-KOetan (balioak: kontrola vs % 156.3 ± 23.52; p = 0.0467 *; n = 8) (2. irudia b). 2-AGrekin lotutako entzimei dagokienez, DAGLα entziman ez zen aldaketarik egon (balioak: kontrola vs % 109.5 ± 7.5; p = 0.2476 ns; n = 2) (2. irudia c), baina MAGLren adierazpenean igoera oso esanguratsua aurkitu zen (~ % 288) TRPV1-KOetan WTeekin alderatuta (balioak: kontrola vs % 388.1 ± 54.7; p = 0.0001 ***; n = 8) (2. irudia d).



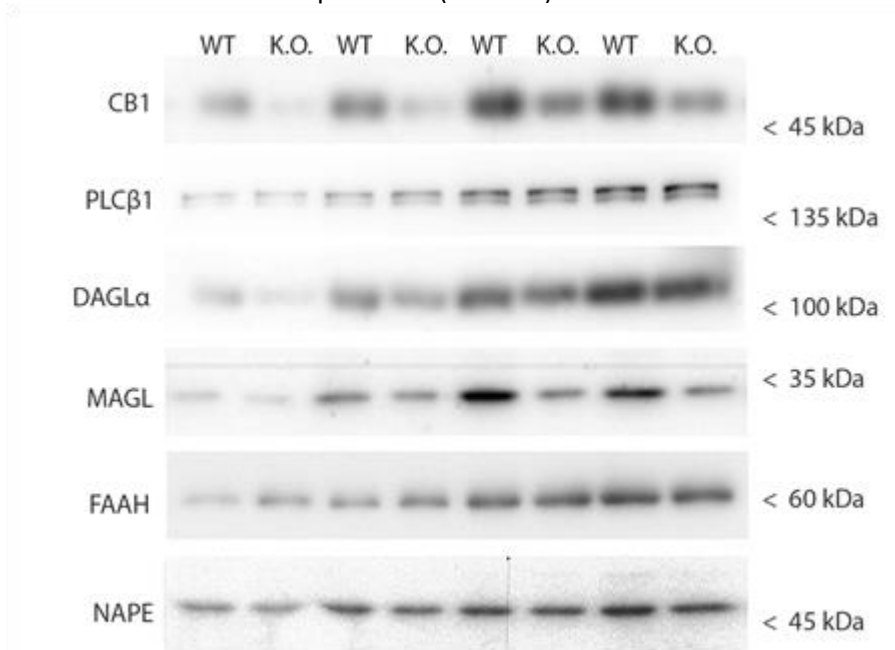
2. irudia: CB₁R-ren eta eCB-entzimen adierazpen erlatiboa, WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoko homogenatu osoetan. a) CB₁R-rentzako immunoblota. TRPV1-KO saguetan behatutako gorakada ez da esanguratsua. b) FAAH entzimarako immunoblota. Igoera nabarmena dago TRPV1-KOetan. c) DAGL α entzimarentzako immunoblota. Ez da aldaketarik antzematen adierazpenean. d) MAGL entzimarentzako immunoblota. Entzimaren adierazpena nabarmen handitzen da TRPV1-KOetan. Datuak proba ez-parametrikoen edo parametrikoen bidez aztertu ziren (Mann-Whitneyren U proba edo Student t proba ez parekatua);* $p < 0.05$;** $p < 0.001$. Datuak batezbestekoa \pm S.E.M. moduan adierazten dira.

Hala ere, CB₁R-ren adierazpenaren detekzio orokorrak, ultraegitura mailako konpartimentu espezifikoaren arteko ezberdintasunak ezkutatu ote zituen susmatuak, homogeneizatuak P2 frakzioetan purifikatu ziren, non mintz zelular eta azpizelular guztiak frakzio zitosolikotik banandu ziren. Beste behin ere, ez zen aldaketa esanguratsurik aurkitu CB₁R-ren adierazpenean TRPV1-KO eta WT artean (balioak: kontrola vs 96.18 ± 16.38 ; $p = 0.8213$; ns) (3. irudia).



3. irudia: Immunoblota eta CB₁R-ren adierazpen erlatiboa WT eta TRPV1-KO sagu hipokanpoetako mintz gordinen P2 estraktuan. Ez da aldaketa esanguratsurik antzeman CB₁R-ren adierazpenean TRPV1-KO vs WT saguetan. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. Datuak batezbestekoa \pm S.E.M. moduan agertzen dira.

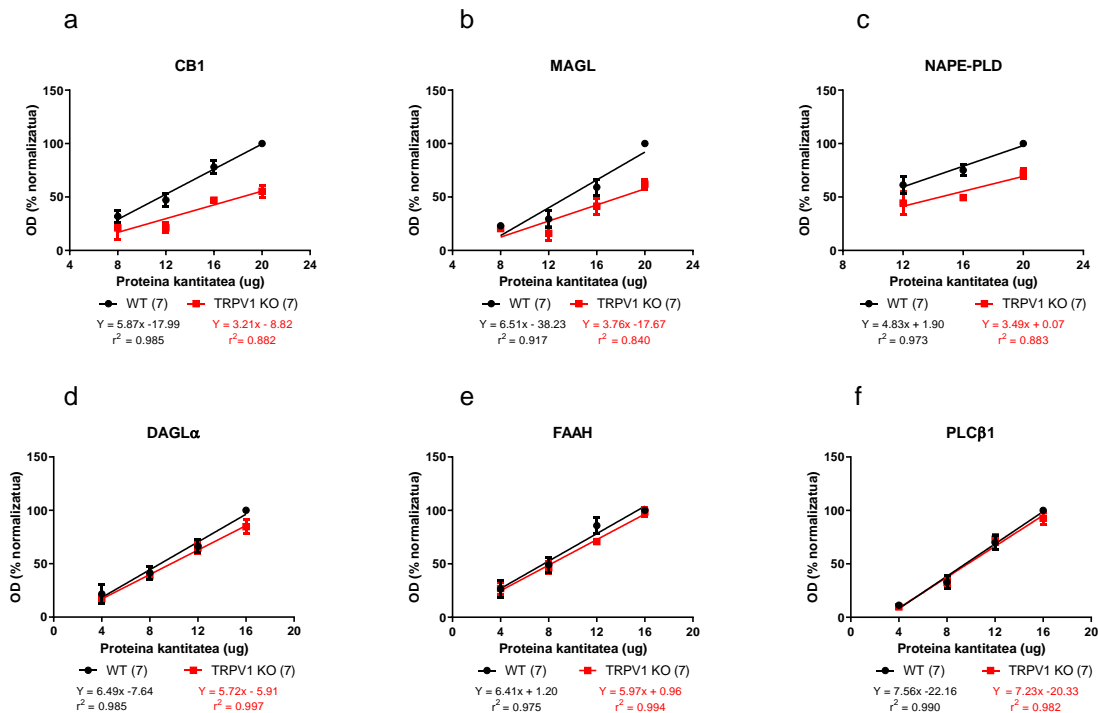
Ondoren, homogeneizatuen sinptosoma-frakzioak atera ziren, eCBekin erlazionaturako proteinen adierazpena aztertzeko bukaera sinaptikoetan (4. irudia).



4. irudia: CB₁R-ren, PLCβ1, DAGLα, MAGL, FAAH eta NAPE-PLD entzimen immunoblota WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpo-sinaptosometan. Ikusi testua balioen xehetasunetarako.

Sinaptosoma-frakzioetan CB₁R-ren eta MAGL entzimaren adierazpenak nabarmen murriztu ziren TRPV1-KOetan WTekin alderatuta. Horrela, CB₁R % 45 inguru jaitsi zen (malda-balioak; WT: $5.878 \pm$

0.5065; TRPV1-KO: 3.214 ± 0.8289 ($p = 0.0092; **$) (5. irudia a) eta MAGLren beherakada % 42 ingurukoa izan zen (malda-balioak; WT: 6.512 ± 1.381 ; TRPV1-KO: 3.763 ± 3.7289). Era berean, NAPE-PLD entziman % 28ko murrizketa ertaina ikusi zen TRPV1-KO saguetan (3.499 ± 1.268 ($p = 0.4186$; ns) WTekin alderatuta (4.836 ± 0.8018) (5. irudia c). Azkenik, DAGL α (WT: 6.498 ± 0.5544 ; TRPV1-KO: 5.724 ± 0.2046 ($p = 0.3194$; ns) (5. irudia d); FAAH (WT: 6.419 ± 0.7261 ; TRPV1-KO: $5.973 \pm 0,3228$ ($p = 0,607$; ns) (5. irudia e) eta PLC β (WT: 7.569 ± 0.5175 ; TRPV1-KO: 7.231 ± 0.6894 ($p = 0.6343$; ns) (5. irudia f) ez ziren aldatu.

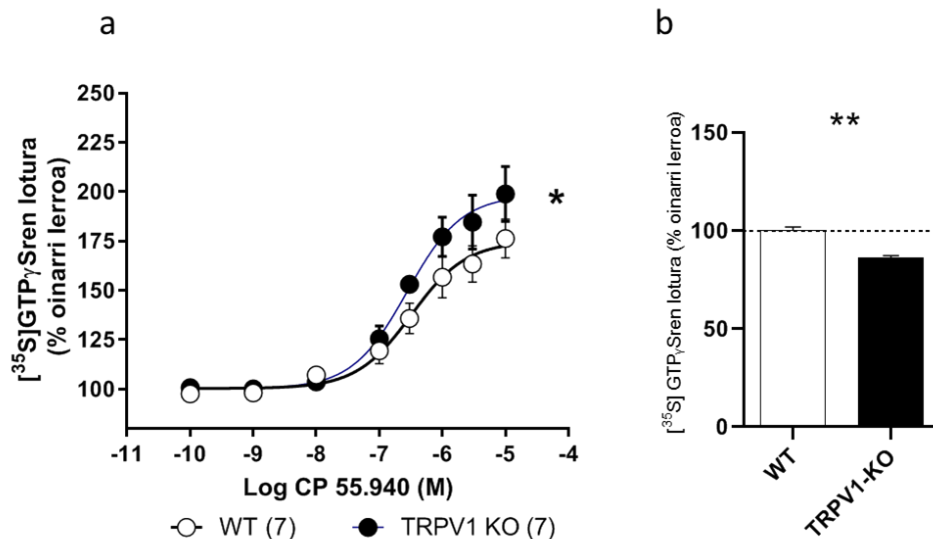


5. irudia: CB₁R-ren eta ECSko entzimen adierazpen erlatiboaren erregresio linealaren analisia WT eta TRPV1-KO saguen hipokampo-sinaptosometan. a) CB₁R. b) MAGL entzima. c) NAPE-PLD entzima. d) DAGL α entzima. e) FAAH entzima. Fisherren proba zehatza. $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. Datuak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa erakusten dira.

5.1.3- CP 55.940 bidez estimulatutako [³⁵S] GTP γ S binding entseguak WT eta TRPV1-KO saguen hipokampo-sinaptosometan

[³⁵S] GTP γ S binding entseguak CB₁R-ren CP 55.940 agonistarekin egin ziren WT eta TRPV1-KO saguen hipokampotik lortutako sinaptosoma-estraktuetan. Horrela, CP 55.940ak bai WT zein TRPV1-KO erazukinetan [³⁵S] GTP γ S konplexuaren akoplamendua sustatu zuen erabilitako kontzentrazioaren arabera (6. irudia a). Hala ere, nabarmentzekoa da eraginkortasun maximoak

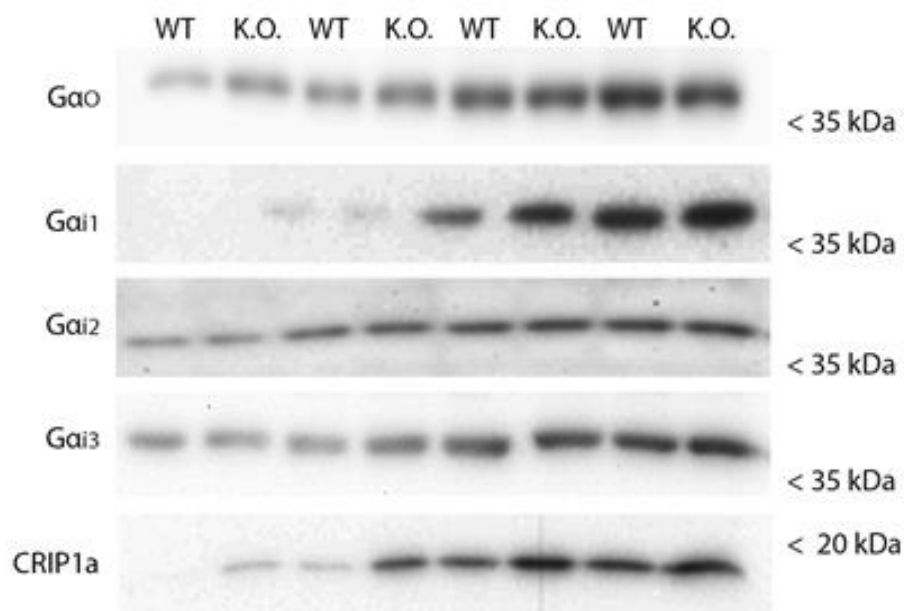
(E_{max}) gora egin zuela TRPV1-KOetan (eraginkortasun maximoa: % 193.70 ± 12.21 oinarrizko aktibazioarekin alderatuta) WTeekin alderatuta (gehieneko eraginkortasuna: % 176.20 ± 9.73 oinarrizko aktibazioarekin alderatuta) ($p < 0.05$; *) (6. irudia a). Horrez gain, ez zen aldaketarik hauteman CP 55.940 bidezko estimulazioaren potentzian (EC_{50} ; WT: -6.47 ± 0.14 ; TRPV1-KO: -6.58 ± 0.01 ($p = 0.5139$; ns) (6. irudia a), baina oinarrizko aktibazioa murriztuta zegoela behatu zen TRPV1-KOetan (% 86.25 ± 1.02), WTeekin alderatuta (% 100 ± 1.76) ($p = 0.0203$; *) (6. irudia b).



6. irudia: TRPV1ren ezabatze genetikoaren eragina CB₁R-ren funtzionaltasunean. a) CP 55.940 estimulazio bidezko [³⁵S] GTP γ S binding entseguen irudi adierazgarria WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpo-sinaptosometan. a) Kontzentrazio-kurbak, hirukoiztutako lau esperimendu desberdinetako balioen batezbestekoa \pm S.E.M. Student t proba ez parekatua; * $p < 0.05$; b) Histogramak, WT eta TRPV1-KO oinarrizko aktibazioaren ehuneko erlatiboa adierazten du.

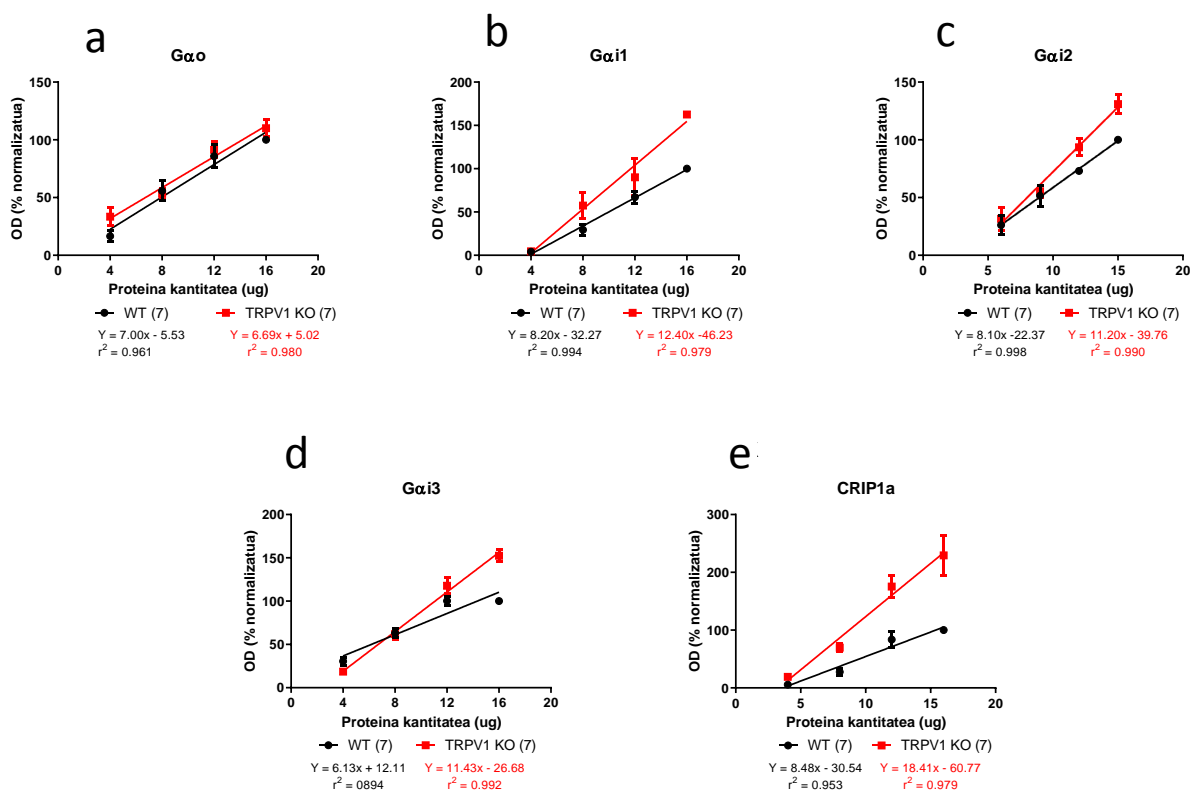
5.1.4- CB₁R-rekin erlaxionatutako zelula barneko proteinen adierazpena WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpo-sinaptosometan

G α (o, i1, i2, i3) azpiunitatearen proteinak eta kannabinoide hartzailearen elkarrekintza-proteina 1a (CRIP1a) aztertu ziren (7. irudia).



7. irudia: CB₁R-rekin elkarreragiten duten proteinen immunoblota. WT eta TRPV1-KO saguen hipokanposinaptosometan: Gαo, Gαi azpiunitate desberdinen (1, 2, 3) eta CRIP1aren adierazpena.

TRPV1-KOak WTekin alderatuta ez zuen aldaketarik izan Gαo proteinaren adierazpenean (WT: 7.008 ± 0.998 ; TRPV1-KO: 6.695 ± 0.6674 ($p = 0.7853$; ns) (8. irudia a), baina igoera nabarmena ikusi zen Gα₁ proteinan (WT: 8.14 ± 0.1228 ; TRPV1-KO: 12.66 ± 0.0789 ($p = 0.03808$;*) (8. irudia b), Gα_{2n} (WT: 8.101 ± 0.2337 ; TRPV1-KO: 11.2 ± 0.7939 ($p = 0.0463$; *) (8. irudia c), Gα_{3n} (WT: 6.135 ± 1.489 ; TRPV1-KO: 11.43 ± 0.685 ($p < 0.0001$; ****) (8. irudia d) eta CRIP1an (WT: 8.481 ± 1.324 ; TRPV1-KO: 18.41 ± 1.89 ($p = 0.0006$; ***) (8. irudia e).

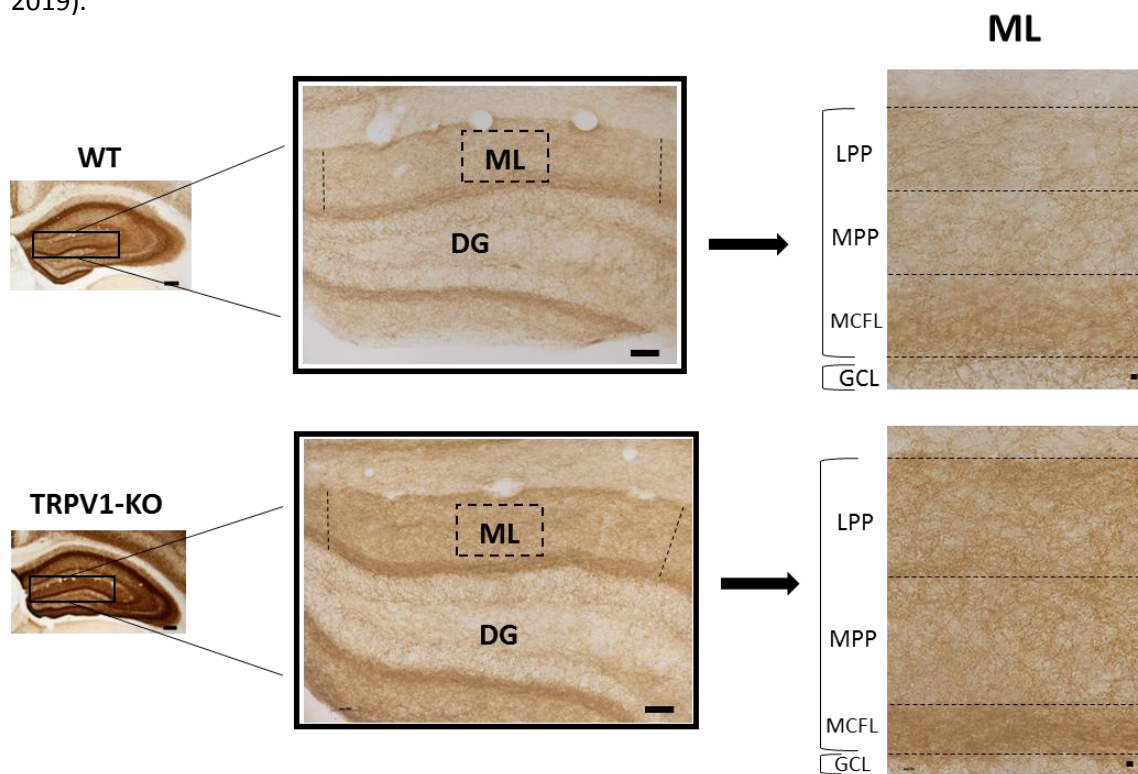


8. irudia: CB₁R-rekin elkarreagiten duten proteinen adierazpen erlatiboaren erregresio linealaren analisia WT eta TRPV1-KO saguen hipokampo-sinaptosometan. a) Gαo azpiunitatea (n = 7); b) Gαi1 azpiunitatea (n = 7); c) Gαi2 azpiunitatea (n = 7); d) Gαi3 azpiunitatea (n = 7); e) CRIP1a proteina (n = 7). Fisherren proba zehatza: p > 0.05; * p < 0.05; ** p < 0.001; **** p < 0.0001. Datuak batezbestekoa ± S.E.M. gisa adierazten dira.

P2 frakzioen eta sinaptosomen proteinen adierazpenaren analisia, eta [³⁵S] GTP_γS binding entseguak Mikel Saumellek burutu zituen Joan Sallés Alvira doktorearen laborategian (Euskal Herriko Unibertsitateko Farmakologia Saila).

5.2- CB₁R-ren kokapen zelular eta azpizelularra TRPV1-KO saguen hipokanpoan. Bereizmen handiko mikroskopia elektronikorako immunizitokimika

Arreta, hipokanpoko bihurgune horzduneari jarri zen (9. irudia), izan ere, bertan TRPV1 eta CB₁R-en presentzia deskribatu da, eta egiaztatu da hartzaile horiek molekula-geruzako plastikotasun sinaptikoan eragiten dutela (Chavéz et al., 2011; 2014; Puente et al., 2015; Canduela et al., 2015; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2016; Wang et al., 2016; Bonilla-Del Río et al., 2019; Peñasco et al., 2019).



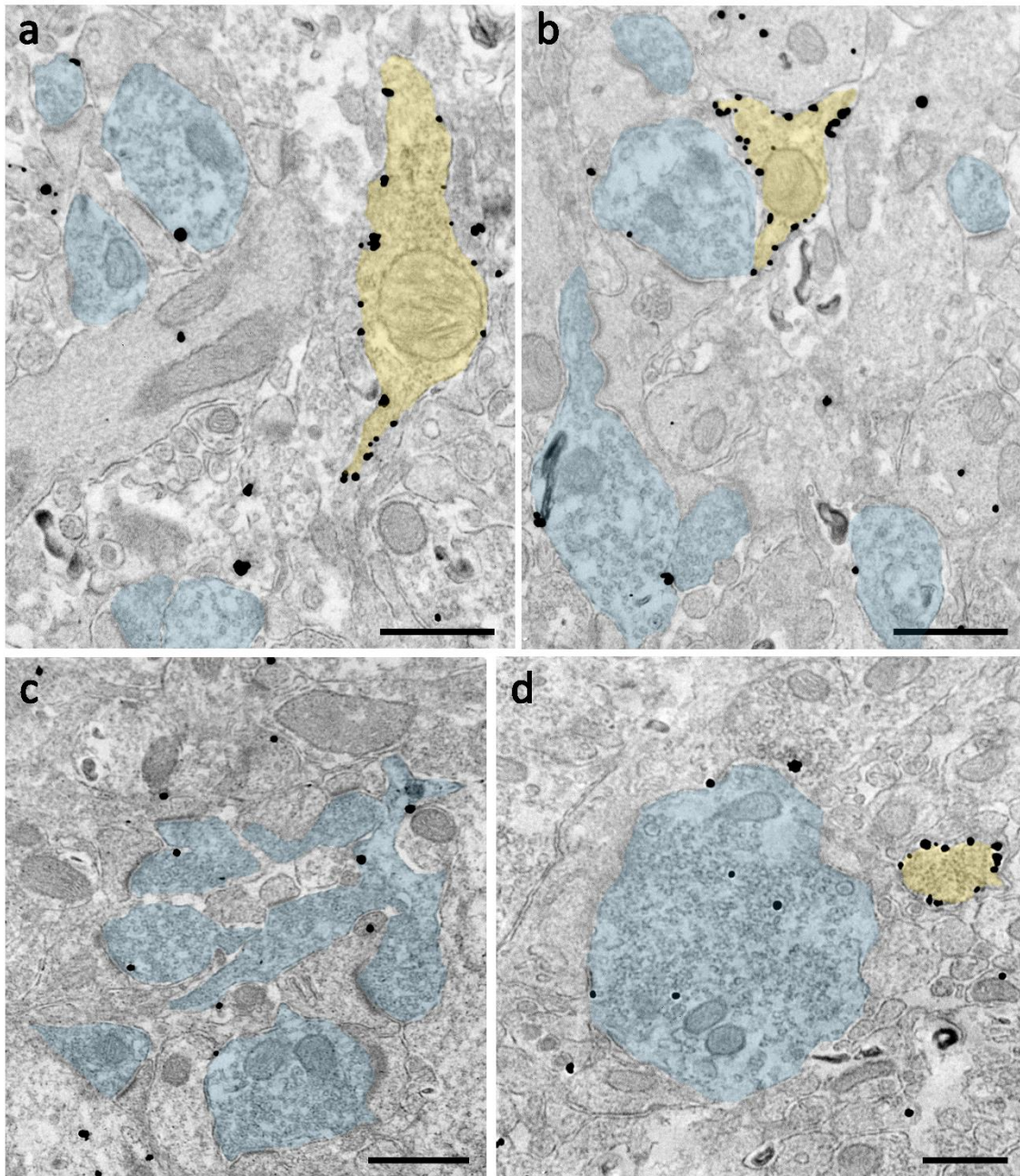
9. irudia: CB₁R-ren immunomarkaketaren mikroskopio-konposatuko irudi adierazgarriak WT eta TRPV1-KO saguen bihurgune horzduneko molekula-geruzan. WTetan molekula-geruzaren (ML) CB₁R-ren immunomarkaketa indartsua da lehen herenean kokaturiko zuntz-sarean, goroldio-zelula glutamatergikoen axoien amaiera-eremuari (MCFL) dagokion geruza zatian, eta ahulagoa da, baina hala ere indartsua, bide zulatzaileari dagokion MLko kanpoaldeko bi herenetan, hau da, erdiko bide zulatzailean (MPP) eta alboko bide zulatzailean (LPP). TRPV1-KOetan CB₁R-ren immunomarkaketa patroia bera ikusten da, baina sendoagoa dena oro har. DG: Bihurgune horzduna; MCFL: Goroldio-zelula zuntzen geruza; GCL: pikor-zelula geruza. Eskala barrak: 200 µm.

Mikroskopio elektronikoan astrozitoak eta sinapsi gabergikoak hobeto identifikatzeko asmoz, immunoperoxidasa-metodo bat aplikatu zen mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu-

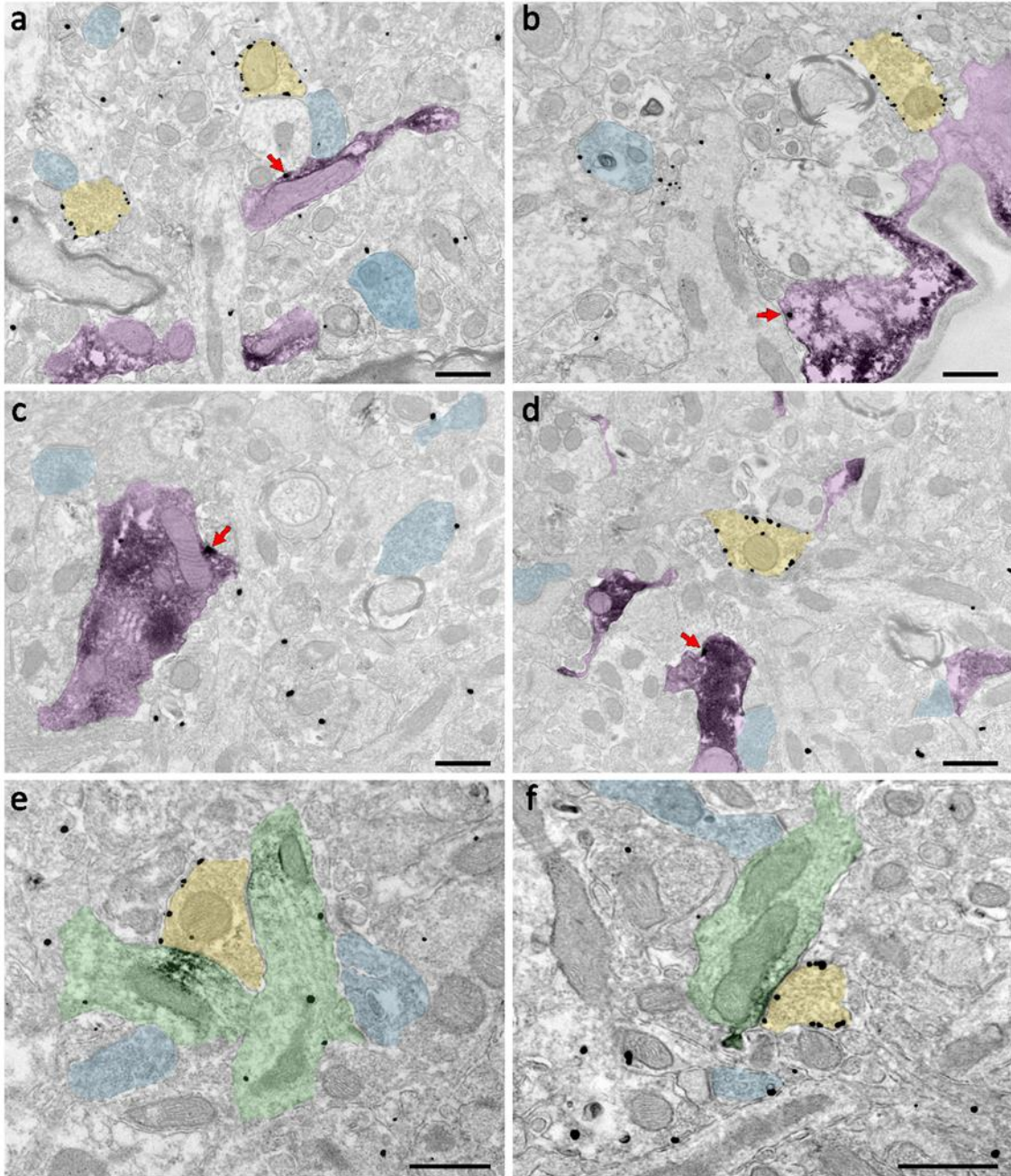
aurreko urre bidezko immunomarkaketa sinplearekin batera. Hala, WT eta TRPV1-KO saguen MLan CB₁R-ren immunopartikula ugari aurkitu ziren, espero bezala, bukaera sinaptiko GABAergikoen mintzetan, dendrita postsinaptikoekin sinapsi simetrikoak osatzen baitzituzten; aldiz, arantza dendritikoekin sinapsi asimetrikoak osatzen zituzten bukaera sinaptiko glutamatergikoetan CB₁R-ren immunopartikula kopurua txikiagoa zen. Bi sinapsi motetan, CB₁R-ren partikulak bukaera sinaptikoen eremu perisinaptikoetan eta estrasinaptikoetan kokatu ziren. CB₁R-ren immunopartikulak prozesu astrozitikoen mintzetan eta mitokondria-mintzetan ere agertu ziren.

5.2.1- CB₁R-ren banaketa MCFLko axoi bukaera presinaptikoetan

CB₁R-ren partikulak axoi bukaera sinaptiko glutamatergiko eta gabaergikoen eremu perisinaptikoan eta estrasinaptikoan aurkitu ziren MCFLan (10. irudia), baita astrozitoetan ere (11. irudia). WT eta TRPV1-KO saguek antzeko banaketa-eredua erakutsi zuten.



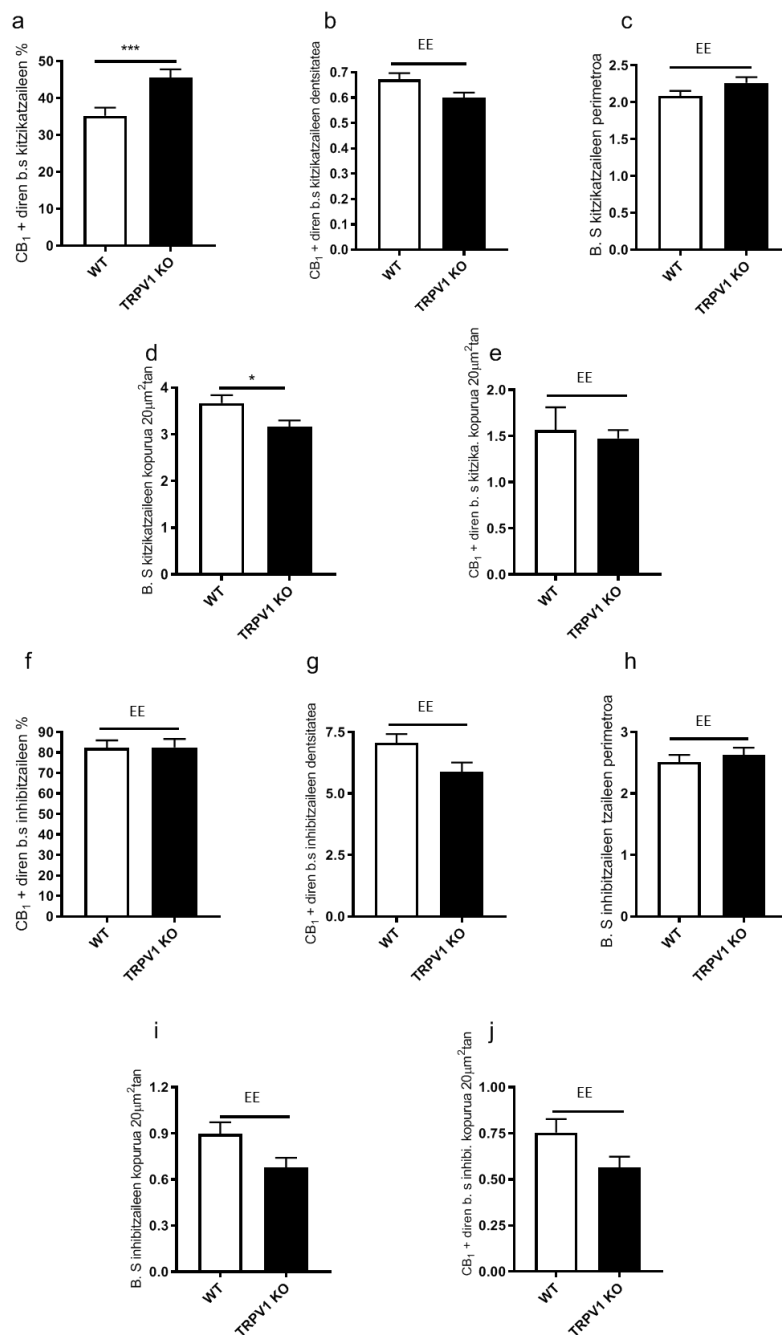
10. irudia. CB₁R-ren banaketa WT eta TRPV1-KO saguen MCFLan. Mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunomarkaketa sinpleko metodoa. a) eta b) WT. c) eta d) TRPV1-KO saguak. Urdina: bukaera glutamatergikoak; horia: bukaera gabaergikoak; puntu beltzak: zilarrez indartutako CB₁R-ren urrezko partikulak. CB₁R-ren immunopartikulak ugariak dira bukaera gabaergikoetan, eta sakabanatua ageri dira glutamatergikoetan. Eskala barrak: 0.5 μm.



11. irudia: CB₁R-ren adierazpena GFAP positiboak diren astrozitoetan eta gephyrina positiboak diren sinapsietan MCFLan. Mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu-aurreko immunomarkaketa konbinatua. GFAPren DAB immunomarkaketa produktua prozezu astrozitikoetan ikusten da, eta gephyrinarena, sinapsi gabaergikoen alde postsinaptikoan. a) eta c) WTn, CB₁R-ren immunopartikulak mintz astrozitikoetan daude, bukaera sinaptiko glutamatergikoez eta gabaergikoez gain. b) eta d) TRPV1-KOetan antzeko banaketa ikus daiteke. e) WTetan, gephyrinaren immunomarkaketa CB₁R duen bukaera sinaptiko gabaergiko baten ondoko bi dendrita postsinaptikoen mintzean ageri da. f) TRPV1-KOen, gephyrinaren immunomarkaketa partikulaz betetako bukaera sinaptiko gabaergikoen ondoko mintz dendritiko postsinaptikoetara mugatzen da. Urdina: bukaera glutamatergikoa; horia: bukaera gabaergikoa; purpura: prozezu astrozitikoak; berdea: dendritak; gezi gorriak: CB₁R-ren partikula astrozitikoak. Eskala barrak: 0.5 μm

MCFLko CB₁R-rako positibo diren bukaera sinaptiko glutamatergikoen ehunekoan gorakada nabarmena aurkitu zen TRPV1-KOetan (CB₁R-rako +: axoi bukaera glutamatergikoen % 45.48 ± 2.334) WTekin alderatuta (CB₁R-rako +: axoi bukaera glutamatergiko guztien % 35.19 ± 2.207) ($p = 0.0004;***$). Gainera, bukaera sinaptiko glutamatergikoak nabarmen murriztu direla ikusi da TRPV1-KOetan (3.168 ± 0.1309 bukaera sinaptiko/lagin-eremuko) WTekin alderatuta (3.622 ± 2.008 bukaera sinaptiko/lagin-eremuko) (12. irudia d) ($p = 0.034;*$). Bestalde, ez zen alde nabarmenik egon TRPV1-KO eta WT artean CB₁R-rako positiboak diren bukaera sinaptiko glutamatergikoen kopuruari (12. irudia e), perimetroari (12. irudia c) eta CB₁R-ren dentsitateari dagokienez (12. irudia b) (4. taula).

MCFLko bukaera sinaptiko gabaergikoei dagokienez, ez zen aldaketa esanguratsurik egon TRPV1-KOn aztertutako ezaugarrietan (CB₁R-rako bukaera + %, bukaera kopurua, CB₁R-rako + kopurua 20 μm^2 -ko, axoi bukaera sinaptikoen perimetroa, CB₁R-ren dentsitatea) (4. taula).



12. irudia: CB₁R-ren ultraegitura mailako banaketa WT eta TRPV1-KO saguen MCFLko bukaera sinaptikoetan. a) CB₁R glutamatergiko immunopositiboen ehuneko; b) CB₁R-ren (partikulak/μm) dentsitatea bukaera glutamatergiko immunopositiboetan); c) Bukaera glutamatergikoen perimetroa. d) Bukaera sinaptiko glutamatergikoen kopuru totala, 20 μm²-ko. e) CB₁R-rentzat + diren bukaera sinaptiko glutamatergikoen kopurua 20 μm²-ko; f) CB₁R terminal gabaergiko immunopositiboen ehuneko; g) CB₁R dentsitatea (partikulak/μm) bukaera gabaergiko immunopositiboetan; h) Bukaera gabaergikoen perimetroa; i) Bukaera sinaptiko gabaergikoen kopurua 20 μm²-ko; j) CB₁R-rako + diran bukaera gabaergiko immunopositiboen kopurua 20 μm²-ko. Datuak proba ez-parametrikoren edo parametrikoren bidez aztertu ziren (Mann-Whitneyren U proba edo Student t proba ez parekatua);* p < 0.05;*** p < 0.0001). Datu guztiak batezbestekoa ± S.E.M. gisa adierazten dira.

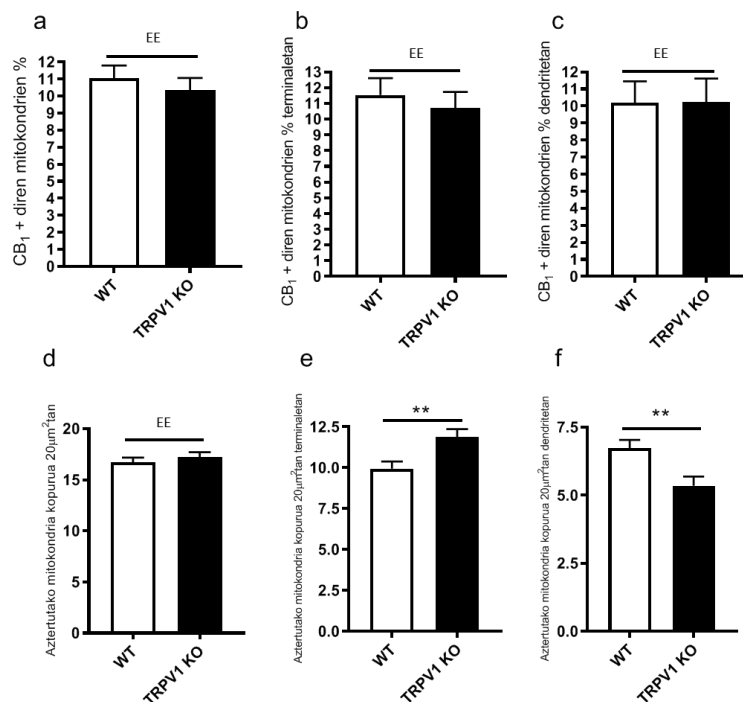
4. taula: MCFLko bukaera sinaptikoetan aztertutako parametroen balioak

Parametroa	WT	TRPV1-KO	p balioa
Lagin azalera osoa (μm^2)	$\sim 3000 \mu\text{m}^2$	$\sim 3000 \mu\text{m}^2$	3 sagu
CB ₁ R + diren bukaera glutamatergikoen %	$35.19 \pm 2.207 \%$ (224 / 525)	$45.48 \pm 2.334 \%$ (211 / 453)	p = 0.0004; ***
CB ₁ R + diren bukaera glutamatergikoen dentsitatea (partikula / μm)	0.6717 ± 0.0251	0.6007 ± 0.0197	p = 0.0635; ns
Buera glutamatergikoen perimetroa (μm)	2.084 ± 0.0685	2.261 ± 0.0771	p = 0.0951; ns
Bukaera glutamatergikoen kopurua $20 \mu\text{m}^2$ -tan	3.622 ± 2.008	3.168 ± 0.1309	p = 0.034; *
CB ₁ R + diren bukaera glutamatergikoen kopurua $20 \mu\text{m}^2$ -tan	1.566 ± 0.2476	1.476 ± 0.0903	p = 0.3029; ns
CB ₁ R + diren bukaera gabaergikoen %	$82.18 \pm 3.714 \%$ (107 / 128)	$82.43 \pm 4.13 \%$ (80 / 97)	p = 0.8141; ns
CB ₁ R + diren bukaera gabaergikoen dentsitatea (partikula / μm)	7.058 ± 0.3588	5.886 ± 0.376	p = 0.0578; ns
Buera gabaergikoen perimetroa (μm)	2.511 ± 0.1159	2.63 ± 0.113	p = 0.3863; ns
Bukaera gabaergikoen kopurua $20 \mu\text{m}^2$ -ko	0.8784 ± 0.0754	0.6783 ± 0.0632	p = 0.0892; ns
CB ₁ R + diren bukaera gabaergikoen kopurua $20 \mu\text{m}^2$ -ko	0.7466 ± 0.0719	0.5634 ± 0.0595	p = 0.0985; ns

5.2.2- CB₁R-ren banaketa azpizelularra MCFLko mitokondrietan

CB₁R-ren immunopartikulak MCFLko mitokondrien kanpoko mintzetan ere aurkitu ziren. CB₁R-ren markaketa eredu antzekoa izan zen WT eta TRPV1-KO saguen artean (13. irudia). Gainera, TRPV1-KOen CB₁R-rako positibo diren mitokondrien ehuneko globala (13. irudia a) eta zehazki bukaera sinaptikoetan (13. irudia b) eta dendritetan (13. irudia c) dagoena, ez zen desberdina izan WTeikin alderatuta (5. taula). MCFLko $20 \mu\text{m}^2$ -tan zenbatutako mitokondrien guztizko kopurua ere antzekoa izan zen WT eta TRPV1-KOen artean (13. irudia d).

Hala ere, mitokondrien kopurua nabarmenki handitu zen TRPV1-KOen bukaera sinaptikoetan (11.87 ± 0.49) WTkiko (9.945 ± 0.43) (p = 0.0028;**) eta murrizketa esanguratsua jasan zuen dendritetan (5.356 ± 0.332) WTeikin alderatuta (6.725 ± 0.307) (p = 0.0048; **) (13. irudia f). (5. taula).



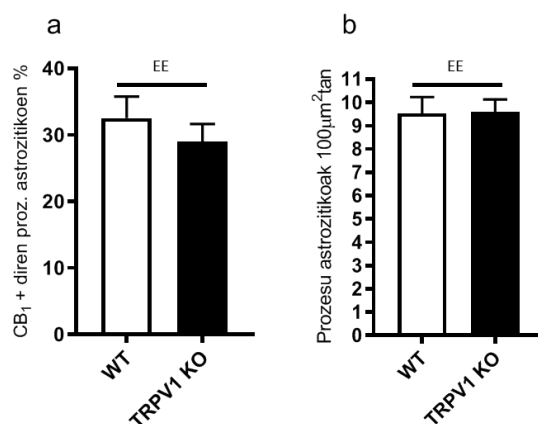
13. irudia: CB₁R-ren ultraegitura mailako banaketa WT eta TRPV1-KO saguen MCFLko mitokondrietan. a) CB₁R immunopositibo diren mitokondrien ehunekoa. b) CB₁R-rako + diren mitokondrien ehunekoa bukaera sinaptikoetan. c) CB₁R-rako + diren mitokondrien ehunekoa dendritetan. d) Aztertutako mitokondrien guztizko kopurua 20 µm²-ko. e) Aztertutako mitokondrien guztizko kopurua terminalaletan, 20 µm²-ko. f) Aztertutako mitokondrien guztizko kopurua dendritetan, 20 µm²-ko. Datuak proba ez-parametrikoren bidez aztertu ziren (Mann-Whitneyren proba; ** p < 0.005). Datu guztiak batezbestekoa ± S.E.M. moduan adierazten dira.

5. taula: MCFLko mitokondrietan aztertutako parametroen balioak

Parametroa	WT	TRPV1-KO	p balioa
Lagin azalera osoa (µm ²)	~ 2000 µm ²	~ 2000 µm ²	3 sagu
CB ₁ R + diren mitokondrien %	11.06 ± 0.7335 % (164 / 1523)	10.35 ± 0.7164 % (148 / 1550)	p = 0.4208; ns
CB ₁ R + diren mitokondrien % bukaera sinaptikoetan	11.54 ± 1.076 %	10.7 ± 1.041 %	p = 0.3326; ns
CB ₁ R + diren mitokondrien % dendritetan	10.19 ± 1.264 %	10.23 ± 1.39 %	p = 0.6363; ns
Mitokondria kopurua 20 µm ² -ko	16.74 ± 0.431	17.22 ± 0.485	p = 0.3300; ns
Mitokondria kopurua 20 µm ² -ko bukaera sinaptikoetan	9.945 ± 0.43	11.87 ± 0.49	p = 0.0028; **
Mitokondria kopurua 20 µm ² -ko dendritetan	6.725 ± 0.307	5.356 ± 0.332	p = 0.0048; **

5.2.3- CB₁R-ren banaketa MCFLko astrozitoetan

CB₁Rak MCFLko astrozitoetan ere aurkitu ziren (11. irudia). CB₁R-ren banaketaren azterketak ez zuen ezberdintasunik erakutsi, ez CB₁R-rako immunopositiboak diren prozesu astrozitikoaren proportzioan (14.irudia a), ez WT eta TRPV1-KO astrozitoen prozesuek betetako eremuan (14. irudia b) (6. taula)



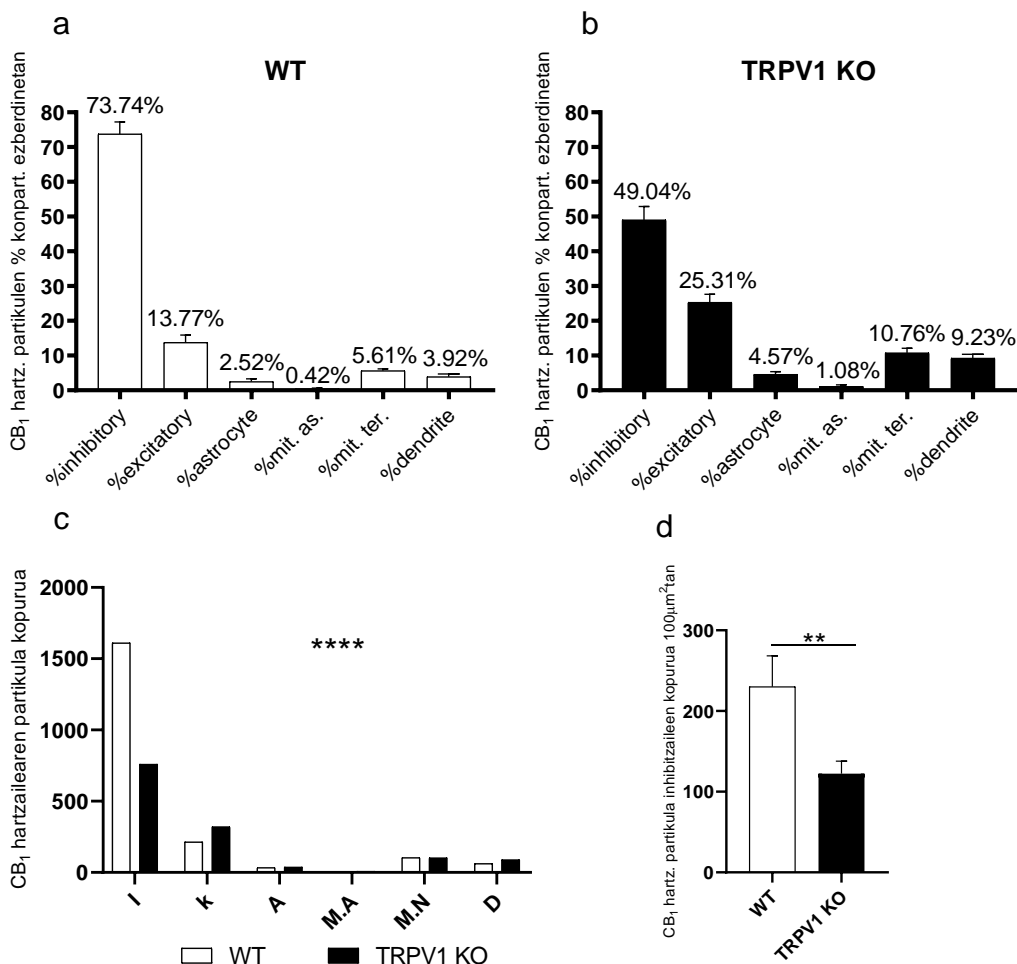
14. irudia: CB₁R-ren ultraegitura mailako banaketa WT eta TRPV1-KO saguen MCFLko astrozitoetan. a) CB₁R-rako immunopositibok diren astrozitoen ehunekoa. b) Prozesu astrozitiko immunopositiboak 100 μm²-ko. Datuak proba parametrikoren bidez aztertu ziren (Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$). Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. moduan adierazten dira.

6. taula: MCFLko astrozitoetan aztertutako parametroen balioak

Parametroa	WT	TRPV1-KO	p balioa
Lagin azalera osoa (μm ²)	~ 3000 μm ²	~ 3000 μm ²	3 sagu
CB ₁ R + diren prozesu astrozitikoaren %	32.53 \pm 3.235 % (84 / 286)	28.95 \pm 2.679 % (97 / 384)	p = 0.39; ns
Prozesu astrozitikoek betekao azalera (μm ²) 100 μm ² -ko	9.533 \pm 0.696	9.6 \pm 0.524	p = 0.8194; ns

5.2.4- CB₁R-ren partikulen banaketa MCFLan

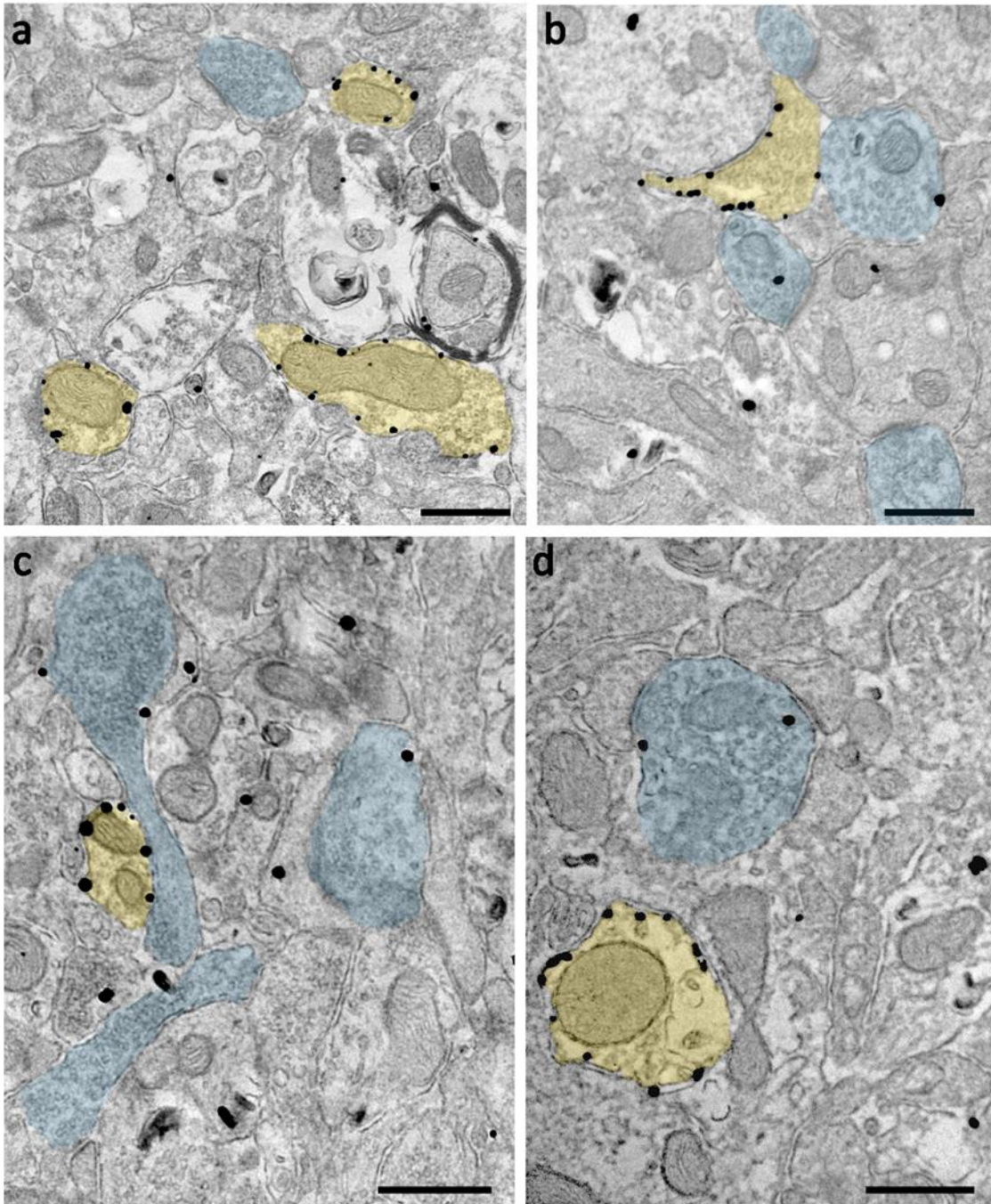
Honez gain, CB₁R-ren banaketa orokorrean egon zitezkeen aldaketak behatu ziren (15. irudia). 15a (WT) eta 15b (TRPV1-KO) irudietan erakusten den bezala, MCFLan, CB₁R-ren partikulen banaketan aldaketa bat egon zen WT eta TRPV1-KO saguen artean. Konpartimentu bakoitzean aztertutako partikulen guztizko kopurua kontuan hartuta (15. irudia c), CB₁R-ren partikulen murrizketa nabarmena aurkitu zen bukaera sinaptikoen mintz gabaergikoetan, TRPV1-KOetan (122.3 ± 15.53 partikula 100 μm²-ko) WTekin alderatuta (230.1 ± 38.15 partikula 100 μm²-ko) ($p = 0.0070; **$) (15. irudia d).



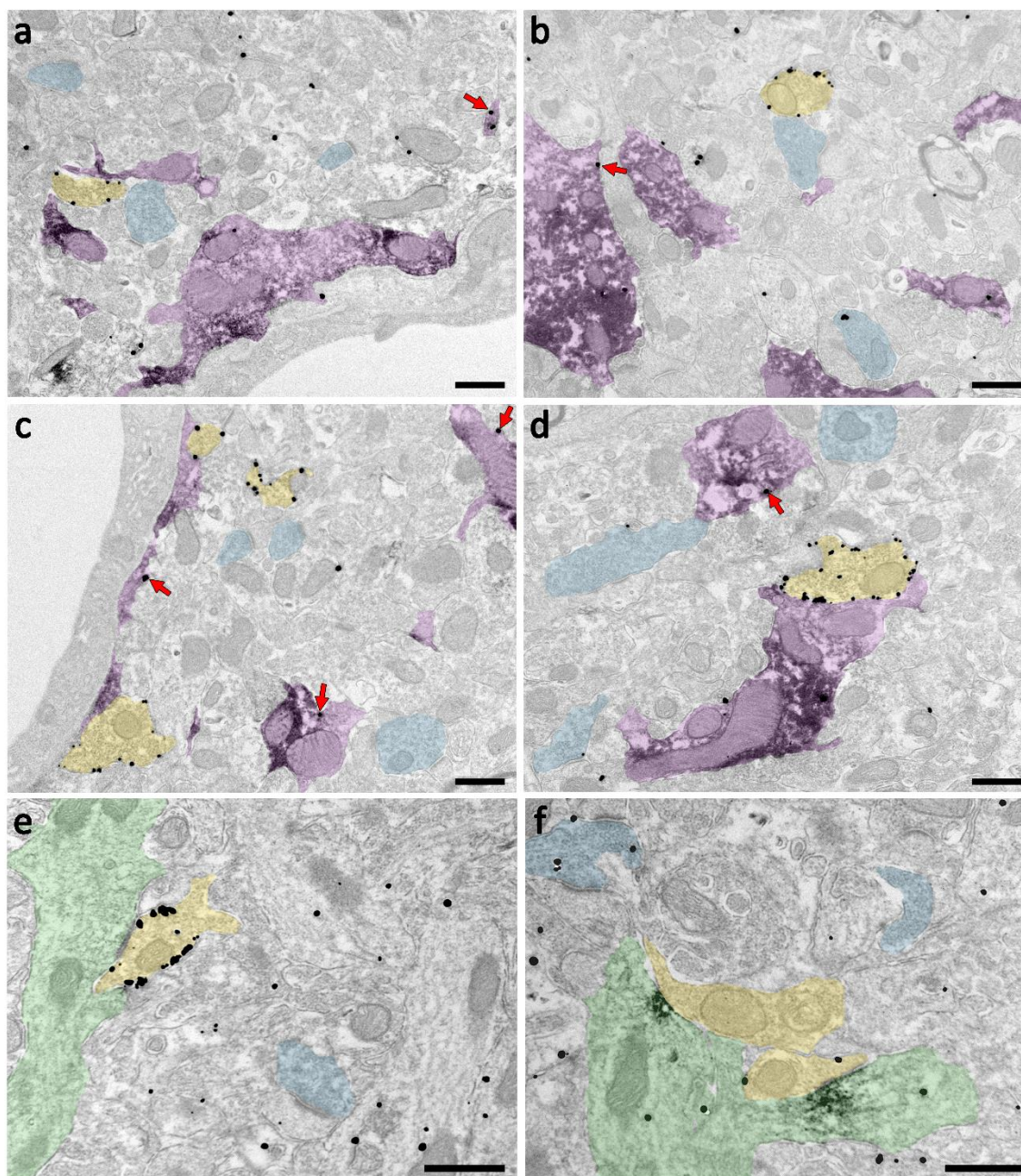
15. irudia: CB₁R-ren banaketa WT eta TRPV1-KO saguen MCFLan. a) CB₁R-ren partikulen proportzioa hainbat konpartimentu ezberdinetan, CB₁R-ren guztizko edukiari normalizatuta WTn. b) CB₁R-ren partikulen proportzioa hainbat konpartimentu ezberdinetan, CB₁R-ren guztizko edukiari normalizatuta TRPV1-KOn. c) Chi karratuaren proba. **** p < 0.0001. d) 100 μm²-ko azaleran aurkitutako CB₁R-ren partikulen kopurua bukaera gabaergikoetan. Student t proba ez parekatua. ** p < 0.01. Datu guztiak batezbestekoa ± S.E.M. gisa adierazten dira.

5.2.5- CB₁R-ren banaketa MLko kanpoko 2/3etako axoi bukaera presinaptikoetan.

Espero zen bezala, CB₁R-ren partikulak axoi bukaera glutamatergiko eta gabaergikoen eremu perisinaptiko eta estrasinaptikoetan (16. irudia), astrozitoetan (17. irudia) eta mitokondria-mintzetan ere aurkitu ziren WT eta TRPV1-KO saguen MLko kanpoko 2/3etan. Gainera, CB₁R-ren banaketa antzekoa izan zen WT eta TRPV1-KOen artean.



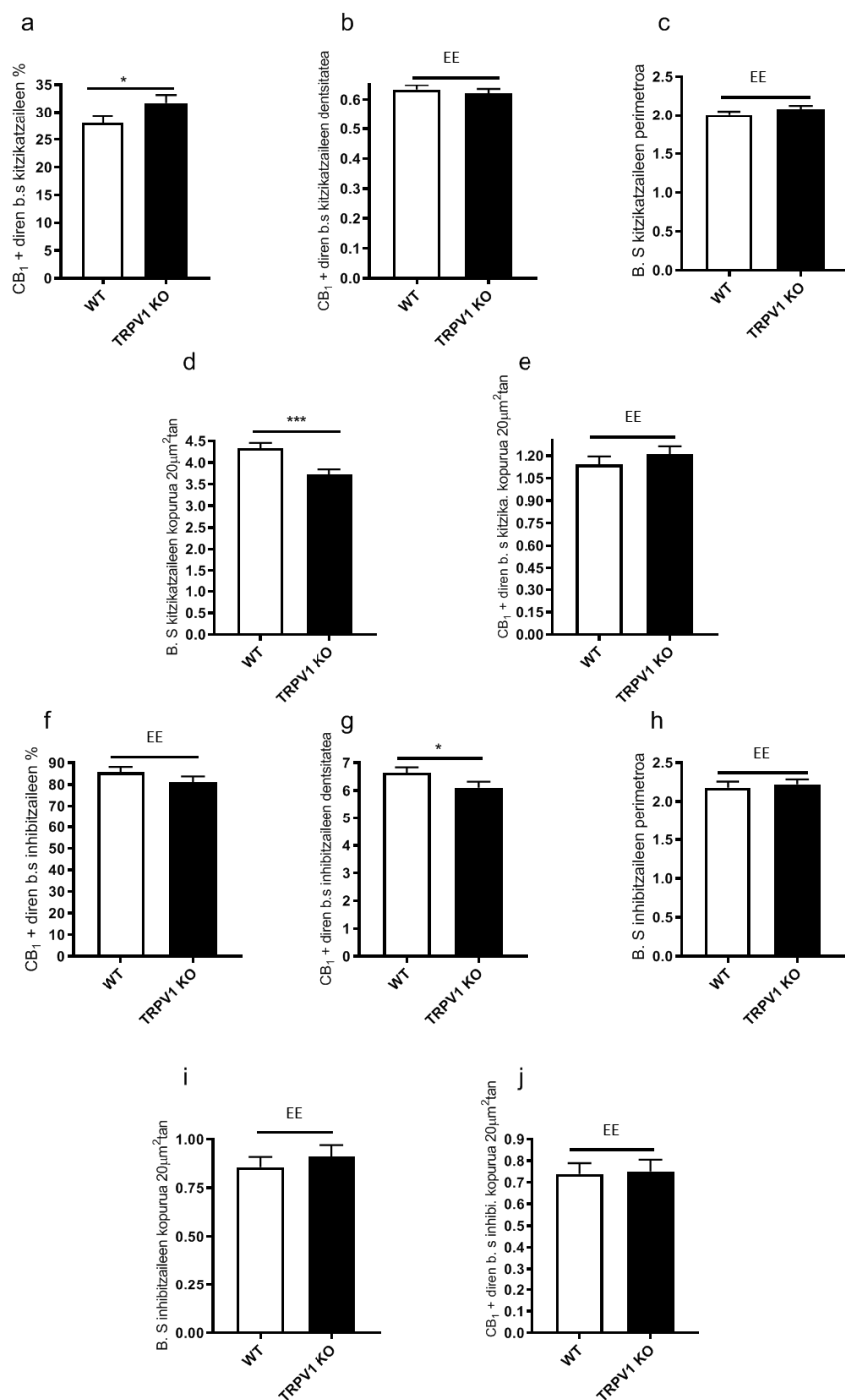
16. irudia. CB₁R bukaera sinaptikoetan kokatzen da WT eta TRPV1-KO saguen MLko kanpoko 2/3etan. Mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu aurreko urre bidezko immunomarkaketa metodoa. CB₁R-ren immunopartikulak (puntu beltzak) bukaera sinaptiko gabaergikoen mintzean (horiak) eta glutamatergikoen mintzean (urdinak) kokatzen dira WT (a eta b) eta TRPV1-KOetan (c eta d). Eskala barrak: 0.5 μ m.



17. irudia: CB₁R detektatzeko immunomarkaketa bikoitza astrozitoetan eta sinapsi gabaergikoetan WT eta TRPV1-KO saguen MLko kanpoko 2/3etan. Mikroskopia elektronikorako erretxinan murgildu aurreko immunoperoxidasa eta urre bidezko immunomarkaketa metodo konbinatua. CB₁R-ren partikulak (gezi gorriak) GFAP positiboak diren prozesu astrozitikoek (purpura) mintzean daude WT (a eta c) eta TRPV1-KOetan (b eta d). Gephyrinaren immunomarkaketaren produktua mintz dendritiko postsinaptikoan (berdea) ikusten da, CB₁R-ren metalezko partikulak aldiz bukaera sinaptiko inhibitzaileetan (horia) WT (e) eta TRPV1-KOetan (f). Urdina: bukaera glutamatergikoak. Eskala barrak: 0.5 μm

MCFLan bezala, CB₁R-rako positiboak diren bukaera sinaptiko glutamatergikoen proportzioak nabarmen egin du gora TRPV1-KOn MLko kanpoko 2/3etan (bukaera kitzikatzaile guztien % 31.71 ± 1.441) WTekin alderatuta (% 28.03 ± 1.331) ($p = 0.0103$;*). Era berean, bukaera sinaptiko glutamatergikoen kopuruan ere murrizketa bat dagoela behatu da TRPV1-KOetan (3.73 ± 0.1154 bukaera) WTekin alderatuta (4.333 ± 0.123 bukaera) ($p = 0.0003$ ***). Nolanahi ere, CB₁R-rako positiboak diren bukaera glutamatergikoen kopurua azalerako (18. irudia e), bukaera glutamatergikoen perimetroa (18c irudia) eta CB₁R-ren dentsitatean bukaera positiboetan (18. irudia b) ez da alde esanguratsurik egon TRPV1-KO eta WT artean (7. taula).

Bukaera gabaergikoei dagokienez, ez zen alde nabarmenik egon CB₁R-rako positiboak diren bukaera inhibitzaileen ehunekoan (18. irudia f), $20 \mu\text{m}^2$ -ko azalerako dauden bukaera gabaergikoen kopuruan (18. irudia i), azalera berean CB₁R-rako positiboak diren bukaera gabaergikoen kopuruan (18. irudia j), ezta bukaera gabaergikoen perimetroan ere (18. irudia h) TRPV1-KO eta WT artean. Hala ere, CB₁R-ren partikulen dentsitatea nabarmen murrizten da TRPV1-KOn (6.0106 ± 0.2148 partikula/ μm) WTko partikulekin alderatuta (6.639 ± 0.1991 partikula/ μm) ($p = 0.0402$;) (18. irudia g) (7. taula).



18. irudia: CB₁R-ren banaketa WT eta TRPV1-KO saguetako MLko kanpoko 2/3etan. a) CB₁R-rako immunopositiboak diren bukaera glutamatergikoen ehunekoa. b) CB₁R-ren (partikulak/µm) dentsitatea CB₁R hartzaile glutamatergiko immunopositiboetan. c) Bukaera glutamatergikoen perimetroa. d) Bukaera glutamatergikoen guztizko kopuru 20 µm²-ko. e) CB₁R-rako + diren bukaera glutamatergikoen kopurua 20 µm²-ko. f) CB₁R-rako immunopositiboak diren bukaera gabaergikoen ehunekoa. g) CB₁R-ren dentsitatea (partikulak/µm) CB₁R bukaera inhibitzaile immunopositiboetan; h) Buakera gabaergikoen perimetroa. i) Bukaera sinaptiko gabaergikoen kopurua 20 µm²-ko. j) CB₁R-rako bukaera gabaergiko immunopositiboen kopurua 20 µm²-ko. Datuak proba ez-parametrikoren edo parametrikoren bidez aztertu ziren kasuaren arabera (Mann-Whitneyren U proba edo Student t proba ez parekatua; * p < 0.05; *** p < 0.0001). Datu guztiak batezbestekoa ± S.E.M. gisa adierazten dira.

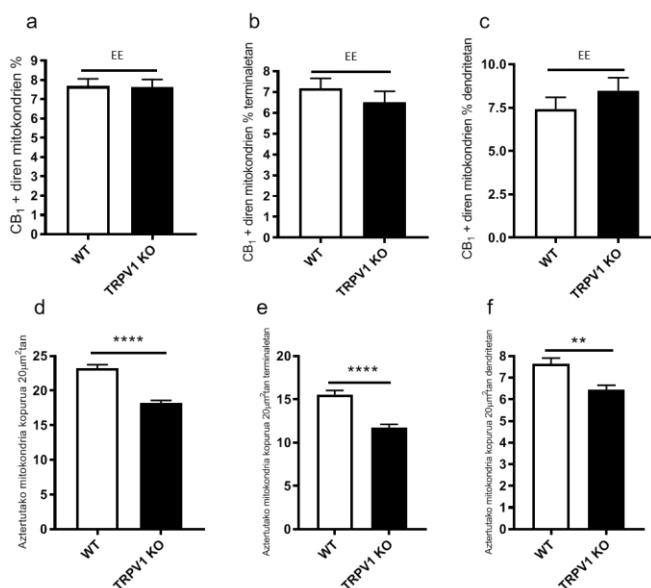
7. taula: MLko kanpoko 2/3etako bukaera sinaptikoetan aztertutako parametroen balioak

Parametroa	WT	TRPV1-KO	p balioa
Lagin azalera osoa (μm^2)	$\sim 6000 \mu\text{m}^2$	$\sim 6000 \mu\text{m}^2$	3 sagu
CB ₁ R + diren bukaera glutamatergikoen %	$28.03 \pm 1.331 \%$ (331 / 1272)	$31.71 \pm 1.441 \%$ (354 / 1093)	p = 0.0103; *
CB ₁ R + diren bukaera glutamatergikoen dentsitatea (partikula / μm)	0.6339 ± 0.0157	0.6203 ± 0.01565	p = 0.2772; ns
Bukaera glutamatergikoen perimetroa (μm)	2.008 ± 0.0432	2.083 ± 0.0422	p = 0.1431; ns
Bukaera glutamatergikoen kopurua 20 μm^2 -ko	4.333 ± 0.123	3.73 ± 0.1154	p = 0.0003; ***
CB ₁ R + diren b. glutamatergikoen kopurua 20 μm^2 -ko	1.143 ± 0.0522	1.208 ± 0.0577	p = 0.4078; ns
CB ₁ R + diren bukaera gabaergikoen %	$85.79 \pm 2.398 \%$ (214 / 252)	$81 \pm 2.705 \%$ (220 / 267)	p = 0.1594; ns
CB ₁ R + diren bukaera gabaergikoen dentsitatea (partikula / μm)	6.639 ± 0.1991	6.0106 ± 0.2148	p = 0.0402; *
Bukaera gabaergikoen perimetroa (μm)	2.179 ± 0.0792	2.22 ± 0.637	p = 0.1288; ns
Bukaera gabaergikoen kopurua 20 μm^2 -ko	0.8567 ± 0.0526	0.9113 ± 0.0593	p = 0.7525; ns
CB ₁ R + diren bukaera gabaergikoen kopurua 20 μm^2 -ko	0.74 ± 0.0494	0.7509 ± 0.0550	p = 0.8098; ns

5.2.6- CB₁R MLko kanpoko 2/3etako mitokondrietan

CB₁R-ren partikulak MLko kanpoko 2/3etako mitokondrien kanpoko mintzetan ere aurkitu ziren, WT eta TRPV1-KO saguetan antzeko banaketa erakutsiz. Gainera, ez zen alderik egon CB₁R-rako positiboak diren mitokondrien proportzioan osotasunean (19. irudia a), ezta terminaletako (19. irudia b) eta dendritetako mitokondria positiboan ehunekoan ere (19. irudia c) TRPV1-KO eta WT saguetan (8. taula).

Hala ere, TRPV1-KOn aztertutako mitokondrien kopuru totala (18.22 ± 0.375 mitokondria 20 μm^2 -ko) WTn baino txikiagoa izan zen (23.24 ± 0.501 mitokondria 20 μm^2 -ko) ($p < 0.0001; ****$) (19. irudia d). Gainera, desberdintasun esanguratsu horiek neurona-konpartimentuen arabera ere hauteman ziren: terminaletan (TRPV1-KO: 11.75 ± 0.369 mitokondria; WT: 15.56 ± 0.472 mitokondria 20 μm^2 -ko) ($p < 0.0001; ****$) (19. irudia e), eta dendritetan (TRPV1-KO: 6.452 ± 0.207 mitokondria; WT: 7.638 ± 0.268 mitokondria 20 μm^2 -ko) ($p = 0.0029; **$) (19. irudia f) (8. taula).



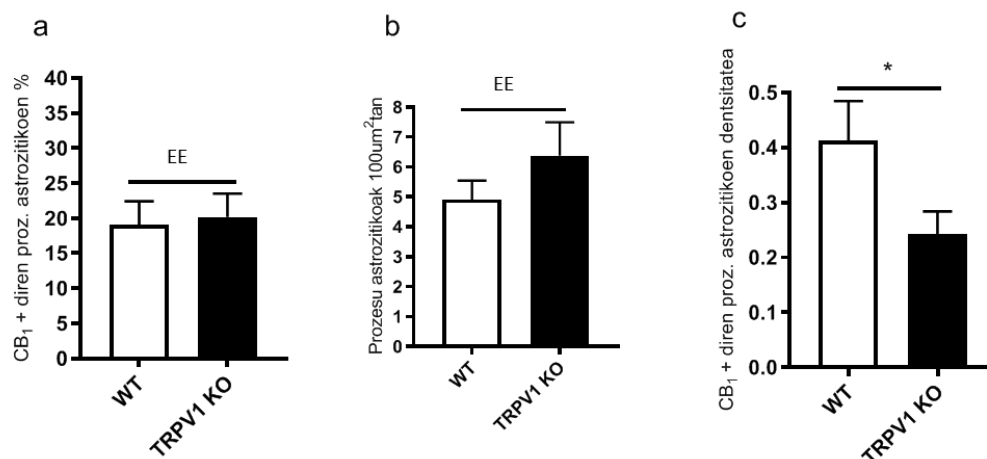
19. irudia: CB₁R-ren banaketa WT eta TRPV1-KO saguen MLko kanpoko 2/3etako mitokondrietan. CB₁R mitokondria immunpositiboehunekoak. b) CB₁R-rako + diren mitokondrien ehunekoak bukaera sinaptikoetan. c) CB₁R-rako + diren mitokondrien ehunekoak dendritetan. d) Aztertutako mitokondria kopurua 20 µm²-ko. e) Terminalietan aztertutako mitokondria kopurua 20 µm²-ko. f) Dendritetan aztertutako mitokondria kopurua 20 µm²-ko. Datuak proba ez-parametrikoen bidez aztertu ziren (Mann-Whitneyren proba; * p < 0.05; ** p < 0.005; *** p < 0.0001). Datu guztiak batezbestekoa ± S.E.M. moduan adierazten dira.

8. taula: MLko kanpoko 2/3etako mitokondrietan aztertutako parametroen balioak

Parametroa	WT	TRPV1-KO	p balioa
Lagin azalera osoa (µm ²)	~ 4000 µm ²	~ 4000 µm ²	3 sagu
CB ₁ R + diren mitokondrien %	7.68 ± 0.375 % (342 / 4042)	7.63 ± 0.4 % (254 / 3024)	p = 0.8748; ns
CB ₁ R + diren mitokondrien % terminalietan	7.175 ± 0.484 %	6.519 ± 0.514 %	p = 0.1452; ns
CB ₁ R + diren mitokondrien % dendritetan	7.432 ± 0.675 %	8.491 ± 0.742 %	p = 0.3711; ns
Mitokondria kopurua 20 µm ² -ko	23.24 ± 0.501	18.22 ± 0.375	p < 0.0001; ****
Mitokondria kopurua 20 µm ² -ko terminalietan	15.56 ± 0.472	11.75 ± 0.369	p < 0.0001; ****
Mitokondria kopurua 20 µm ² -ko dendritetan	7.638 ± 0.268	6.452 ± 0.207	p = 0.0029; **

5.2.7- CB₁R MLko kanpoko 2/3etako astrozitoetan

CB₁R MLko kanpoko 2/3etako astrozitoetan aurkitu zen (17. irudia). CB₁R-ren banaketaren azterketak ez zuen aldaketa esanguratsurik erakutsi CB₁R-rako positiboak diren prozesu astrozitikoaren proportzioan (20. irudia a), ez eta astrozitoek hartzen duten azalera ere (20. irudia b) WT eta TRPV1-KO artean. Aldiz, CB₁R-ren dentsitatea nabarmen murriztu zela ikusi zen TRPV1-KOetan (0.2432 ± 0.0405 partikula/ μm) WTekin alderatuta (0.4122 ± 0.0727 partikula/ μm) ($p = 0.0452$;) (20. irudia c) (9. taula).



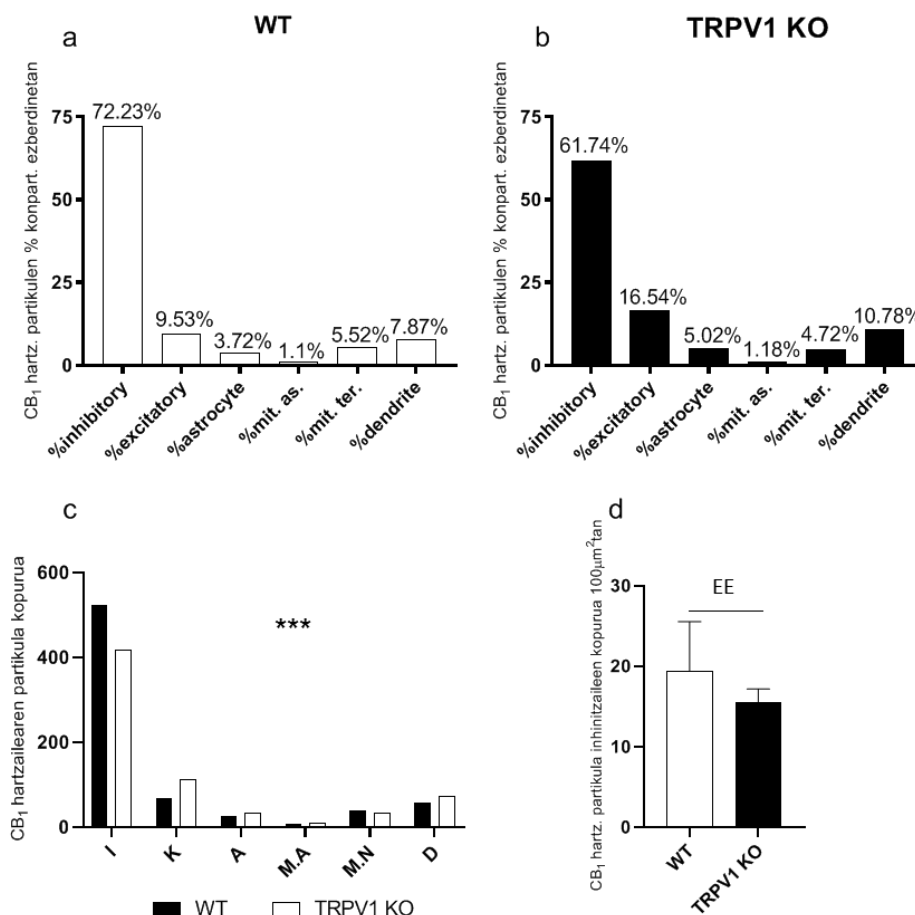
20. irudia: CB₁R-ren banaketa WT eta TRPV1-KO saguen MLko kanpoko 2/3etako astrozitoetan. a) CB₁R-rako immunopositibok diren astrozitoen ehunekoa. b) Prozesu astrozitiko immunopositiboak 100 μm^2 -ko. c) Prozesu astrozitikoetan CB₁R-ren dentsitatea. Datuak proba ez-parametrikoren edo parametrikoren bidez aztertu ziren kasuan kasu (Mann-Whitney U proba edo Student t proba ez parekatua);* $p < 0.05$. Datu guztiak batz bestea \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

9. taula: MLko kanpoko 2/3etako astrozitoetan aztertutako parametroen balioak

Parametroa	WT	TRPV1-KO	p balioa
Lagin azalera osoa (μm^2)	~ 2700 μm^2	~ 2700 μm^2	3 sagu
CB ₁ R + diren prozesu astrozitikoaren %	19.1 \pm 3.29 % (24 / 127)	20.19 \pm 3.31 % (29 / 165)	$p = 0.39$; ns
Prozesu astrozitikoek betetako azalera (μm^2) 100 μm^2 -ko	5.325 \pm 1.008	6.666 \pm 1.493	$p = 0.3401$; ns
CB ₁ R dentsitatea prozesu astrozitikoetan	0.412 \pm 0.0727	0.243 \pm 0.0405	$p = 0.0452$; *

5.2.8- CB₁R-ren partikulen banaketa MLko kanpoko 2/3etan

CB₁R-ren banaketa orokorra ere aztertu dugu, MLko kanpoko 2/3etan identifikatutako profiletan aurkitutako partikula guztiak kontuan hartuta. 21a (WT) eta 21b (TRPV1-KO) irudietan erakusten den bezala, CB₁R-ren partikulen banaketa aldatu egin zen WT eta TRPV1-KO saguen artean. Hala, TRPV1-KOn (21. irudia b), CB₁R-ren partikulen ehunekoa bukaera sinaptiko gabaergikoetan murriztu egin zen, bai eta partikulen proportzioa handitu ere bukaera sinaptiko glutamatergikoetan, astrozitoetan, mitokondrietan eta dendritetan. Horrez gainera, konpartimentu bakoitzean aztertutako partikulen kopuru totala kontuan hartuta (21. irudia c), aldaketa bat zegoela aurkitu zen TRPV1-KO saguetako CB₁R-ren banaketan bukaera sinaptikoen mintzean WTkin alderatuta.

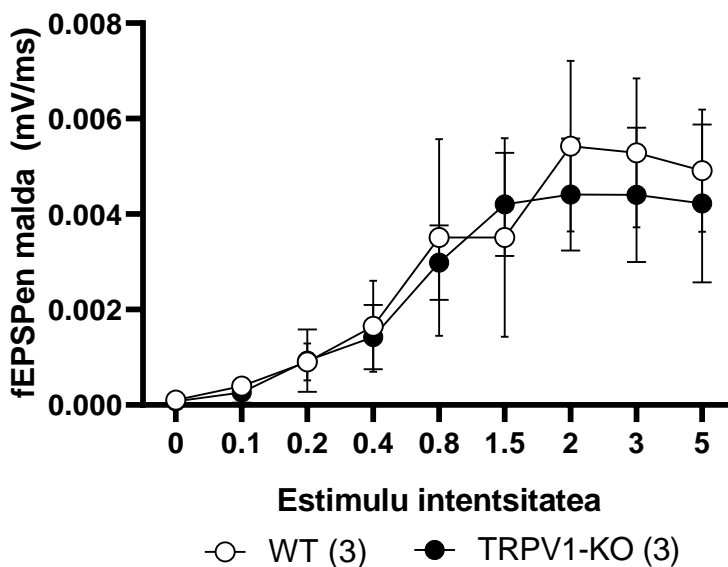


21. irudia: CB₁R-ren banaketa WT eta TRPV1-KO saguen MLko kanpoko 2/3etan. a) CB₁R-ren partikulen proportzioa hainbat konpartimentu ezberdinetan, CB₁R-ren guztizko edukiarekiko normalizatuta WTn. b) CB₁R-ren partikulen proportzioa hainbat konpartimentu ezberdinetan, CB₁R-ren guztizko edukiarekiko normalizatuta TRPV1-KOn. c) Chi karratuaren proba.*** p < 0.001. d) 100 μm²-ko eremuan bukaera gabaergikoetan aurkitutako CB₁R-ren partikula kopurua. Mann Whitney U proba. p > 0.05. Datu guztiak batezbestekoa ± S.E.M. gisa adierazten dira.

5.3- Plastikotasun sinaptikoa TRPV1-KO saguen DGMLan

Bihurgune horzduneko molekula-geruzako plastikotasun sinaptikoa TRPV1-KO saguetan ikertu zen, maiztasun txikiko estimulazio-protokolo (LFS) baten bidez. Protokolo horrek, jakina denez, eCBek bideratutako eLTDa eragiten du bihurgune horzdunean (Peñasco et al., 2019). DGMLko azterketa mikroskopia elektronikoaren bidez aztertutako bi eremuetan banatu zen: MCFL eta MLko kanpoko 2/3etan. Era berean, MLko kanpoko 2/3ak anatomikoki ezberdintutako bi eremutan banatu ziren: bata, MPP, eta bestea, LPP, erdialdeko eta alboko kortex entorrinalaren aferentziak jasotzen dituztenak, hurrenez hurren.

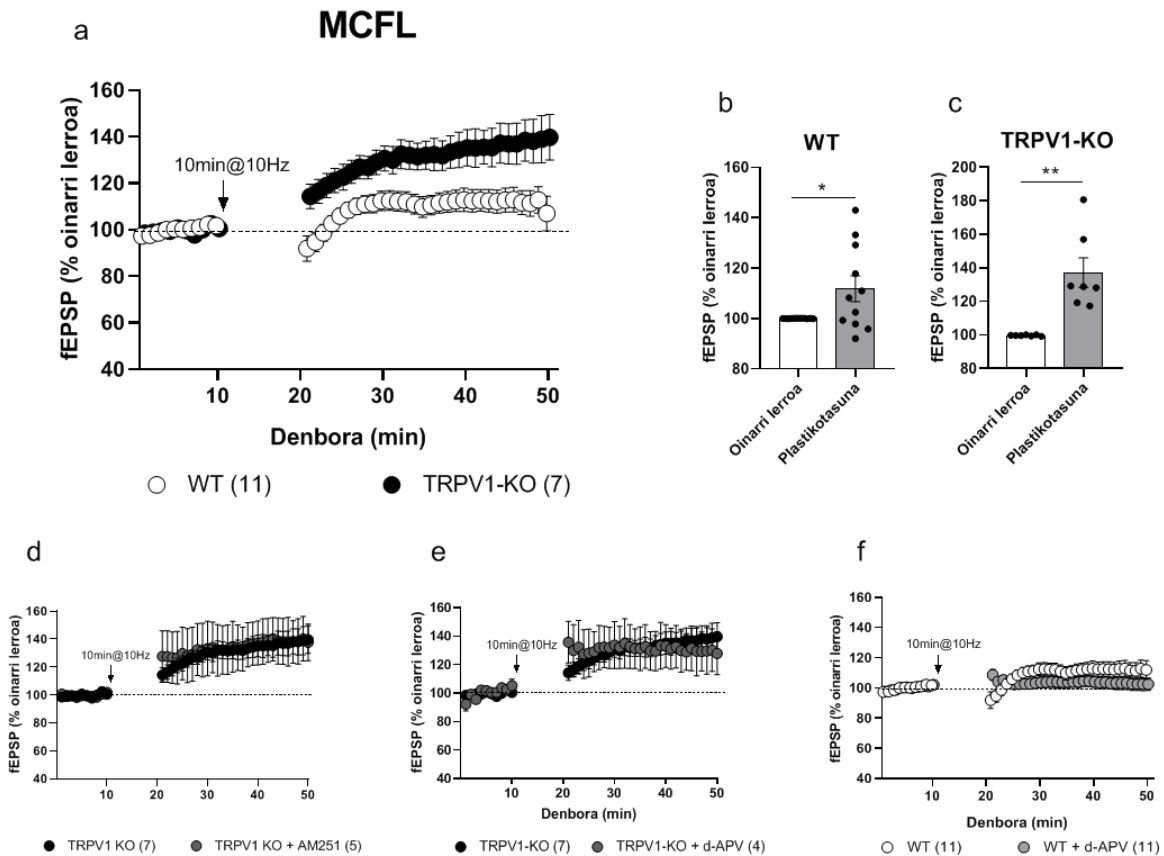
Deskribatu da CB₁R eta TRPV1 hartzaileak proportzio ezberdinetan daudela MLko eremu ezberdinetan (Puente et al., 2015; Canduela et al., 2015; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2016; Bonilla-Del Río et al., 2019). Gainera, hartzaile horiek DGMLan plastikotasun sinaptiko mota ezberdinatean parte hartzen dutela ere deskribatu da (Chavéz et al., 2011; 2014; Puente et al., 2011; Wang et al., 2016; 2018; Peñasco et al., 2019). Erregistro elektrofisiologikoetarako, gehieneko seinalea lortzeko beharrezkoa den gutxieneko intentsitatea ezarri zen (22. irudia). Balio maximoaren % 60eko intentsitatea erbili zen plastikotasun-protokoloetarako eta transmisio sinaptikoaren azterketarako. Ezarritako intentsitateari dagokionez, ez zen alde esanguratsurik aurkitu WT (fEPSPen batez besteko malda: 0.002855 ± 0.0007114) eta TRPV1-KO (fEPSPen batez besteko malda: 0.002547 ± 0.000622 ; $p = 0.0977$; ns) artean.

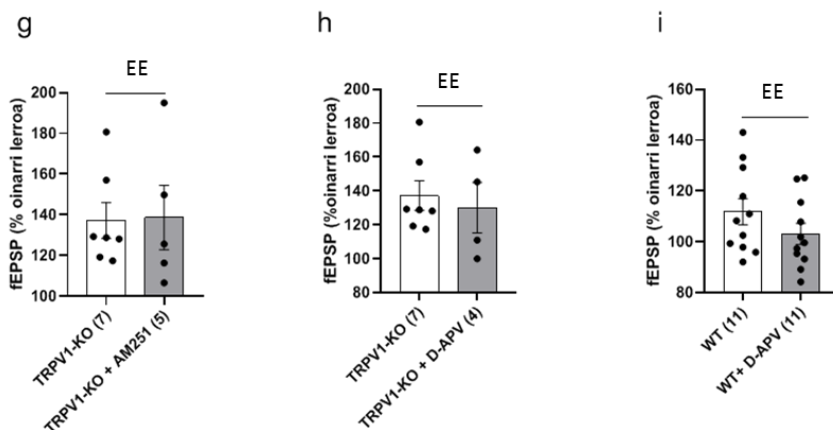


22. irudia: TRPV1 ezabatze genetikoaren ondoren ez dago aldaketarik oinarrizko jardueraren maiztasunean. Estimulazio-intentsitate ezberdinen aurrean sarrera-irteera kurbak, fEPSPen batezbesteko malden bidez adierazita (mv/ms) WT eta TRPV1-KO saguen hipokanpoko ebakietan. Kurba azpiko azalera erabili zen datuak aztertzeko. Wilcoxon proba. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

5.3.1- Plastikotasun sinaptikoa MCFLan

MCFLan, aurretik gure laborategian Peñasco eta lankideek (2019) erakutsi zuten bezala, ez zegoen eCBek bideratutako fEPSPen LTDrik WT saguetan LFSren bidez estimulatu ondoren. Aitzitik, fEPSPen LTP txiki bat aurkitu zen WTn ($\% 111.8 \pm 5.111$; $p = 0.0315$;) (23. irudia a-b). Esperimentu bera TRPV1-KOn frogatzerakoan LTP hori handitu egin zen ($\% 137.2 \pm 8.748$; $p = 0.0011$;) (23. irudia a-c). TRPV1-KOn gertatzen den indartze hori ez zen AM251 ($[4 \mu\text{m}]$; $\% 138.7 \pm 15.82$; $p = 0.6389$; ns) (23. irudia d-g), alderantzizko agonista aplikatu ondoren indargabetu, ez eta NMDAR-ren antagonista den DL-APV ($[50 \mu\text{m}]$; $\% 130.1 \pm 14.9$) aplikatu ondoren ere. Honekin batera, WT saguetan ere, MCFLan LFS estimulazioaren ondoren lortutako potentzia ez zen guztiz murriztu DL-APV ($[50 \mu\text{m}]$; $\% 103.1 \pm 4.145$; $p = 0.1982$; ns) (23. irudia e-i) aplikatzeagatik.





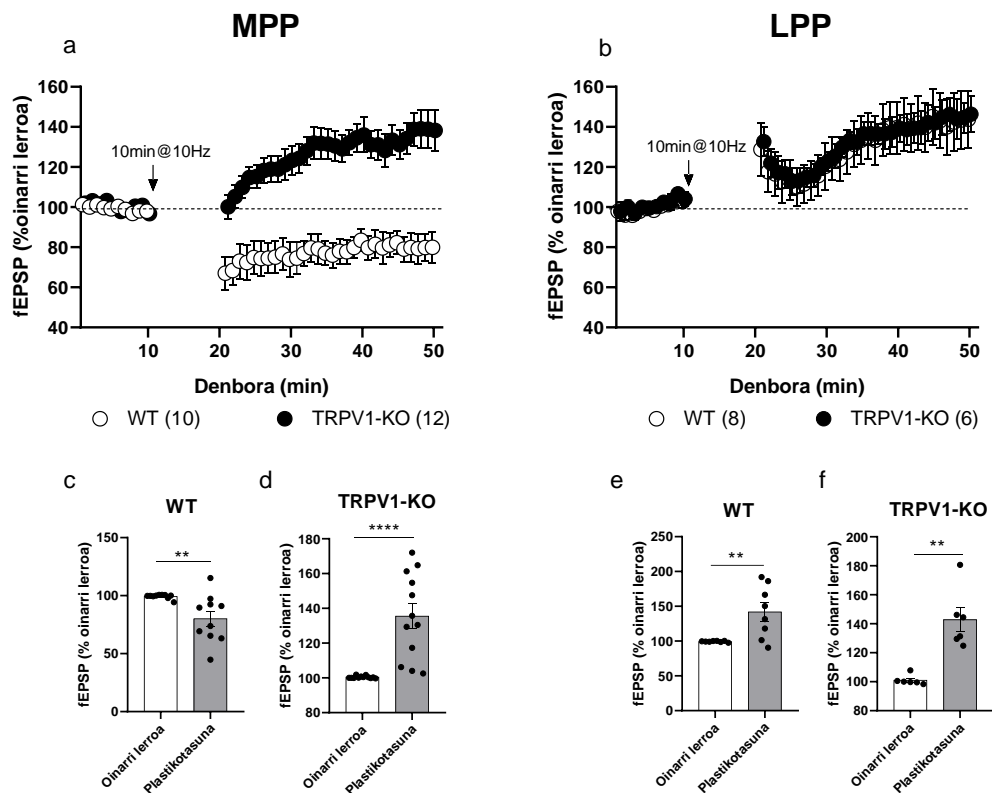
23. irudia: Kitzikapenaren epe luzeko indartzea (LTP) MCFLko sinapsietan WT eta TRPV1-KO saguetan.

Esperimentu bakoitza bere oinarriko lerroa normalizatu zen. fEPSPen batezbesteko eremua erakusten da. Gezi beltzak maiztasun baxuko estimulazio-protokoloaren aplikazioa (LFS) adierazten du. a) Maiztasun baxuko estimulazio sinaptikoak (LFS, 10 min, 10 Hz) LTPa eragiten du WT saguetan (zirkulu zuriak) eta TRPV1-KO saguetan ere (zirkulu beltzak). b) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria LFSren ondoren. Student t proba ez parekatua. * $p < 0.05$. c) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, TRPV1-KO saguetan. Student t proba ez parekatua.** $p < 0.005$. d) AM251 [4 μ M] farmakoak ez du inolako eraginik LFSren ondoren behatutako LTPan TRPV1-KO saguetan (zirkulu grisak). e) eta f) D-APV [50 μ M] ez du eraginik LFSren ondoren ikusitako LTPan WT eta TRPV1-KO saguetan. g) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, AM251 [4 μ M] aurreko TRPV1-KO saguen erantzuna. Mann Whitneyren U proba. $p > 0.05$. h) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, D-APV [50 μ M] aurreko erantzuna TRPV1-KO saguetan. Mann Whitneyren U proba. $p > 0.05$. i) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, D-APV [50 μ M] aurreko erantzuna, WT saguetan. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

Oro har, datuek TRPV1 ezabatzeak MCFLko plastikotasunean eragina zuela erakutsi zuten, baina LTPprako adaketa ez zuen CB₁Rk bideratu. Aitzitik, badirudi NMDA hartzaileak parte hartzen dutela WTetan behatutako potentziazioan, baina ez TRPV1-KOek erakutsitakoan.

5.3.2- Plastikotasun sinaptikoa PPan

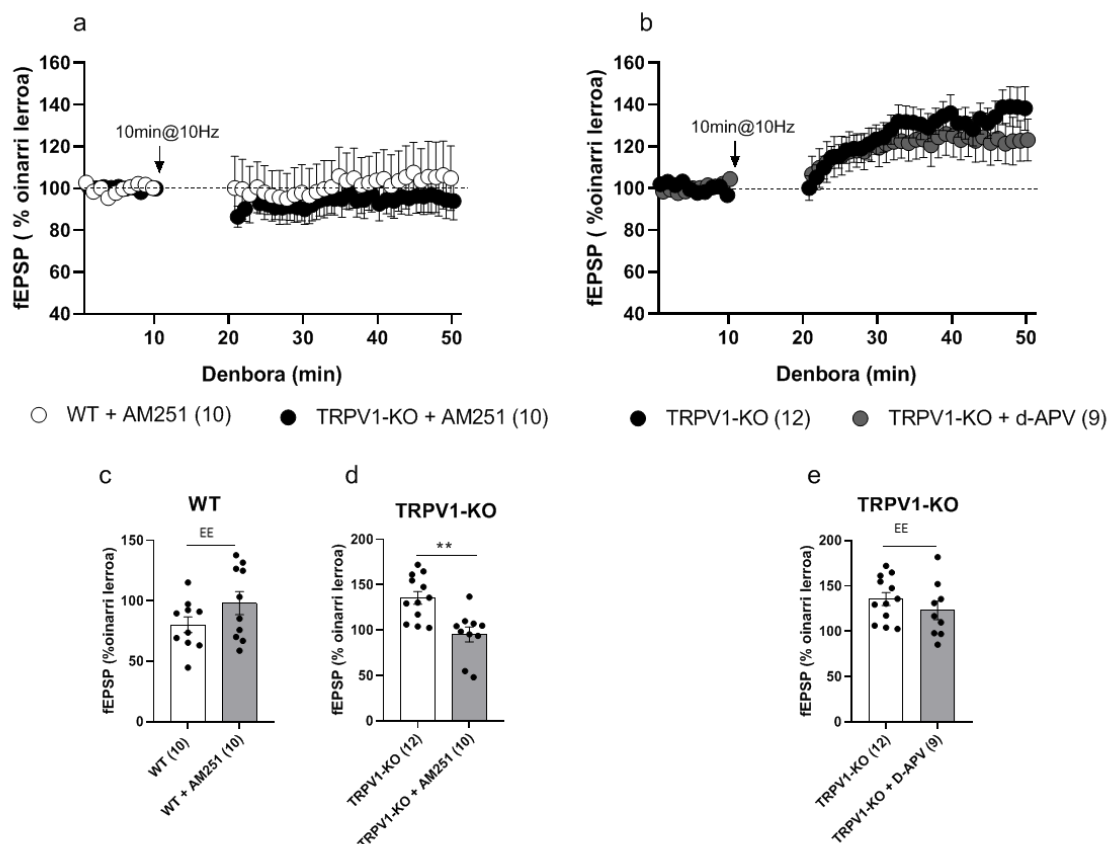
MPPan, gure laborategiak aurrez deskribatutako eCBek bideratutako kitzikapenaren LTDa (eLTD) (Peñasco et al., 2019) berretsi zen WT saguetan: fEPSPak nabarmen murriztu ziren LFSren ondoren (% 80.21 ± 6.497 ; $p = 0.0021$;**) (24. irudia a-c). Ordea, TRPV1-KOn fEPSPak nabarmen indartu zirela behatu zen LFSren ondoren (% 135 ± 7.119 ; $p < 0.0001$ ****) (24. irudia a-d). LPPan berriz, oinarriko lerroa bai WTetan bai TRPV1-KOetan indartu egin zen (WT: % 142 ± 13.44 ; $p = 0.0068$ ** (24. irudia b-e) // TRPV1-KO: % 142.9 ± 8.314 ; $p = 0.0022$ ** (24. irudia b-f)).



24. irudia: Kitzikapenaren epe luzeko indartzea (eLTP) MPPko sinapsietan TRPV1-KO saguetan eta eLTP LPPko sinapsietan WT eta TRPV1-KO saguetan. Esperimentu bakoitza bere oinarritzko lerroa normalizatzen. fEPSPen eremuaren batezbestekoa erakusten da. Gezi beltzak LFSren aplikazioa markatzen du (10 min, 10 Hz). a) MPPan, LFSak, eLTDa eragiten du WTn (zirkulu zuriak) eta eLTPa sortzen du TRPV1-KOn (zirkulu beltzak). b) LPPan berriz, LFSak, eLTP eragiten du WTn (zirkulu zuriak) eta TRPV1-KOn (zirkulu beltzak). c) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren MPPan, WTn. Mann Whitney U proba. ** p < 0.005. d) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren MPPan, TRPV1-KOn. Mann Whitney U proba. *** p < 0.0001. e) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, WTen LPPan LFSren ondoren. Student t proba ez parekatua. ** p < 0.005. f) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren LPPan, TRPV1-KOn. Mann Whitney U proba. ** p < 0.005. Datu guztiak batezbestekoa ± S.E.M. gisa adierazten dira.

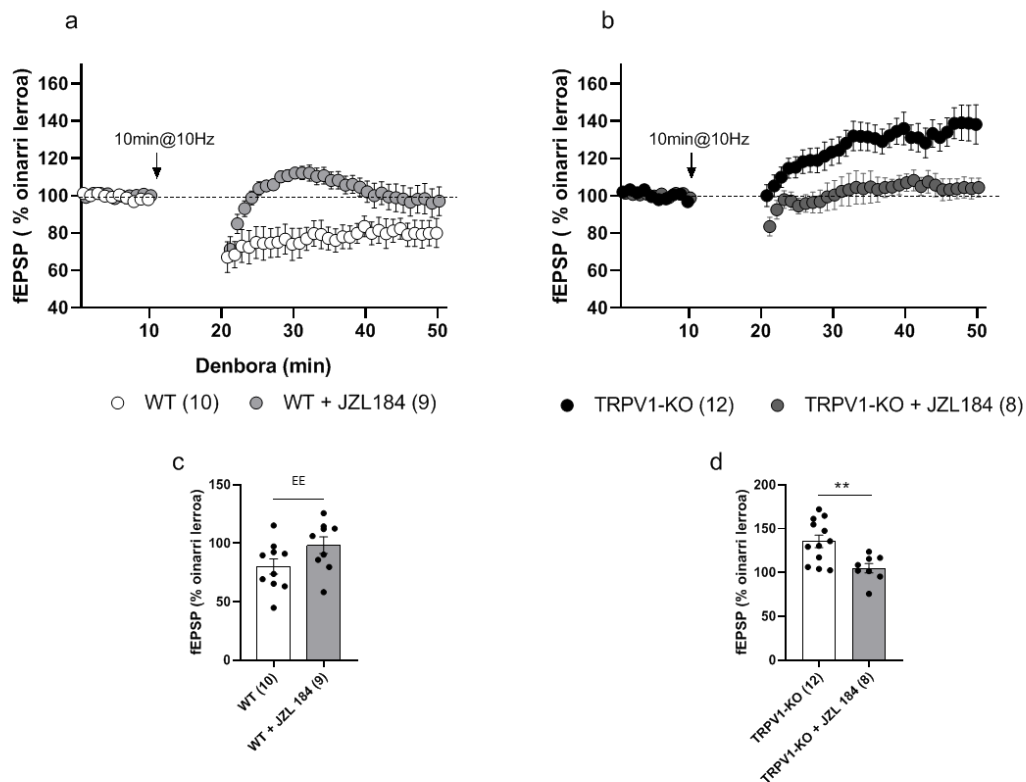
Emaitza horiek kontuan hartuta, TRPV1-KO saguen MPPan hautemandako plastikotasun-aldaketan jarri zen arreta. Hori hobeto ezaugarritzeko, NMDA hartzaileen inplikazioa ikertzeaz gain, anandamidaren eta 2-AGren parte-hartzea ere aztertu zen, bi eCB horien sintesian eta degradazioan eragina duten farmakoak aurrez inkubatuz. Gainera, CB₁R-ren banaketan eta eCBekin lotutako proteinen adierazpenean ikusitako aldaketek zuzeneko eragina izan zezaketela baieztatzeko TRPV1-KOen MPPan behatutako eLTPan, WT saguetan, TRPV1ren blokeo farmakologikoa probatu zen, konparazioa ahalbidetzeko eta TRPV1ren blokeo-baldintzak imitatzeko, konpentsazio-ondoriorik izan gabe. LFSren aplikazioaren ondoren TRPV1-KOen MPPan atzemandako LTPan CB₁Rk parte hartzen zuen zehazteko, AM251 aplikatu zen. WTn, gure taldeak lehenago deskribatu duen bezala (Peñasco et al., 2019), fEPSPen murrizketa CB₁Ra blokeatuz

leheneratu zen (AM251 [4 μ m]; % 98.16 ± 9.553 ; $p = 0.1377$; ns) (25. irudia a-c). TRPV1-KOn bere aldetik, fEPSPen indartze-prozesu nabarmena ere murriztu egiten zen AM251 aplikatu ondoren ([4 μ m]; % 95.37 ± 8.263 ; $p = 0.0034$;**) (25. irudia a-d). Gainera, DL-APVk ez zuen inolako eragin esanguratsurik izan fEPSPen indartzean, TRPV1-KOn ([50 μ m]; % 123 ± 10.17 ; $p = 0.3128$; ns) (25. irudia b-e).



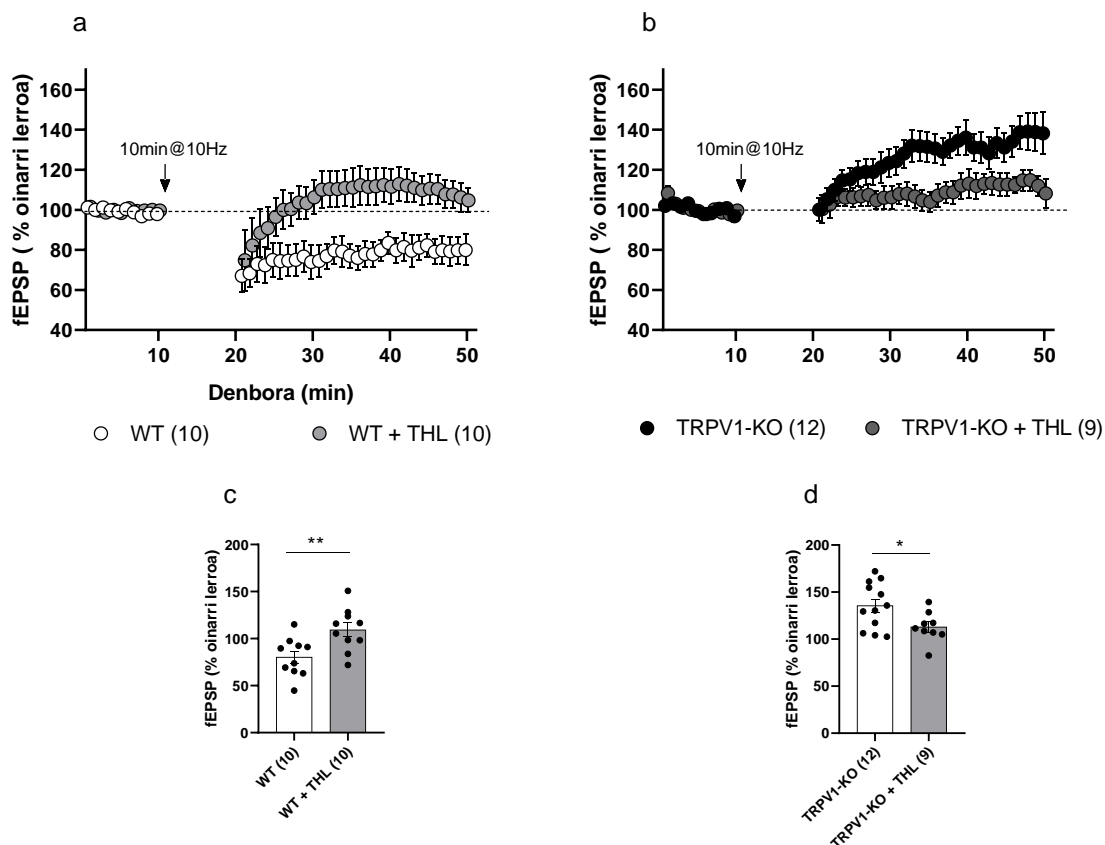
25. irudia: eLTD eta eLTP WT eta TRPV1-KO saguen MPPko sinapsietan, hurrenez hurren, CB₁R-ren mendekoak dira, baina ez NMDA hartzailearen mendekoak. Esperimentu bakoitza bere oinarriko lerroa normalizatu zen. fEPSPen azaleraren batezbestekoa erakusten da. Gezi beltzak LFSren aplikazioa adierazten du. a) AM251ren [4 μ M] aplikazioak eragin esanguratsua du bai LTD zein LTPan, WT (zirkulu zuriak) eta TRPV1-KOn (zirkulu beltzak). b) D-APVak [50 μ M] ez du inongo eraginik TRPV1-KOn ikusitako LTPan. c) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, WTn AM251ren [4 μ M] aurrean. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. d) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, AM251ren [4 μ M] aurrean TRPV1-KOn. Mann Whitney U proba. ** $p < 0.005$. e) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, D-APVaren [50 μ M] aurrean,TRPV1-KOn. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. moduan adierazten dira.

WTn, JZL 184 MAGLren inhibitzailearen ondorioz 2-AG mailak handitzeak, LFSak MPPan eragindako depresioa murriztu zuen ([50 μ m]; % 98.34 ± 7.11 ; $p = 0.0765$; ns) (26. irudia a-c). Gainera, JZL 184ak nabarmen blokeatu zuen TRPV1-KOn ikusitako indartzea ([50 μ m]; % 104.9 ± 5.317 ; $p = 0.0058$ **) (26. irudia b-d).



26. irudia: 2-AGren mailak igotzeak LTDa eta LTPa blokeatzen ditu WT eta TRPV1-KO saguen MPPko sinapsietan, hurrenez hurren. Esperimentu bakoitza bere oinarriko lerroa normalizatu zen. fEPSPen azaleraren batezbestekoa erakusten da. Gezi beltzak LFSren aplikazioa adierazten du. a) JZL 184k [50 μ M] efektu esanguratsua du WTn LFSren ondoren behatutako LTDan (gris-argi koloreko zirkuluak). b) JZL 184k [50 μ M] nabarmen eragiten dio LFSren ondoren ikusitako LTPari, TRPV1-KOn (gris-ilun koloreko zirkuluak). c) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, JZL 184aren [50 μ M] aurrean, WTn. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. d) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, JZL 184 [50 μ M] aurrean, TRPV1-KOn. Student t proba ez parekatua. ** $p < 0.005$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

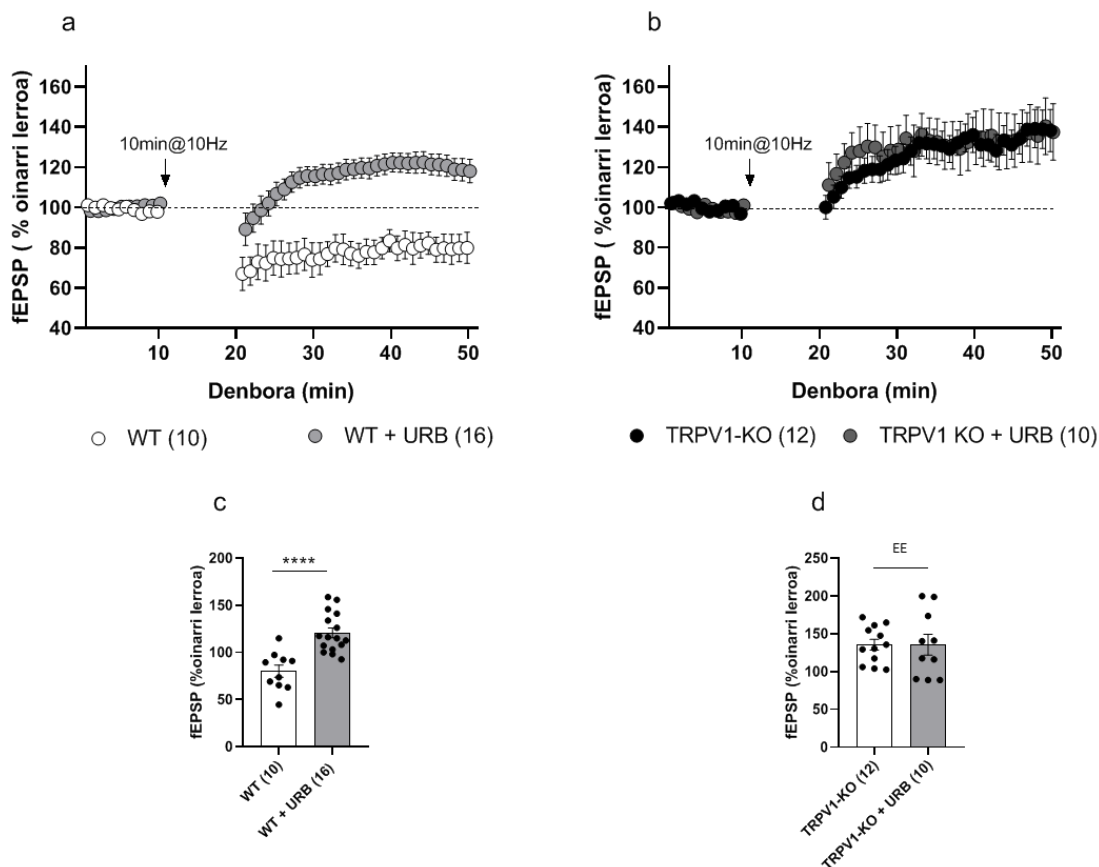
Gero, 2-AG mailak farmakologikoki gutxitu egin ziren, perfusio-medioari DAGL α entzimaren THL inhibitzailea gehituz. WTn, THLk oinarriko lerroa lehengoratu zuen fEPSPetan ikusitako depresioa ([10 μ m]; % 109.3 ± 7.206 ; $p = 0.0077$;**) (27. irudia a-c). THLk, halaber, nabarmen murriztu zuen TRPV1-KOetan behatutako fEPSPen sustapena ([10 μ m]; % 112.9 ± 5.295 ; $p = 0.0273$;) (27. irudia b-d).



27. irudia: 2-AGren mailak murrizteak eLTDa eta eLTPa blokeatzen ditu WT eta TRPV1-KO saguen MPPko sinapsiak, hurrenez hurren. Esperimentu bakoitza bere oinarriko lerroa normalizatu zen. fEPSPen eremuen batezbestekoa erakusten da. Gezi beltzak LSFren aplikazioa adierazten du. a) THLk [10 μ M] eragin esanguratsua du WTn LFSren ondoren behatutako LTDan (gris-argi koloreko zirkuluak). b) THLak [10 μ M] nabarmen eragiten dio TRPV1-KOn ikusitako LTPari (gris-ilun koloreko zirkuluak). c) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, THLren aurrean [10 μ m], WTn. Student t proba ez parekatua. ** p < 0.005. d) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, THLren aurrean [10 μ m], TPV1-KOn. Student t proba ez parekatua. * p < 0.05. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

Oro har, datu horiek aditzera ematen dutenez, 2-AGren tonu zuzena behar da CB₁Rek bideratutako plastikotasun sinaptikoaren funtzionamendu normalerako; izan ere, haren mailak handitzean edo gutxitzean, aldatu egiten da LFSak WT eta TRPV1-KO saguen MPPan eragindako plastikotasuna.

Azkenik, anandamidaren inplikazioa ere aztertu zen, FAAHren inhibitzailea, URB597, perfusio-medioan aplikatuz. WTn, URB597ak fEPSPen depresioa indartze esanguratsu batera eraman zuen ([2 μ M]; % 120.8 ± 5.174 ; p < 0.0001;****) (28. irudia a-c). Paradoxikoki, TRPV1-KOn, LFSren ondoren behatutako fEPSPen indartzea aldaketarik gabe mantendu zen URB597ren presentzian ([2 μ m]; % 135.5 ± 13.65 ; p = 0.9989; ns) (28. irudia b-d).



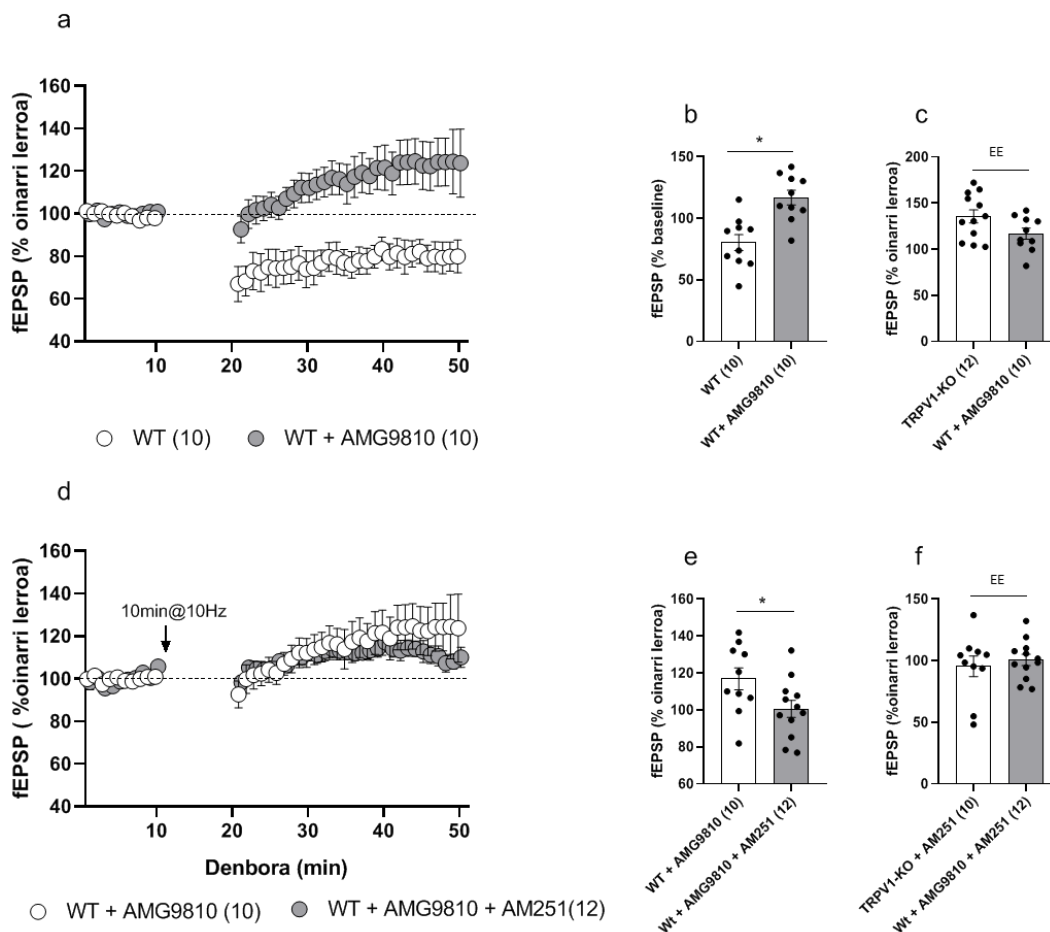
28. irudia: Anandamidaren mailak handitzeak MPPan plastikotasuna LTD izatetik LTP izatera aldatzen du WT saguetan. Esperimentu bakoitza bere oinarrizko lerroa normalizatu zen. fEPSPen azaleren batezbestekoa erakusten da. Gezi beltzak LFSren aplikazioa markatzen du. a) URB597ak [2 μ M] efektu esanguratsua du LFSren ondoren WTn behatutako LTDan (zirkulu gris-argia). b) URB587ak [2 μ M] ez dio TRPV1-KOn behatutako LTPari eragiten (zirkulu gris-iluna). c) fEPSPen azken 10 minutuen adierazgarri den histograma, LFSren ondoren, URB597ren [2 μ M] presentzian, WTn. Student t proba ez parekatua. **** $p < 0.0001$. d) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, URB597ren [2 μ M] presentzian, TRPV1-KOn. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

Emaitza horietan oinarrituta, iradokitzen dugu, 2-AGan ez bezala, anandamidak ez duela parte hartzen LFSren ondoren TRPV1-KO saguen MPP sinapsietan aurkitutako LTPan. Bitxia bada ere, badirudi anandamidak fEPSP indartzea eragiten duela WTn LFSren ondoren, eta ez du TRPV1 sustatzen.

Emaitza horietan oinarrituta, 2-AG ez bezala, anandamidak ez duela LFSren ondoren TRPV1-KO saguetako MPPko sinapsietan dagoen LTPan parte hartzen iradokitzen dugu. Bitxia bada ere, badirudi anandamidak fEPSPen indartzea eragiten duela WTn, LFSren ondoren, eta TRPV1n ez

duela hori bultzatzen. Nolanahi ere, anandamida-faltaren inpaktua ez da zuzenean ebaluatu, eta beraz, anandamidak TRPV1-KO saguetan sabai-efektua izan dezakeela espekulatu daiteke baita.

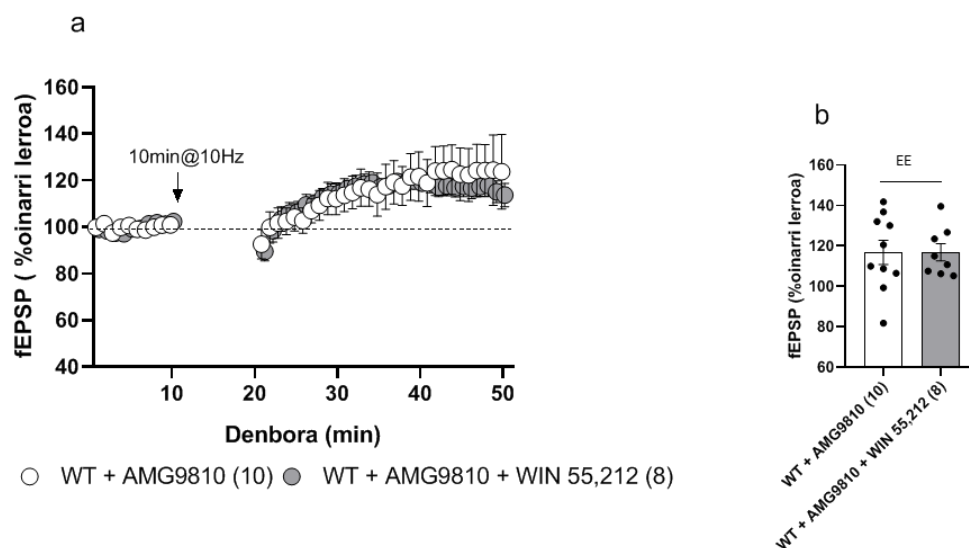
TRPV1-KO sagan ikusitako ultraegitura mailako aldaketek, MPPan behatutako plastikotasun sinaptikoaren aldaketan eraginik izan ote zezaketen ebaluatzeko, TRPV1 hartzailearen antagonista den AMG9810 aplikatu zen. Baldintza horietan, LFSak nabarmen indartu zuen MPPan ikusitako fEPSPak WTn ($[3 \mu\text{M}]$; $\% 116.8 \pm 5.957$; $p = 0.0185$;) (29. irudia a-b), baina indartze hori ez zen izan TRPV1-KOetan ikusitakoa bezain sendoa (TRPV1-KO: $\% 135.5 \pm 7.119$ vs WT: $\% 116.8 \pm 5.957$; $p = 0.0638$; ns) (29. irudia c). Gainera, AM251ak nabarmen murriztu zuen AMG9810ak eragindako fEPSPen sustapena ($[4 \mu\text{M}]$; $\% 100.6 \pm 4.653$; $p = 0.0413$;) (29. irudia d-e), TRPV1-KOn eragindako murrizketaren antzeko mailak erakutsiz (TRPV1-KO: $\% 95.37 \pm 8.263$ vs WT: $\% 100.6 \pm 4.653$; $p = 0.8212$; ns) (29. irudia f).



29. irudia: TRPV1ren antagonismoak LTP eragiten du WT saguen MPPko sinapsietan. Esperimentu bakoitza bere oinarriko lerroa normalizatu zen. fEPSPen eremuen batezbestekoa erakusten da. Gezi beltzak LFSren aplikazioa adierazten du. a) AMG9810 [3 μ M] aplikatzeak nabarmen aldatzen du WTn behatutako LTDa (zirkulu zuriak) LTPra (zirkulu grisak). b) fEPSPFen azken 10 minutuen histograma adierazgarria LFSren ondoren, WTn, AMG9810aren [3 μ M] presentzian. Student t proba ez parekatua. * $p < 0.05$. c) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria LFSren ondoren, AMG9810aren [3 μ M] aurrean WTn duen eragina, TRPV1-KOn duen eraginarekin alderatuta. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. d) AM251ak [4 μ M] eragin esanguratsua du WT + AMG9810ean (zirkulu grisak) LFSren ondoren ikusitako LTPan. e) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, AM251aren [4 μ M] aurrean, WT + AMG9810ean. Student t proba ez parekatua. * $p < 0.05$. f) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, AM251aren [4 μ M] aurrean WT + AMG9810ean duen eragina, TRPV1-KOn duen eraginarekin alderatuta. Mann Whitney U proba. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

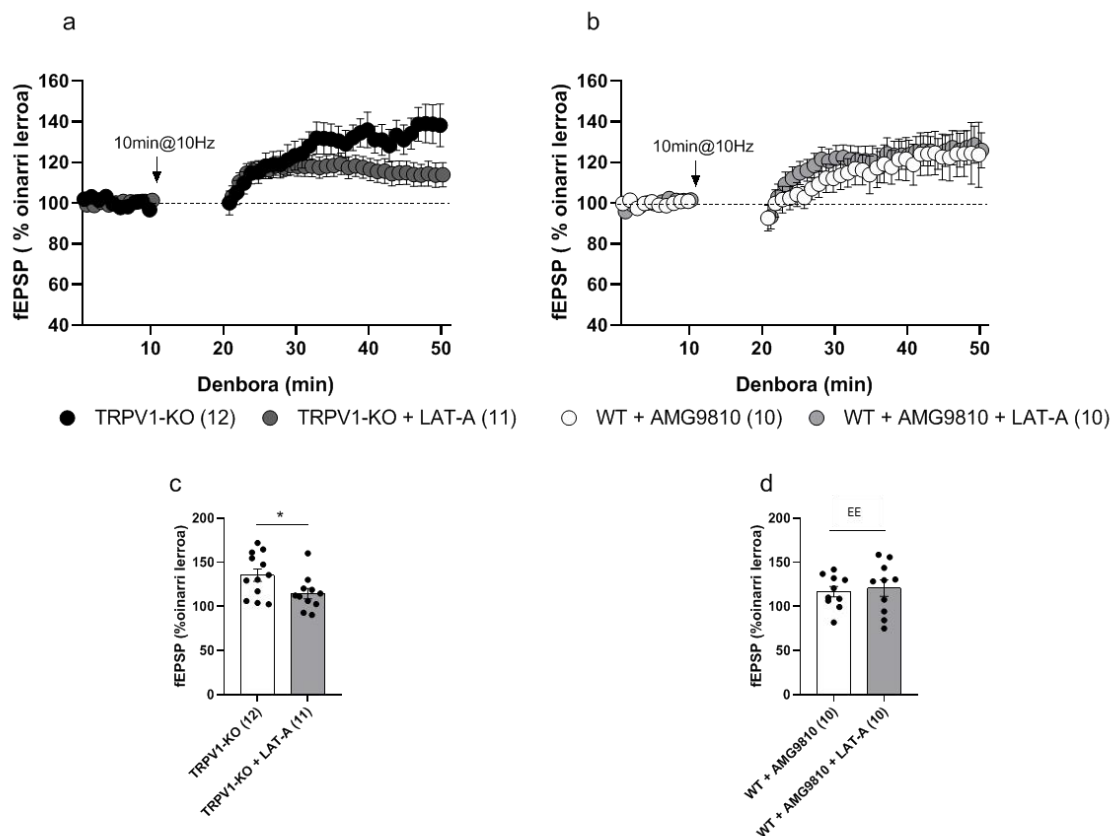
Datu horiek iradokitzen dute MPPan TRPV1ren blokeoak LFSak eragindako LTD eraldatu dezakeela eta LTP batera eraman, eCBak bitarteko direlarik zeregin horretan. Hala ere, fEPSPen sustapena ez zen bera izan, TRPV1ren antagonismo farmakologikoa, TRPV1ren ezabatze genetikoarekin alderatu zenean, ziur asko ECSn hautemandako aldaketa biokimiko eta ultrastrukturelek eragin zuzena izan dezaketelako plastikotasun sinaptikoaren aldaketa horretan, TRPV1 gabeko indartzea handiagoa bilakatu.

Aldaketa horiek TRPV1-KOetan behatutako LTParen oinarri mekanismoetan zuen eragina egiaztatzeko, CB₁R-ren agonista den WIN 55.212 aplikatu zen AMG9810ren presentzian, CB₁R gehiago aktibatzeak fEPSPen sustapena areagotu ote zezakeen jakiteko. Egia esan, WIN 55.212ak ez zuen eraginik izan TRPV1 antagonistaekin behatutako fEPSPen indartzean ([5 μM]; % 116.9 ± 4.291; p = 0.9927; NS) (30. irudia a-b).



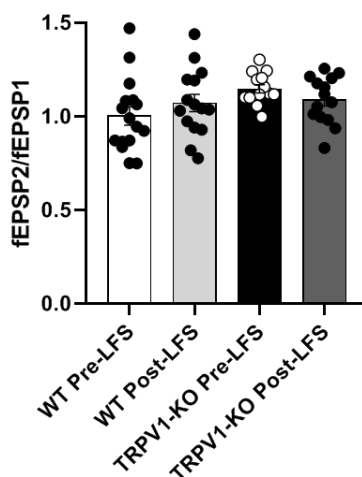
30. irudia: CB₁R aktibatzeak ez du LTPa handitzen MPPan, TRPV1 farmakologikoki blokeatuta dagoenean WTn. a) WIN 55.212ak [5 μM] LFSren ondoren ikusitako LTPan ez du eraginik WT + AMG9810an (zirkulu grisak). b) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, LFSren ondoren, WIN 55.212en [5 μM] presentzian WT + AMG9810an. Student t proba ez parekatua. p > 0.05. Datu guztiak batezbestekoa ± S.E.M. gisa adierazten dira.

Datu horiek iradokitzen dute TRPV1-KO saguetan ikusitako fEPSPen sustapena ez dela CB₁R-ren aktibazio handiagoaren ondorio, aktibazio hori beharrezkoa zela frogatu zen arren. Gai hau ebazteko, CB₁Rk aktibatutako zelula barneko beste mekanismo batzuk aztertu ziren, adibidez, aktina filamentuen parte-hartzea. LPPan, CB₁Rek bultzatutako aktina filamentuen fosforilazioa, eragindako LTParentzat beharrezkoa zela frogatu zen (Wang et al., 2018), aktina filamentuen fosforilazioaren inhibitzaileak, latrunculina-Ak (LAT-A), prozesu hori blokeatzea dakar. Bitxia bada ere, LAT-Ak nabarmen murriztu zuen TRPV1-KOn ikusitako LTPa ([0.5 mM]; % 114.6 ± 5.78; p = 0.0348;*) (31. irudia a-c). LAT-Ak, era berean, ez zuen aldatu AMG9810ak WTn eragindako fEPSPen sustapena ([0.5 mM]; % 120.9 ± 9.248; p = 0.7173; ns) (31. irudia b-d).



31. irudia: LAT-Ak LTPa murrizten du MPPko sinapsietan TRPV1-KO saguetan, baina ez du eragirik TRPV1ren antagonismoak WT saguetan eragindako LTPan. Esperimentu bakoitza bere oinarriko lerroa normalizatu zen. fEPSPen eremuen batezbestekoa erakusten da. Gezi beltzak LFSren aplikazioa markatzen du. a) Latrunculina-Aren [0.5 mM] aplikazioak efektu esanguratsua du LFSren ondoren ikusitako LTPan TRPV1-KOn (zirkulu gris-iluna). b) Latrunculina-Ak [0.5 mM] ez du eragirik LFSren ondoren ikusitako LTPan WT + AMG9810ean (gris-argi koloreko zirkuluak). c) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria LFSren ondoren latrunculina-Aren [0.5 mM] aurrean TRPV1-KOn. Student t proba ez parekatua. * $p < 0.05$. d) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria LFSren ondoren, latrunculina-Aren [0.5 mM] aurrean, WT + AMG9810ean. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. moduan adierazten dira.

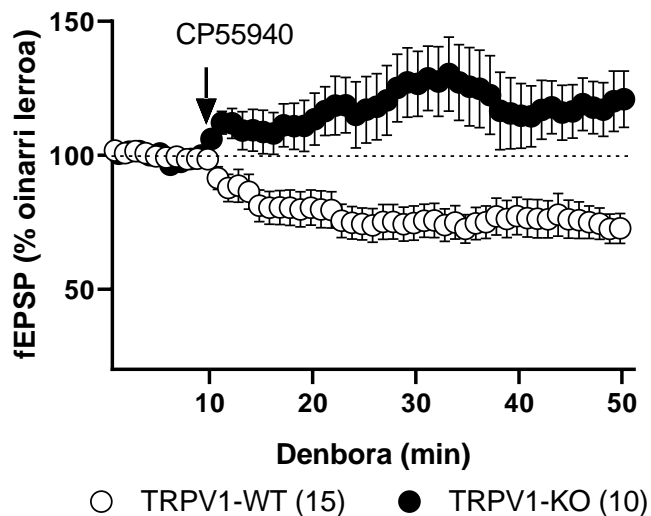
Pultsu-parekatuen analisiak (PPR) WT eta TRPV1-KO arteko alde txikia erakutsi zuen MPPko sinapsietan. PPR kalkulatzeko, 30 pultsu-pare dituen hasierako fEPSPen (P2/P1) malden batez bestekoa eginez kalkulatu zen (50 ms-ko interpultso-tartearekin), non P2 fEPSP2ko maldei dagokien (2. erantzuna) eta P1 fEPSP1eko maldei (1. erantzuna), eta horiek LFS aplikatu aurretik eta ondoren konparatu egin ziren. WTn, PPRan gorakada txiki bat egon zen LFSren ondoren. LSFren aurreko fasean, proportzioa 1.002 ± 0.0493 izan zen; ondorengo fasean berriz, proportzioa 1.070 ± 0.0463 ($p = 0.3187$; ns) izan zen. Aldiz, TRPV1-KOn, PPRa LFSren ondoren murriztu zen (LFSren aurreko fasean proportzioa 1.146 ± 0.0219 izan zen, eta ondoren proportzioa 1.088 ± 0.0337 izan zen ($p = 0.1570$; ns).



32. irudia: Pultsu-parekatuen erlazioa WT eta TRPV1-KO saguetan. PPRa lehen 30 estimuluen maldarekin kalkulatu zen, hau da, estimulazio-protokoloa baino 10 minutu lehenago eta 20 minutu geroago. WTein alderatuta, ez da aldaketa esanguratsurik ikusten TRPV1-KOn LFSren ondoren. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. Datu guztiak batzbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

5.3.3- Transmisio sinaptikoa MPPan

CB₁R-ren agonista baten aurrean fEPSPek emandako erantzuna ebaluatu zen, hartzailearen aktibazio exogenoak MPPko sinapsietan transmisio sinaptiko kitzikatzaila deprimitu egiten duela egiaztatzeko, gure laborategian lehenago frogatu zen bezala (Peñasco et al., 2019). WTein espero bezala, fEPSPak nabarmen deprimitu ziren CB₁R-ren CP 55.940 agonista aplikatu ondoren ([10 μ M]; % 75.31 ± 6.496 ; $p = 0.0003$; ***) (33.irudia a-b). Aldiz, CP 55.940ak fEPSPen sustapena eragin zuen TRPV1-KOn ([10 μ m]; % 118 ± 9.706 ; $p = 0.4813$; ns) (33. irudia a-c).

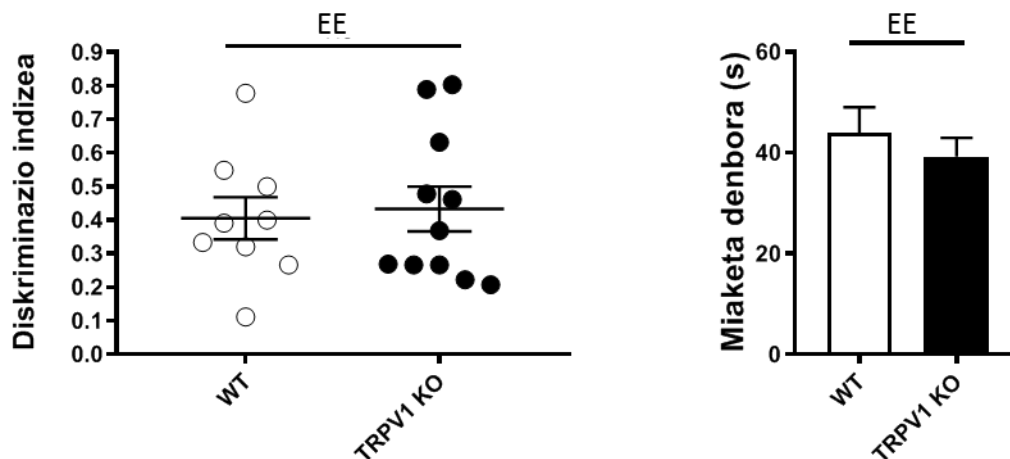


33. irudia: CB₁Rren bidezko transmisio sinaptiko kitzikatzaila MPPko sinapsietan WT eta TRPV1-KO saguetan. Esperimentuak oinarriko lerroa normalizatu ziren. Denboran zeharreko fEPSPen eremuaren batezbestekoa irudikatzen da. Gezi beltzak farmakoa zein noiz aplikatu den adierazten du. a) CP 55.940ak [10 μ M] WTn transmisio sinaptikoa murrizten du (zirkulu zuriak), eta TRPV1-KOn (zirkulu beltzak) areagotzen du. b) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, CP 55.940a WTn aplikatu ondoren. Mann Whitney U proba.*** $p < 0.001$. c) fEPSPen azken 10 minutuen histograma adierazgarria, CP 55.940a aplikatu ondoren TRPV1-KOn. Mann Whitney U proba. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. moduan adierazten dira.

5.4- Hipokanpoarekin erlazionatutako portaerak TRPV1-KO saguetan

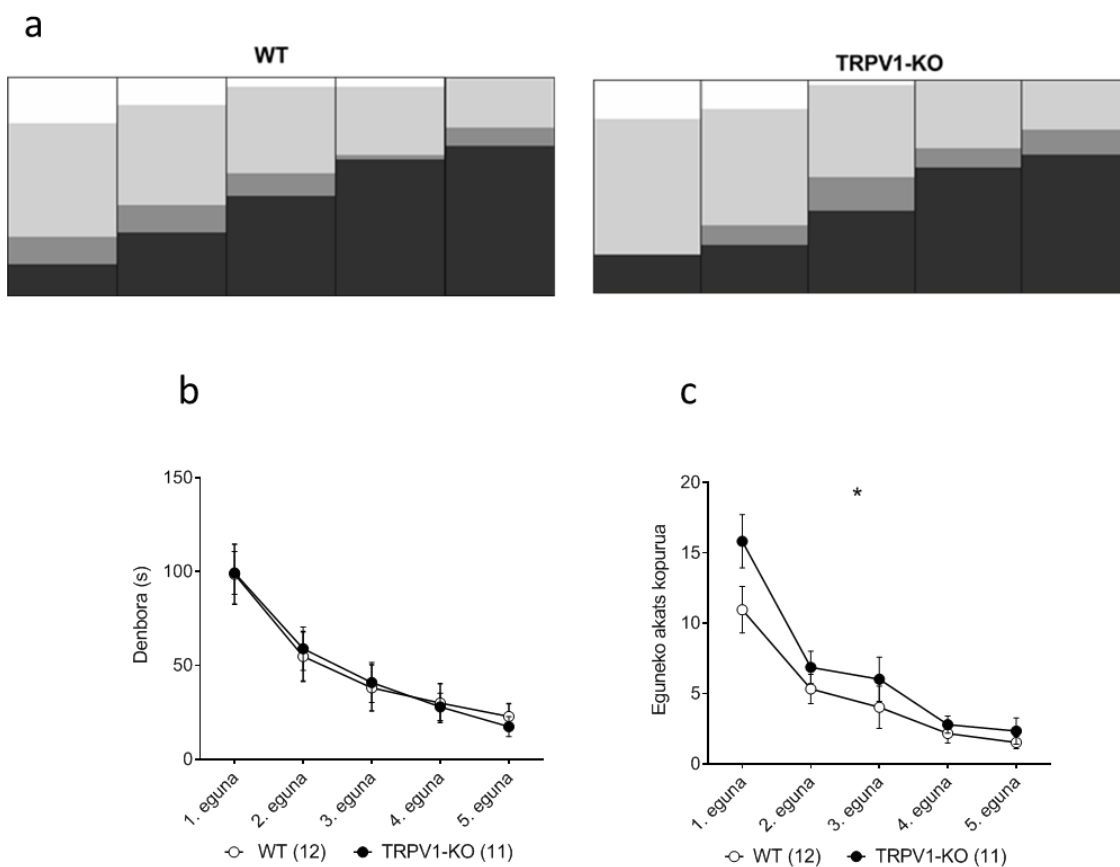
5.4.1- Oroimenaren azterketa

CB₁R-ren adierazpenean egindako aldaketek ere eragina izan dezakete hipokanpoaren funtzioetan, hala nola oroimenean. Horregatik, epe luzeko ezagutza-oroimena eta saguen oroimen-espaziala ebaluatu ziren. WT eta TRPV1-KOen artean ez zen ezberdintasun esanguratsurik aurkitu objektu berriak ezagutzeko proban. Horrela, WTetan diskriminazio indizea 0.4055 ± 0.063 zen bitartean, TRPV1-KOetan 0.4332 ± 0.0666 izan zen ($p = 0.7695$) (34. irudia a), eta objektuak esploratzeko erabilitako denbora ere antzekoa izan zuten, WTek 44 ± 6.105 segundo eta TRPV1-KOek 39.29 ± 7.946 segundo behar izan zituztelarik ($p = 0.4482$), hurrenez hurren (44. irudia b).



34. irudia: WT eta TRPV1-KO saguetan objektu berriak ezagutzeko oroimanaren portaera-probaren azterketa. a) Diskriminazio-indizea berdina da TRPV1-KOetan. Student t proba ez parekatua. $p > 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

Barnesen laberintoko proban TRPV1-KO eta WT saguek erakutsitako oroimen espazialaren estrategian ez zen aldaketa esanguratsurik izan ezta (35. irudia a). Horrela, WT saguek probaren azken egunean erakutsitako estrategiak hauek izan ziren: % 0 NS + % 20.83 RA + % 4.167 SE eta % 75 SP; TRPV1-KO: % 0 NS + % 25 RA + % 9.091 SE + % 65.91 SP. Gainera, TRPV1-KO saguek antzeko denbora eman zuten ihes-kaxa aurkitzeko (35. irudia b). WT saguek batez beste 48.49 ± 13.53 segundo behar izan zituzten ihes-kaxa aurkitzeko; TRPV1-KO saguek, berriz, 48.93 ± 14.39 segundo behar izan zituzten. Hala ere, alde nabarmena aurkitu zen TRPV1-KOek egindako akats kopuruan (6.768 ± 2.427 akats eguneko) WTekin alderatuta (4.8 ± 1.681 akats eguneko) ($p = 0.0133$) (35. irudia c).

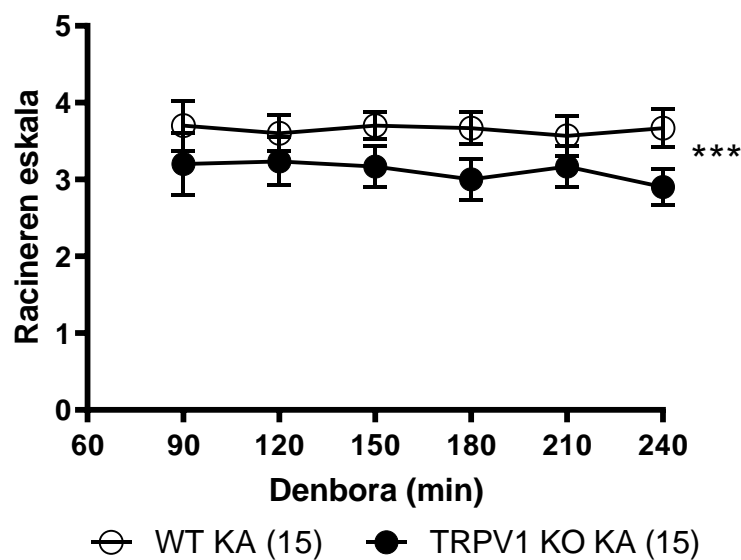


35. irudia: Estrategia espazialen eta oroimen-espazialaren portaeraren ebaluazioa WT eta TRPV1-KO saguetan. a) Espazio-estrategiak ez dira kaltetuak gertatu TRPV1-KO saguetan WTekin alderatuta; b) TRPV1-KO taldeak WTekiko denbora bera eman zuten proba egunero osatzeko. Bi bideko ANOVA. $p > 0.05$. c) TRPV1-KOek WTek baino askoz gehiago egiten dituzte ihes-kaxa aurkitzeko. Bi bideko ANOVA.* $p < 0.05$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. gisa adierazten dira.

5.5- TRPV1-KOen ebaluazioa baldintza patologikoetan: kainato bidezko konbultsio eszitotoxikoen eredia

Epilepsia bezalako baldintza patologikoetan TRPV1 eta CB₁Rek duten garrantzia kontuan hartuta, TRPV1ren gabeziak eraso epileptiko baten izan ditzakeen ondorioak ikertu nahi izan genituen. Horretarako, hipokanpo barnean azido kainikoa zuzenean injektatu zitzaizen saguei (50 nL 20 mM), konbultsioak eragiteko eta hauen aurrean saguek zuten erantzuna ebaluatzeko. Konbultsioak ebaluatzeko Racine eskala eraldatu bat erabili zen. Alde nabarmena dago TRPV1-KO eta WT saguen artean; izan ere, TRPV1-KO saguek konbultsio arinagoak izan zituzten (batez besteko

puntuazioa: 3.11 ± 0.0535 puntu) WTeKin alderatuta (batez besteko puntuazioa: 3.65 ± 0.0223 puntu) ($p = 0.0022$ puntu;***) (36. irudia).



36. irudia: Kainatoak eragindako konbultsioen ebaluazioa, eraldatutako Racine eskala baten arabera WT eta TRPV1-KO saguetan. 30 minuturo lortutako puntuazio maximoen grafikoa da, KA hipokanpoan barneko injekzioaren ondoren. TRPV1-KOek WTeK baino konbultsio arinagoak jasaten dituzte. Bi bideko ANOVA.*** $p < 0.001$. Datu guztiak batezbestekoa \pm S.E.M. moduan adierazten dira.

6- Eztabaida

Nire tesi-lanaren helburua TRPV1 hartzaila genetikoki ezabatzeak, ECSn duen eragina zehaztea izan da, bereziki haren osagai batzuen adierazpenean, CB₁R-ren kokapenari eta horrek hipokanpoaren funtzioetan duen eginkizunari arreta berezia jarritz, hala nola plastikotasun sinaptikoari eta oroimenari. Nire tesiaren aurkikuntza nagusia, TRPV1ren genea ezabatzeak ECSn eta harekin elkareragiten duten proteina batzuetan ondorioak dituela izan da. Hainbat mailatan hauteman ziren aldaketak: proteinen adierazpena, CB₁R-ren akoplamenduaren eraginkortasuna eta plastikotasun sinaptikoaren eCB-LTD batetatik eCB-LTP sendo baterako aldaketa MPPko sinapsietan. Gainera, alterazio horiek ez dirudi oroimena kaltetzen dutenik, eta KAK eragindako konbultsioen aurka babesten dute.

ECSko konposatuen ezabatze genetikoki konpentsazio-aldaketak eragin dituela jakinarazi da aurretik ere. Adibidez, TRPV1 ez duten saguek kaltzitonina-genearekin lotutako peptidoaren (CGRP) maila altuagoak adierazten dituzte bizkar nerbioen sabelaldeko adarren gongoil aferente primarioetan (Chen et al., 2008). TRPV1 eta peptido hori aferente primario berberetan kokatuta daude (Guo et al., 1999) eta peptido hori oso garrantzitsua da artritaren patogenesisian (Schaible et al., 2002). Gainera, TRPV1ren adierazpena murriztu egin zen bihurtune horzdunearan eta handitu zerebeloko pikor-zelula geruzan CB₁R-KO saguetan (Cristino et al., 2006). TRPV1ren mRNA adierazpena handitu egin zen FAAH-KO saguen astrozitoetan ere, FAAH farmakologikoki inhibitzeak berriz ezin zuen hori berdindu, eta horrek konpentsazio-efektuk daudela iradokitzen du (Benito et al., 2012)

6.1- TRPV1-KOen hipokanpoan ECS eraldatuta dago.

Gure eskuetan, immunohistokimikak CB₁R, FAAH, MAGL eta NAPE-PLD proteinen adierazpen handiagoa erakutsi zuen TRPV1-KO saguen hipokanpoan. Eraitza horiek konpentsazio-efektuak iradokiko litzukete TRPV1 hartzaila genetikoki ezabatu ondoren; horrela, sagu lerro hori oso tresna baliagarria izango litzateke ECS aztertzeko. Aldi berean, horrek CB₁R-ren aldakortasunean sakontzea ahalbidetu zigun, bai eta TRPV1 ez egotearen ondoriozko gabezien garrantzian ere.

Hipokanpoko homogeneizatu osoen western blotek erakutsi zuten CB₁Rn igoera ez zela estatistikoki esanguratsua, eta FAAH eta MAGL entzimen adierazpenenak bakarrik igo zirela nabarmen. Teknika hori, maila baxuko proteinak detektatzeko teknika ahaltsua bada ere (Garro et

al., 2001; Kurien eta Scofield, 2006; López de Jesús et al., 2006), proteina-adierazpenean gertatzen diren aldaketa sotilak hobeto hautematen dira homogeneousatuak P2 estraktuetan zatikatuz; eta frakzio zitosolikotik bereizitako mintz zelular eta azpizelularrak bananduz, sinaptomak lortzeko (Garro et al., 2001).

Izan ere, P2 estraktuen CB₁R-ren adierazpenak ez zuen inolako aldaketarik erakutsi TRPV1-KOn, nahiz eta sinaptosometan nabarmen murriztu zen. Hala ere, sinaptosomen muga da ez dutela bereizketarik egiten mintz terminal presinaptiko, postsinaptiko, inhibitzaile edo kitzikatzaileen artean. Hala ere, TRPV1-KOn nabarmen murriztu da CB₁R-ren immunopartikulen proportzioa, MCFLko terminal gabaertikoetan (% 34.5 murriztu da) eta DGMLko kanpoko 2/3etan (% 15.5 murriztu da). Horrekin batera, CB₁R-ren markaketak gora egin du DGMLko terminal glutamatergikoetan, MCFLn (% 83.80ko igoera) eta kanpoko 2/3etan (% 73.50eko igoera). Gainera, 100 µm²-tan zenbatutako CB₁R-ren partikulen kopuru osoa kontuan hartuta, GABA terminaletan aurkitutako partikulak ~ % 56 murriztu ziren MCFLn, eta ~ % 27 DGMLren kanpoko 2/3ean TRPV1-KOn. Oro har, badirudi terminal sinaptiko gabaergikoetan CB₁R-ren adierazpena murrizten dela TRPV1-KOn, eta horrek sinaptosometan ematen den CB₁R-ren adierazpenaren murrizketa azaldu ahalko luke.

Gainera, TRPV1-KO sinaptosometan MAGLn beherakada esanguratsua aurkitu zen FAAHn aldaketarik izan gabe, homogeneousatu osoetan ikusten dugunaren kontra. Adierazpenean dauden diferentzia hauek entzimen kokapen ezberdinaren ondorio izan daitezke. Adibidez, NAPE-PLDren adierazpena hipokanpoko pikor-zelulen axoietan handia da (Egertova et al., 2008); FAAH, nagusiki, zelula barneko organuluen mintzen azalean dago (adibidez, mitokondria edo erretikulu endoplasmiko leuna), baina baita soma eta dendriten mintz plasmaticoetan (Gulyas et al., 2004), eta MAGL axoi presinaptikoen terminaletan dago (Gulyas et al., 2004; Uchigasima et al., 2011). Gure emaitzen arabera, MAGLk kokapen desberdinak ditu TRPV1-KOn; izan ere, hipokanpoko homogeneousatu osoetan adierazpena handitu zen bitartean, sinaptosometan murriztu egin zen. Horrek, halaber, DGMLan MAGLk zelula glialetan duen kokapena adierazi ahalko luke, izan ere, goroldio-zelulen eta pikor-zelulen arteko sinapsien inguruko astrozitoek duten maila altua (Uchigasima et al., 2011) areagotuta egon liteke TRPV1 gabezia dagoenean.

Azkenik, DAGL α entzimaren adierazpena TRPV1-KOn aldatu ez zenez, 2-AGren metabolismoan deserregulazio bat egotea espero zen. Gainera, homogeneousatu osoek FAAH mailak handituta izateak eta sinaptosometan NAPE-PLDren adierazpena esanguratsuki ez aldatzeak, TRPV1-KOn AEAREN tonua murriztua egon daitezela iradokitzen du. Hala ere, NAPE-PLDren immunorreaktibitatea handitu egin zela ikusi zen bihurtune horzduneko hilusean eta CA3aren stratum lucidum-ean. Horrek AEA zenbait konpartimentu azpizelularretan handitu zitekeela iradokitzen du, adibidez, pikor-zelulen axoietan. Oro har, TRPV1 hartzailea ez izateak, jarduera sinaptikoari eragin diezaioketen aldaketak eragiten dituela adierazten du eCB nagusien sintesi- eta degradazio-dinamikan. Frakzio zitosoliko eta mikrosomaletako adierazpen-esperimentuak egiten ari dira, 2-AG eta AEA eCBen entzima biosintetiko eta degradatzaile nagusietan izandako aldaketak xehetasun gehiagorekin argitzeko.

CB₁R-ren funtzionaltasunarekin zerikusia duten proteinen adierazpena ere aztertu dugu, hala nola G α (o, i1, i2 eta i3) azpiunitateak eta CRIP1a proteina TRPV1-KO eta WT kumaldi bereko kideen sinaptosometan. Horrela, TRPV1-KOn handipen bat aurkitu zen G α i1, G α i2, G α i3 eta CRIP1a proteinen adierazpenean. Aldaketa horiek ikusi ondoren, CB₁R-ren funtzionaltasuna [³⁵S] GTP binding entseguaren bidez ebaluatu zen. TRPV1-KOn binding entseguetan behatutako G proteinen lotura basala txikiagoa bazen ere, CP 55.940 agonistaren estimulazioaren ondoren, G proteinen loturaren eraginkortasun maximoa nabarmen handiagoa zen WTn baino. G proteinen aktibazio basalaren murrizketa, hein batean bederen, sinaptosometan ikusitako CB₁R-en adierazpenaren gutxitzearen ondorio izan daiteke. Egia esan, TRPV1-KOn, ez zen CP 55.940 CB₁R-ren agonistak MPP-GC sinapsietan eragindako fEPSPen murrizketa (Peñaco et al., 2019) hauteman. Gainera, berriki ikusi dugu (Peñasco et al., 2020) astean lau egunez, lau astez guztira, iluntasunean etanola edateko prozedura baten eraginpean egondako sagu nerabeek, bi astez abstinentzian eman ondoren, hipokanpoan eginiko [³⁵S] GTP γ S binding entseguetan, CP 55.940 agonistaren bidezko estimulazioan eta [³⁵S] GTP γ Sren akoplamendu basalean murrizketa esanguratsua izan zutela. Hau, beste batzuen lanekin (Basavarajappa et al., 1998; Vinod et al., 2006), eta G proteinen zikloan etanolaren ostean ikusitako aldaketekin (Basavarajappa eta Hungund, 1999) bat zetorrela konfirmatu zen. Gainera, gure aurreko azterlanean, G α i2 azpiunitatean murrizketa espezifiko bat hauteman genuen, eta hori izan daiteke, hain zuzen, [³⁵S] GTP γ S akoplamendu basalean hautemandako murrizketaren eta etanolarekin tratatutako saguetako CB₁R-ren seinaleztapenaren beharpenaren erantzule (Peñasco et al., 2020). Frogatu da, G α i2 azpiunitatearen faltak anomaliak

eragiten dituela ikaskuntzaren eraginkortasunean, soziabilitatean eta aitorten sozialean (Hamada et al., 2017). Hala ere, sinapsi glutamatergikoetan kokatutako CB₁Rk G proteinaren seinaleztapenarekin estuki lotuta badaude ere (Steindel et al., 2013), hipokanpoaren aktibazio basala ez dagokie soilik CB₁R-rekin lotutako G proteinei, Gi/o proteinak beste hartzaile batzuekin ere akoplatuta baitaude, CB₁Rz gain (Conn eta Pin, 1997).

Goian aipatu bezala, CRIP1a proteina handitu egin da TRPV1-KOn. Proteina hori CB₁R-ren zelula barneko barneratzearekin, barne-trafikoarekin eta translokazioarekin lotuta dago; izan ere, de novo sintetizatutako CB₁R-ren trafikoa ezerezten du konpartimentu perinuklearretatik edo erretikulu endoplasmatikotik, mintz plasmatikora, CB₁R-ren translokazioa eta berrikuntza kaltetzen ditu, eta CB₁R-ren adierazpena murriztu egiten da CRIP1a gainadierazten duten zelulen kanpo-mintzean (Booth et al., 2019). Hala ere, CRIP1a proteinaren gainadierazpenak CP 55.940 estimulazioaren bidez eragindako barneratzea nabarmen moteltzen duela frogatu da, izan ere, CB₁R-rekin elkartzeko β -arrestinarekin lehiatzen da (Blume et al., 2016). Oro har, aldaketa horiek TRPV1-KO sinaptosometan emandako CB₁R-ren adierazpenaren aldaketak azal ditzakete, CB₁Rk denbora gehiagoz egon daitezkeelako zelulen barruan, TRPV1-KOn CRIP1a mailak handitu direlako. Hala ere, argi-mikroskopia bidezko immunohistokimikak eta homogeneizatu osoek kontrakoa erakutsi zuten, litekeena da, terminal sinaptikoetako CB₁R-ren kokapenarekin batera, TRPV1-KOn hartzaileak konpartimentuetan duen adierazpen nagusia islatzen aritzea. Gainera, gure datuek aurretik behatutakoa berretsiko lukete, izan ere, N18TG2 zeluletan CRIP1a proteinaren gainadierazpenak, G α i1 eta G α i2 azpiunitateekiko [³⁵S] GTP γ S binding-aren estimulazio sendoa eragiten duela deskribatu da (Blume et al., 2015). Beraz, kontuan izanik TRPV1-KOk hipokanpoan G α i proteinen adierazpen handiagoa dutela, CP 55.940 agonista bidezko estimulazioaren ondoren [³⁵S] GTP γ S binding entseguan ikusitako indartzearen arrazoa CB₁R G α i azpi-unitateetara gehiago akoplatzearen eta/edo CRIP1ren maila altuak direla medio, CB₁R-ren agonista bidezko barneratzearen alterazio bat egotearen ondorio izan daiteke (Blume et al., 2016; Booth et al., 2019).

Era berean, CB₁R-ren banaketa aztertu dugu mikroskopia elektronikorako erretxinan murgilduaurreko urre bidezko immunomarkaketaren teknika erabiliz, TRPV1-KOn konpartimentu azpizelular espezifikoetan CB₁Rren kokapenean egon daitezkeen aldaketak atzemateko. Ikerketa horrek DGML barneko lehen 1/3a (MCFL) eta kanpoko 2/3ak artean ezberdinduz (PPren amaiera-

eremua) egin zen. MCFLk, pikor-zelula ugari inerbatzeko distantzia luzeak egiten dituzten goroldio-zelula glutamatergikoen asozio- eta komisura-zuntzak jasotzen dituen bitartean, ingurune eta testuinguru-informazioa transmititzeko (Amaral eta Witter, 1989; Scharfman eta Myers, 2013), errinal atzeko kortexetik datozen axoiek 1) informazio espaziala transmititzen diote kortex entorinalaren erdialdeari, zeinak, aldi berean, hipokanpoaren bizkaraldeko eremura proiektatzen duen MPPren bidez (Fyhn et al., 2004; Hargreaves et al., 2005), eta 2) espaziala ez den informazioa, kortex entorinalaren alboko eremuari proiektatzen dio LPPren bidez (Burwell, 2000).

Oro har, PP glutamatergikoak (Grandes eta Streit, 1991), hipokanpoaren sarrera nagusiak, kortex entorinalaren II. geruzako informazioa DGMLri transmititzen dio (Scharfman, 2016). Frogatuta dago TRPV1 pikor-zelulen arantza dendritikoetan banatzen dela batez ere. Dendrita horiek PPre terminal sinaptikoak jasotzen dituzten MLko kanpoko 2/3etan kokatzen dira, eta askoz maila txikiagoan, goroldio-zelulen axoiek jasotzen dituzten arantza dendritikoetan MLko barneko 1/3ean. Horrenbestez, pikor-zelulen arantza dendritiko eta dendrita TRPV1 immunopositibo guztietatik, % 75 eta % 56 kanpoko 2/3ean zueden, eta gainontzekoak barnealdeko 1/3an aurkitu ziren (Puente et al., 2015). Gainera, TRPV1ren adierazpena handiagoa izan zen sinapsi inhibitzaileetan barneko 1/3ean kanpoko 2/3etan baino (Canduela et al., 2015). Hemen, MLko sinapsi inhibitzaileen % 30 inguruk TRPV1 adierazten dute, gehienak MCFLko mintz dendritiko postsinaptikoetan (Canduela et al., 2015). TRPV1 pikor-zelulen gorputzetan ere badadago (Canduela et al., 2015). Hipokanpoko CA1 eremuan, CB₁R-rako sinapsi perisomatiko positibo gehienek, guztiak ez badira, postsinaptikoki TRPV1 adierazten dute (Lee et al., 2015). Honez gain, TRPV1 Schaffer-en albo-terminal glutamatergikoetan ere aurkitu da, CA1eko piramide-zelulen arantza dendritikoekin sinapsia eginez (Bialecki et al., 2020).

DGMLko CB₁R-ren banaketaren ultraegitura mailako datuek emaitza biokimikoak berretsi zituzten. Hala, antzeko aldaketak aurkitu ziren MCFLn eta MLko kanpoko 2/3etan, baina desberdintasun txikiekin behatutako aldaketen esangura estatistikoari dagokionez; horrek adieraz lezake TRPV1 hartzailearen adierazpen-patroiek konpentsazio-efektu desberdinak eragiten dituztela. Adibidez, DGMLren bi azpigeruzetan CB₁R-rako terminal kitzikatzaile positibo ugaritze nabarmena aurkitu zen, baina MCFLren aldaketa kanpoko 2/3etan baino nabarmenagoa izan zen. Hala ere, terminal glutamatergikoetako CB₁Rren dentsitatea TRPV1-KOen DGMLko bi azpigeruzetan ez dela aldatu kontuan hartuta, CB₁R-rako positibo diren bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan ikusitako igoeraren

azalpena, CB₁R gabeko terminal kitzikatzaileen kopuruaren murrizpena izango litzateke. Hala, gure datuek adierazten dute TRPV1 ezabatzeak terminal kitzikatzaileen guztizko kopurua eta CB₁R duten terminal kitzikatzaileen proportzioa aldatu egiten dituela. Frogatuta dago, halaber, TRPV1-KO saguek inerbazio glutamateriko txikiagoa dutela hipokanpoko beste eskualde batzuetan (Hurtado-Zavala et al., 2017)

Oro har, badirudi, TRPV1 ez egotearen ondorioz, CB₁R-ek erregulazio-eragin nabarmenagoa dutela transmisio kitzikatzailean, eta horrek ondorio funtzional garrantzitsuak izan ditzakeela DGMLan. Testuinguru horretan, duela gutxi frogatu dugu CB₁R-ren immunomarkaketak bukaera kitzikatzaileetan % 34 jaitsi zela, eta CB₁R duten botoi kitzikatzaileen proportzioak % 35 egin zuela behera nerabezaroan etanola hartu zuten sagu helduen DGMLren erdiko 1/3ean, beste konpartimentu azpizelularretan eraginik izan gabe (alkohol kontsumo-eredua). Terminal kitzikatzaileetan CB₁R-ren gabezia horiek MPP-GC sinapsietan eCB-eLTDaren galerarekin eta ezagutza-oroimenaren narriadurarekin lotu ziren (Peñasco et al., 2020).

Terminal inhibitzaileei dagokienez, TRPV1-KO eta WT-en arteko aldeak oso txikiak izan ziren, MLko kanpoko 2/3etan CB₁R-ren dentsitatearen murrizketa txiki bat baino ez zen aurkitu. Murrizketa hori CRIP1a adierazpenean ikusitako konpentsazio-efektuengatik gerta liteke, terminal gabaertikoetan kopuru handian kokatuta dagoen CB₁R-ren birziklatzeari eragin bait diezaiolke (Kawamura et al., 2006; Ludányi et al., 2008; Marsicano eta Kuner, 2008; Katona eta Freund, 2012; De-May eta Ali, 2013; Steindel et al. 2013; Hu eta Mackie, 2015; Lu eta Mackie, 2016; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017; Bonilla-Del Río et al., 2019).

Kontuan izanda CB₁R-ren partikula gehienak hipokanpoko bukaera gabaergikoetan daudela (Katona et al., 1999; Marsicano eta Lutz, 1999; Hájos et al., 2000; Nyíri et al., 2005; Kano et al., 2009; Katona eta Freund, 2012; Lutz et al., 2015; Takács et al., 2015; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017; Bonilla-Del Río et al., 2019), gerta liteke birziklapenean egon litezkeen narriadurek eragindako aldaketak nabarmenagoak izatea bukaera inhibitzaileetan kitzikatzaileetan baino, eta, beraz, errazago detektatzea. Horrek, lagunduko luke, halaber, sinaptosometan behatutako CB₁R-ren murrizketa azaltzen, izan ere, bukaera sinaptiko kitzikatzaileetan CB₁R-ren guztizko adierazpena aldaketarik gabe mantentzen bada, terminal sinaptiko inhibitzaileetan CB₁R-ren dentsitatea murrитеa izan liteke CB₁R-ren erorketaren erantzule.

Mitokondriei dagokienez, gure laborategiak organulu horietan CB₁R-ren kokapena eta hipokanpoko neuronetan zelulen arnasketan duen parte-hartzea deskribatu zituen (Benard et al. 2012; Hebert-Chatelain et al. 2014a, b). Ez genuen aldaketarik aurkitu CB₁R-rako positiboak diren mitokondrien proportzioan TRPV1-KOn, nahiz eta TRPV1 mintz mitokondrialetan ere adierazten dela aurkitu den (Luo et al., 2012; Miyake et al., 2015). Hala ere, mitokondria kopuruak gora egin zuen bukaera sinaptikoetan eta behera egin zuen dendritetan TRPV1-KOen MCFLn; eta MLko kanpoko 2/3etan mitokondrien kopurua bukaera zein dendritetan nabarmen txikitu zen. Horrek iradokitzen du TRPV1k inplikazio zuzena izan dezakeela mitokondria dinamikan MLan. Bi azpigeruzen artean behatutako aldeak konposizio neuronalean dauden desberdintasunengatik izan daitezke, eta TRPV1 ez izatearen ondorio. Hala, frogatu da TRPV1k bideratutako mitokondrian zeharreko kaltzio sarrerak hein handi batean zitotoxikotasuna eta heriotza zelularra eragiten dituela HEK 293 zeluletan eta DRG neuronetan (Stueber et al., 2017). Aitzitik, TRPV1 knockdown saguek funtzio mitokondrial hobetua zuten, eta zelula kardiomiocitiko primarioetan apoptosia inhibituta zuten, TRPV1KOek funtzio kardiakoak hobetuak zituzten bitartean (Sun et al., 2014). Tesi-lan honetan TRPV1-KOen bihurtune horzdunetan behatutako mitokondrien murrizketak dituen ondorio funtzionalek ikerketa sakonagoa behar dute.

Aipatu bezala, CB₁Rk astrozitoetan ere adierazten dira (Rodriguez et al., 2001; Navarrete eta Araque, 2008, 2010; Stella, 2010; Han et al., 2012; Bosier et al., 2013; Metna-Laurent eta Marsicano, 2015; Viader et al., 2015; Oliveira Da Cruz et al., 2016; Kovács et al., 2017; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017). Frogatuenez, TRPV1ren aktibazioarekin lotutako kaltzio kontzentrazioa handitzeak zitoeskeletoaren berrantolaketa, mikrotubuluaren desantolaketa eta f-aktina filamentuen berrantolaketa bultzatzen ditu, eta horrek astrozitoen migrazioa eragiten du (Goswami et al., 2007; Han et al., 2007; Martin et al., 2012; Morales-Lázaro et al., 2013). Hartzaille berberaren antagonismoak astrozitoen migrazioa deuseztatzen du kaltzio fluxua gutxituz eta zitoeskeletoaren berrantolaketa ekidinez (Ho et al., 2014).

Nolanai ere, ez dugu desberdintasunik aurkitu TRPV1-KOn neurtutako parametro astrozitikoetan. Duela gutxi, etanolaren ondorioak aztertu ditugu helduaren CA1 *stratum radiatum*-ean nerabegaroko alkohol kontsumo-eredu batean (4 eta 8 aste bitarteko sagu arrak, 4 asteko epean etanol % 20ren eraginpean daudenak) (Bonilla-Del Río et al., 2019). Interesgarria da, astrozitoek morfologia hanpatua izan zutela baldintza horietan, etanola hartu eta lau astera helduen CA1ean

egindako neurketek (perimetroa, azalera) erakusten dutenez. Astrozitoen inflamazioa, dirudienez, etanol kontsumoarekin lotutako fenomeno bat da, disfuntzio astroglial bat eragiten duena (Adermark eta Bowers, 2016) astrozitoen filamentuetan dagoen GFAP proteinen alterazioa eraginez (Renau-Piqueras et al., 1989). Oro har, astrozitoetan ematen den asaldura ez da gertatzen TRPV1 egon ezean. Horren arrazoia, neurri batean, TRPV1 genetikoki ezabatzeak, bere funtzioa ordezkatu lezaketen eta, beraz, garapen normala sustatu lezaketen beste hartzaile edo kanal batzuetan konpentsazio-mekanismoak eragin zitzakeela izan liteke. Oraindik jakitear dago etanolak TRPV1-KOetan dituen efektuak. Gainera, ez dugu aldaketarik ikusi CB₁R-rako prozesu astrozitiko positiboen proportzioan TRPV1-KOen DGMLan. Hala ere, ultraegitura mailako analisiak agerian utzi zuen CB₁R-ren dentsitatea nabarmen murriztu zela astrozitoetan TRPV1-KOen MLko kanpoko 2/3etan, horrek gure azken lanean lortutako emaitzak mimetizatzen ditu. Emaitza horiek erakusten dute CB₁R-ren dentsitatea murriztu egiten dela astrozitoetan (CB₁R-rako positibo diren prozesu astrozitiko murrizketaz gain) lehen aipatutako alkohol kostumo-ereduan (Bonilla-Del Rio et al., 2019). Astrozitoek inflamazio erantzunetan parte hartzen dute, molekula proinflamatorioak askatuz (Farina et al., 2007). Horiek arindu egiten dira eCBek CB₁R astroglialetan eragiten duten inflamazioaren kontrako erantzunen bidez (Metna-Laurent eta Marsicano, 2015). Beraz, TRPV1-KOen astrozitoetan CB₁R-aren dentsitatea murriztearen ondorioz, zentzuzkoa da astrozitoek TRPV1-KOen inflamazioaren aurkako erantzuna kaltetuta izatea pentsatzea. TRPV1-KOen astrozitoetan CB₁R-ren dentsitatea murrizteak ondorio funtzionalak izan ditzake transmisio sinaptikoan eta plastikotasunean ere, izan ere, baliteke astrozitoak jarduera neuronalaren ondorioz sortutako eCBak detektatzeko eraginkorrak ez izatea, kannabinoideen eraginez sinapsietan askatutako gliotransmisoreen erabilgarritasuna arriskuan jarritz (Han et al., 2012; Araque et al., 2014).

6.2- Plastikotasun sinaptikoaren aldaketak TRPV1-KOetan.

Frogatuta dago TRPV1ek plastikotasun sinaptikoan (Marsch et al., 2007; Gibson et al., 2008; Kauer eta Gibson, 2009; Maione et al., 2009; Chavez et al., 2010, 2014; Grueter et al., 2010; Puente et al., 2011), ikaskuntzan eta oroimenean (Marsch et al., 2007; Li et al., 2008), beldurrean eta antsietatean (Marsch et al., 2007; Micale et al., 2009), eta gizakian kortexaren kitzikagarritasunaren modulatzeko ere beharrezkoa dela (Mori et al., 2012). TRPV1k eta AEAk,

bere agonista endogenoak, LTD sinaptikoan parte hartzen dute garunaren hainbat eremutan (Di Marzo et al., 2001; 2002; 2008; Ross, 2003; Gibson et al., 2008; Kauer eta Gibson, 2009; Maione et al., 2009; Grueter et al., 2010; Chavez et al., 2011). Adibidez, TRPV1k LTD presinaptiko bat eragiten du hipokanpoko CA1 eremuko interneuronetan, kaltzioak aktibatutako seinaleztapen-jauzien bidez (Gibson et al., 2008). Gainera, TRPV1ren mende ekoiztako kaltzineurinak tentsio bidez aktibatutako kaltzio-kanalen jarduera murrizten du bizkar-erroen gongoil-neuronetan (Wu et al., 2005; 2006), eta kaltzio presinaptikoa beharrezkoa da TRPV1k bukaera ildaskaren nukleoko (BNST) sinapsietan sustatzen duen LTDra (Singla et al. 2007). Frogatu da TRPV1k NMDA hartzaileen mendeko LTPan parte hartzen duela hipokanpoko CA1 eremuan, eta TRPV1 aktibatu ondoren handitu egiten zela (Marsch et al., 2007; Li et al., 2008). Gainera, berriki frogatu dugu TRPV1ren kokapen presinaptikoak hipokanpoko CA1eko Schaffer-en albo-terminaletan, glutamatoa askatzea errazten duela (Bialecki et al., 2020). Errazte hori pannexin-1 kanal postsinaptikoen bidez kontrolatzen da. Kanal horiek NMDA hartzaile metabotropikoa modulatu dute eta AEA mailak erregulatuz glutamato presinaptikoaren askapena deuseztatzen dute (Bialecki et al., 2020). Hala ere, burmuinean TRPV1ren banaketa zabala zalantzan jarri zen, TRPV1 sagu erreportariak, TRPV1ren garun adierazpen mugatua erakutsi zutelako karraskarietatik gizakietara (Cavanaugh et al. 2011). Sagu horietan, TRPV1 adierazpena, Cajal-Retziusen zeluletan baino ez zen aurkitu (Cavanaugh et al. 2011).

Nolanahi ere, hipokanpoko neurona zehatz horiei esleitutako TRPV1 adierazpena zaila da kanalak hipokanpoko CA1 eremuan erakutsi duen eginkizun funtzionalarekin bateratzea (Marsch et al., 2007; Gibson et al., 2008; Li et al., 2008; Bialecki et al., 2020) eta AEAk aktibatzen duen TRPV1 delakoarekin, CB₁R-rekiko independentea den LTD bat abiarazten duena MPP-GC sinapsietan (Chávez et al., 2010). Beraz, pentsatu zen TRPV1 hartzailea PP-DGMLko sinapsi kitzikatzaileetan kokatu behar zela, epe luzeko plastikotasun sinaptiko forma hori eragiteko. Izan ere, TRPV1 batez ere DGMLan sinapsi asimetrokoak jasotzen dituzten arantza dendritiko postsinaptikoetan eta dendrita txikietan aurkitzen dela berri eman genuen, eta sinapsi asimetrokoak jasotzen dituzte DGMLan (Puente et al., 2015). Gainera, PPK jasotzen dituen arantza dendritikoek TRPV1 dentsitate handiagoa adierazten dute, eta, ondoren, barnealdeko 1/3eko arantzak. Hala ere, terminal sinaptikoetako TRPV1 markaketa ahulak nekez eragingo du funtzio presinaptikoa DGMLan. Oro har, TRPV1, nagusiki, modu postsinaptikoan banatuta dago PPko bukaera glutamatergikoen

sinaptietan, eta, neurri txikiagoan, MCFLko hiluseko goroldio-zelulen axoi-terminalen sinapsien alde postsinaptikoan (Puente et al., 2015).

Garuneko beste eskualde batzuetan, BNSTn, hain zuzen, 10 minutuz 10 Hz-ko estimulazioak eragindako eta TRPV1k bideratutako LTDa 1) mGluR5en menpeko AEA produkzioaren bidez ematen da TRPV1 postsinaptikoaren eraginez, batez ere sinapsi asimetrikoak jasotzen dituzten dendrita eta arantza postsinaptikoetan posizio perisinapikoetan kokatutako TRPV1etan eragiten duelarik eta 2) zelula-barneko kaltzio biltegien deplezioagatik nabarmen inhibitzen da (Puente et al., 2011). Gainera, kapsaizina edo AEAk aktibaturiko TRPV1k deprimitu egiten du transmisio inhibitzaile somatiko bihurgune horzdunean (Chavez et al., 2014). Izan ere, TRPV1ren immunopartikulak DGMLan sinapsi simetrikoak jasotzen dituzten dendrita postsinaptiko lodietan kokatzen dira (Canduela et al., 2015). Kasu horretan, aztertutako sinapsi inhibitzaile guztien % 30 inguru TRPV1rako immunopositiboak izan ziren. Orain arte ez da behatu TRPV1rako positibo diren axoi-botoirik terminal sinaptiko inhibitzaileen ultraegitura ezaugarriekin (besikula pleomorfitikoak eta sinapsi simetrikoen eraketa) (Canduela et al., 2015). TRPV1rekin markatutako sinapsien % 30etik, % 80 inguru barneko 1/3ean kokatu ziren, eta gainerakoak MLren kanpoko 2/3etan. Gainera, sinapsi simetrikoak jasotzen dituzten dendritetan, immunopartikulen dentsitatea nabarmen handiagoa zen MCFLn MLren kanpoko 2/3etan baino. TRPV1 pikor-zelulen gorputzean ere aurkitu zen (Canduela et al., 2015).

TRPV1-KOen hipokanpoan CB₁R-ren eta ECSrekin lotutako entzimen adierazpena aldatuta zegoela eta CB₁R-ren akoplamendu-eraginkortasun maximoa areagotu egin zela ikusi ondoren, TRPV1ren ezabapenak DGMLren plastikotasun sinaptikoan dituen ondorioak aztertu ziren. Lehenik eta behin, MCFL aztertu genuen, izan ere, ECSn hautemandako efektuek tokiko aldaketa funtzionalak eragin zitzaizkion, nahiz eta ez den frogatu eCBek bultzaturiko epe luzeko plastikotasun sinaptikorik eremu honetan. Halaber, CB₁R-ren bidezko despolarizazioak epe laburreko kitzikapenaren (DSE) eta inhibizioaren (DSI) ezabatzea baino ez zuen eragin (Chiu eta Castillo, 2008). Beraz, PTXren presentzian, TRPV1-KOen MCFLko sinapsietan LFS protokoloa (10min @ 10 Hz) aplikatu ondoren, WTN ere aurretik ikusitako indartzearen handipen bat aurkitu zen (Chiu eta Castillo, 2008; Peñasco et al., 2019). LTParen handipen hori azaltzeko gure hipotesia TRPV1 bera falta izatea, edo ECSn eta terminal kitzikatzaileetan emandako aldaketengatik, edo biengatik, izatea da. CB₁R-ren AM251 alderantzizko agonistak ez zuen inolako eraginik izan behatutako indartzean, ez WTetan (Chiu eta

Castillo, 2008), ez eta TPV1-KOetan ere, eta baztertu egin zuen CB₁R-ren terminal kitzikatzaile positiboen aldaketak indartze horretan zeregin bat izan zezakeenik. Gainera, NMDARek LTPan parte hartzen dutenez (Bliss et al., 2007), NMDAR-ren D-APV antagonista aplikatu zen, nahiz eta aurretik frogatua zen MCFLn gertaturiko potentziazioa NMDARekiko independentea zela (Hashimoto et al., 2017). Gure esperimentuetan, D-APV ez zuen eragin nabarmenik izan neurtutako potentziazioan TRPV1-KOetan, ez eta WTetan ere, nahiz eta, WTetan fEPSPen balioak oinarrizko lerroa jaitsi ziren. Oro har, gure emaitzek, NMDARek MCFLn behatutako LTPan ez dutela inolako paperik babesten dute, ez eta TRPV1 ez badago ere. Jakina da TRPV1 aktibatzeak deprimitu egiten duela bihurtune horzduneko pikor-zelulen transmisio sinaptiko inhibitzailea (baina ez transmisio inhibitzaile dendritikoa) CB₁R baliatu gabe, kaltzio postsinaptikoa areagotuz, kaltzineurina aktibatuz eta GABA_A hartzaileak barneratuz (Chávez et al., 2014). Horrela bada, onargarria izango litzateke TRPV1ren faltak kitzikagarritasuna areagotzen duela esatea, bihurtune horzduneko pikor-zeluletan eragindako inhibizioaren kontrolaren galeraren ondorioz. TRPV1ren efektu horretaz gain, ikusi dugu MCFLn CB₁R-rako positibo diren terminal inhibitzaileen murrizketa nabarmena izan dela, lehen ere eztabaidatu dugun bezala. Beraz, aldaketa horiek TRPV1-KOen MCFLn behatutako LTPa ere azalduko lukete. Gure laborategian etorkizunean egingo diren ikerketek LTPa honen mekanismoak argitzea izango dute helburu.

6.2.1- CB₁R MPP-GC sinapsietako LTPn parte hartzen du TRPV1-KOn.

Deskribatu berri dugun CB₁R-eLTD horretan oinarrituta, non, 2-AG, mGluR1, mGluR5 eta zelula barneko kaltzioa beharrezkoak diren (Peñasco et al., 2019), nire doktore-tesian proposatu genuen zehaztea TRPV1 genetikoki ezabatu ondoren ECSn antzemandako konpentsazio-aldaketak plastikotasun horretan zer eragin izan lezakeen. Emaitzek erakutsi zuten CB₁Rk bideratutako eLTDtik LTPra aldatu zela plastikotasuna TRPV1-KOn, LFS lehengo paradigma bera aplikatu ondoren (Peñasco et al., 2019). AM251 farmakoak erabat blokeatu zuen LTP hori, eta honek CB₁Rk sustapen horretan parte hartzen zuela berretsi zuen. Hala ere, ez zen aldaketarik aurkitu D-APV aplikatu ondoren, CB₁R-ren bidezko LTPa NMDAR-ekiko menpekotasunik ez zuela iradokiz. Lehenago ikusi dugunez, WT animalien MPP-GC sinapsietan LFSk eragindako CB₁R-eLTDaren tamainan D-APV ez zuela eraginik izan (Peñasco et al., 2019), eta horrek adierazten du NMDARek ez dutela CB₁R-eLTDan parte hartzen, CB₁R-eLTDak beste sinapsi batzuetan NMDARen jarduera behar duen arren (Bender et al., 2006; Sjöström et al., 2003; Lutz eta Castillo, 2020). Gainera,

TRPV1-KOen CB₁R-LTPa 2-AGren mendekoa zen, DAGL entzimaren THL (10 μM) inhibitzailearen aurrean aplikatutako 10 Hz-ko estimuluak erabat indargabetzen baitzuten plastikotasuna. Bestalde, MAGLren JZL184 (50 μM) inhibitzaileak ere blokeatu zuen LTPa, TRPV1-KOen 2-AGren erregulazioa LTPako faktore mugatzailea izan daitekeela iradokiz. 2-AGren kontzentrazio handiek eragindako CB₁R-ren desentzibilizazioak eta erregistroaren aurreko JZL 184ren inkubazio-denbora altuak izan litezke eragindako LTPa blokeatzearen erantzule, eta, aurretik MPP-GC sinapsietan LFSak eragindako CB₁R-eLTDan, JZL 184ak eragindako blokeoarekin gertatu bezala (Peñasco et al., 2019). Gainera, hori aurreko azterlanekin bat dator, 2-AGren epe luzera handitzeak CB₁R-ren desentzibilizazioa eragiten duela erakusten baitute (Chanda et al., 2010; Schlosburg et al., 2010). Cui-k eta lankideek (2018) proposatzen duten bezala, eCBk bi norabideko plastikotasunaren oinarria izan litezke, mailen eta askatzen diren unearen arabera. Zentzu horretan, 2-AGren sintesiaren edo degradazioaren inhibizioak plastikotasun sinaptikoan eragin blokeatzaile bera duela erakutsi zuen, eta iradokitzen du 2-AG CB₁R-ri eragiten ari zaiola, MPPko sinapsietan, bai LTDan zein LTPan WT eta TRPV1-KO saguetan hurrenez hurren.

Aitzitik, TRPV1-KOen CB₁R-LTPan FAAHren URB597 (2 μM) inhibitzaile indartsu eta selektiboak ez zuen eraginik izan, eta horrek iradokitzen du AEak TRPV1-KOen MPP-GC sinapsiek erakusten duten LTPan ez duela parte hartzen. WTn URB597 kontzentrazio berak (2 μM) fEPSPak indartu zituen LFS ondoren. Aurkikuntza hori txundigarria izan zen, aurretik WTetan burututako esperimendu batzuetan, MPP-GC sinapsi berdinetan, lortutako CB₁R-eLTDari URB597ak ez baitzion eragin (Peñasco et al., 2019). Eragin hori oraindik hobeto aztertu behar badugu ere, esan beharra dago gure aurreko esperimenduak ziklo zirkadianoaren fase ilunean egin zirela (Peñasco et al., 2019); izan ere, ziklo horretan saguek alkohola edaten dutela jakina da (Peñasco et al., 2020), eta nire doktorego-tesiaren esperimenduak argi-fasean egin ziren. Gainera, CB₁R-ren adierazpenean eta hipokanpoko eCBen mailetan egunero izaten diren gorabeherak ere azal lezakete (Martínez-Vargas et al., 2003; 2013; Valenti et al., 2004; Murillo-Rodriguez et al., 2006; Glaser eta Kaczocha, 2009; Martínez-Vargas et al., 2013).

Aipatu dugun bezala, gure aurreko lan batean BNSTan LFS protokolo berak (10 Hz 10 minutuz) induzitutako LTDan, AEaren ekoizpenak (mGluR5ren mendekoa eta TRPV1 postsinaptikoen gainean eragiten duena) eragindako TRPV1ren estimulazioa (10 Hz 10 minutuz) bortizki inhibititu zela kaltzio-erreserben deplezioagatik. MPP estimulazioaren ondoren (10 Hz 10 minutuz) MPP-GC

sinapsietan ematen den eCB-eLTDa ere I motako mGluRen mendekoa zen, eta zelula barneko kaltzio-eragina behar zuen (Peñasco et al., 2019). Pentsa genezake, orduan, LFS (10 Hz 10 minutuz) 6-8 asteko sagu arren MPP-GC sinapsiei aplikatzeak, URB597 bidez AEA mailak handituz, TRPV1 desensibilizatzen duela zelula barneko kaltzio gehikuntzaren ondorioz (De Petrocellis et al. 2011; Szymaszkiewicz et al., 2020), eta horrek, baldintza normaletan LTDa mantentzeko beharrezkoak diren zelula barneko kaltzio-erreserbak agortzen dituela (Peñasco et al., 2019). Horren ildotik, TRPV1 kanalaren AMG9810 antagonistak, WTetan eragindako potentziazio-efektua ere azalduko luke, antagonista gabe agertzen den LTDren orde.

TRPV1-KO saguetan, MPP-GC sinapsietan, CB₁Rk bideratutako LTP hori, MPP-GC sinapsien LFSk (1Hz) CB₁R-rikiko independentea den eta AEAren mende dagoen LTDa eragiten du, TRPV1 postsinaptikoaren aktibazioan eta AMPA hartzailen barneratzean oinarritu liteke (Chávez et al., 2010). Egia esan, DGMLren kanpoko 2/3etako terminaletan pikor-zelulen arantza dendritiko postsinaptikoetan TRPV1 hartzailaren adierazpen altuak, TRPV1 kanalek eragindako plastikotasun sinaptikoa anatomikoki berresten du, eztabaidatu den bezala (Puente et al., 2015). MPP-GC sinapsien eCB-eLTD presinaptikoetan (Peñasco et al., 2019) edo postinaptikoetan (Chavez et al., 2010) behatu diren aldeak, estimulazio-paradigmaz gain, zenbait faktore kritikoren ondorio izan daitezke, hala nola adinak (PND 74-80) eta/edo in vitro esperimenteren tenperaturak (32-35 °C). Bi LTD horiek, glutamatoaren askapena murrizten duen CB₁R-ren (Peñasco et al., 2019) eta TRPV1 aktibazioaren bidez ematen den AMPA hartzailen internalizazioaren (Chávez et al., 2010) bidez ematen den efektu sinergikotzat har litezke. Beraz, TRPV1 egon ezean, LFSk jada ez luke LTDa eragingo (Chavez et al., 2010), eta HFS protokoloen bidez bakarrik ager liteke CB₁R-LTDtik (Peñasco et al., 2019) CB₁R-LTPrako (doktoregoko lan hau) aldaketa hau, TRPV1 hartzailaren faltak eragindako CB₁R-ren aldaketetan oinarrituta. Izan ere, LPP-GC sinapsien HFSk LTP bat eragin zuen, zeina CB₁R-ren, NMDAR postsinaptikoen eta mGluR5ak sustatutako 2-AG ekoizpenaren mepekoa den (Wang et al., 2016). Gainera, ikusi zen LPPren bukaera sinaptikoetan CB₁R aktibatu izanak latrunkulinarekiko sentikorrek diren aktina-filamentuen multzokatzea eragiten zuela, integrinari lotutako kinasak (FAK) baten eta haren beheranzko ROCK efektorearen bidezko aktinazitoeskeletoaren berrantolaketak, glutamatoaren askapena areagotzea eragiten dute (Wang et al. 2018). Azpimarratzekoa da, LTPak nabarmen egin zuela behera TRPV1-KOn, latrunkulina gure esperimenteretan aplikatu ondoren; hala ere, ez zuen inolako eraginik izan WTn, TRPV1ren AMG9810 antagonistaren aurrean. Oro har, litekeena da CB₁Rk TRPV1-KOn MPP-GC sinapsietan

aktibatzeak aktina-fosforilazioa eta zelula barneko seinaleztapen-bidezidorrak areagotzea, CB₁R-LTPra daraman glutamato-askapen handiagoa bermatuz.

MPP-GC sinapsietan hauteman ditugun CB₁R-ren aldaketek plastikotasuna CB₁R-LTPra aldatzearen azpian dauden hipotesia sakonago aztertzeko, TRPV1ren AMG9810 antagonista aplikatu zen WTetan. Baldintza horietan, LTPa nabarmen murriztu zen AM251ekin, baina latrunkulinak ez zuen eraginik izan. Horrek adierazten du TRPV1ren blokeo farmakologikoak eragindako LTPan ere CB₁Rk parte-hartzen duela, baina ez TRPV1 ez dagoenean zelula barnean aktibaturiko seinaleztapen-bidezidorreran gertatzen diren aldaketak. Bitxia bada ere, WINek ez zuen inolako eraginik izan AMG9810 farmakoak LFSren ondoren eragindako LTPan. WIN farmakoak, erabilitako kontzentrazioan (5 μm), CB₁R egonkortuko luke, Gi/o edo Gq/11ra akoplatzeko desplazamendua eragingo lukeen konformazio-egoera batean. Horrela, PLCren jarduera areagotuko litzateke, eta, ondorioz, zelula barneko biltegietatik kaltzioa askatuko litzateke (Lauckner et al., 2005), eta, azkenik, glutamatoaren liberazioa eta NMDAR-ren aktibazioa areagotuko litzateke (Errington et al., 1987; Lutz eta Castillo, 2020). CB₁-KOn LFS protokoloaren ondoren ikusitako indartze arina D-APV delakoarekin desagertu zela kontutan izanik (Peñasco et al., 2019), oraindik ez dakigu zer eragin duen D-APV delakoak LTPan, AMG9810 eta WIN farmakoen presentzian, MPP-GC sinapsietan. Gainera, gure LFS protokoloak aurrerago ikusi zenez LTPa eragin zuen LPP-GC sinapsietan WTn (Wang et al., 2016; 2018) eta TRPV1-KOn. Aztertzeke dago geruza horretan CB₁Rk LTPan duten parte-hartzea. Azken kontsiderazio gisa, kontuan izan behar dugu hipokanpoan CB₁Ren agonismoak glutamatoaren askapena areagotzen duela frogatu dela (Funada eta Takebayashi-Ohsawa, 2018), eta astrozitoetan aurkitutako CB₁Rk aktibatzeak glutamatoaren askapena sustatzen duela, tokian-tokiko LTDa eraginez AMPA hartzaileen endozitosiaren bidez (Han et al., 2012) eta baita urruneko transmisio sinaptiko areagotzen ere (Araque et al., 2017).

Laburbilduz, gure aurkikuntzek iradokitzen dute, ECSren osagaiak zelula-mota eta sinapsi espezifikoeetan lokalizatzea funtsezkoa dela seinaleztapen-mekanismo ezberdinen bidez plastikotasun sinaptikoaren hainbat forma eragiteko (Castillo et al., 2012; Puente et al., 2011). Gainera, TRPV1-KOn MPP-GC sinapsietan ikusitako plastikotasun sinaptikoaren aldaketa TRPV1 ez izategatikizan liteke, bai eta TRPV1 ezabatzeak eragindako konpentsazio-mekanismoengatik ere. Etorkizun hurbilean endokannabinoideen neurketak egingo dira aldaketa hauek sakonago ikertzeko

6.3- Oroimen azterketa TRPV1-KOetan.

Hainbat ikerketak frogatu dutenez, TRPV1-KOek nozizepzio asaldura, beroarekiko sentikortasun murriztua (Caterina et al., 2000), ikasteko eta beldur baldintzatuarekiko gabeziak, sukarrarekiko erantzun arinduak (Iida et al., 2005) eta argi-iluneko kaxan eta labirinto garaian probatan jarrera antsiolitikoak agertzen dituzte lokomozioan desberdintasunik hauteman gabe (Marsch et al., 2007). Beraz, tesi-lan honetan TRPV1ren gabeziagatik ezagutza-oroimenak kalterik izan duen aztertu nahi izan dugu, gabezia horrek hipokanpoan, parahipocampoan eta garapen bidean dagoen neokortexean izan dezakeen eraginagatik (Tanimizu et al., 2017).

Frogatu da CB₁Rek lan-oroimenean parte hartzen dutela CB₁R astroglialen bidez (Han et al., 2012), eta oroimen-prozesuak CB₁R mitokondrialen bidez arautzen dituztela (Bénard et al., 2012; Hebert-Chatelain et al., 2016). Gainera, CB₁Rek berebiziko garrantzia duite estres akutuak eragindako oroimen ez-emozionalaren konsolidazioan (Busquets-García et al., 2016), eta gosearen berreskurapenean parte hartzen dute, baina ez, ordea, usaimenaren oroimen abertsiboan (Terral et al., 2019). Horrela, gure azterlanean aurretik ikusitako plastikotasun sinaptikoaren aldaketek eragina izan dezakete TRPV1-KOen portaeran. Hala ere, ez zen aldaketa esanguratsurik aurkitu diskriminazio-indizean, ezta NOR proban izandako esplorazio-denboran ere, TRPV1-KOek WT kumaldi bereko kideen antzera egin baitzuten. Desberdintasun hori proba horretan erabilitako saguen adinak eragin lezake (8 aste), oroimen-gabeziak 10-14 aste bitarteko saguetan (Marsch et al., 2007) eta nagusietan (Iida et al., 2005) hauteman baitziren.

Hipokanpoa espazio-oroimenean ere inplikaturik dagoenez, Barnes-en labirintoaren proba egin genuen urruneko inguruko seinaleen eta ihes finkoko kokapen baten arteko erlazioa ikasteko gaitasuna ebaluatzeko (Pitts, 2018). Beste behin ere, TRPV1-KOek ez zuten alde nabarmenik agertu, ez lana osatzeko erabilitako denboran, ez ihes-kaxa bilatzeko erakutsitako estrategian, WTeekin alderatuta. Hala ere, akats gehiago egin zituzten WTeekin alderatuta. Akats kopurua sagu hauen antsietate txikiagoaren ondorio izan daiteke, baina faktore honek kontrako eragina ere eragin lezake. Beraz, WT kumaldi bereko kideak egoera estresagarriagoan zeudenez, helburua ahalik eta azkarren lortzeko ezin zuten hutsik egin. Akats kopuruan izandako aldea nabarmenagoa izan zen lehen egunetan, eta murriztu egin zen entseguaren azken egunetan, 8 asteko TRPV1-KO saguetan ikasketak ez zuen eraginik izan.

Beraz, TRPV1-KO saguetan ECSn gertatzen diren aldaketa biokimikoak, anatomikoak eta funtzionalak, hau da; terminal gabaergikoetan CB₁Rk gutxitzea eta terminal glutamatergikoetan handitzea, MAGL gutxitzea, DAGL α n eta FAAHn aldaketarik izan gabe, G α i1, G α i2, G α i3 handitzea eta CRIP1a ere areagotzea, CB₁R-ren oinarritzko aktibazio baxua, G proteineri CB₁R-ren akoplamenduaren eraginkortasun handia eta CB₁R-eLTDtik CB₁R-LTPra aldatzeak, nire tesi-lan honetan aztertutako hipokanpoaren portaera probetan ez dutela kalte handirik egiten iradokitzen da. Hala ere, duela gutxi ikusi dugu sagu nerebeen alkohol kontsumo-eredu batean CP 55.940 agonistaren bidezko estimulazioaren potentzia nabarmen murrizten dela [³⁵S] GTP γ S binding entseguetan, baita [³⁵S] GTP γ S oinarritzko akoplamenduan ere eta G α i2 azpiunitatea murrizten dela helduen hipokanpoan, eta horrek lotura izan dezakeela eCB-eLTDrik ez izatearekin. Halaber, MAGLk gora egin zuen gure EtOH ereduan, beste batzuek erakusten duten bezala (Subbanna et al., 2015), baina ez zen aldaketarik izan DAGL α n. Frogatu zen G α i2 azpiunitatearen gabeziak narridurak eragiten zituela ikasketaren eraginkortasunean, soziabilitatean eta ezagutza sozialean (Hamada et al., 2017). Azpimarratzekoa da, MAGLren inhibizioak EtOHk eragindako nahasmendu funtzionalak eta portaera-nahasmenduak gainditzeko ahalmena eman zuela, seguruenik 2-AGren gorakadaren ondorioz (Peñasco et al., 2020). Egia esan, frogatu da MAGLren ablazio farmakologiko edo genetikoak plastikotasun sinaptikoa sustatzen duela epe luzera, eta errendimendu kognitiboa hobetzen duela CB₁Ren bidezko mekanismoak erabiliz (Long et al., 2009; Chen et al., 2012).

Oro har, uste dugu TRPV1-KOen hipokanpoan ECSn izandako aldaketak ez zirela oroimen-defizit nabarmenak eragiteko bezain handiak izan. Hala ere, portaera-proba gehiago egin beharko lirateke defizit horiek antzemateko, hala nola; objektu berriak aurkitzeko proba - espazio-ezagutzaren oroimenerako; lekuan lekuko objektuen proba - asoziazio-ezagutzaren oroimenerako; eremu irekia - estreserako ; rotarod - mugimenduen koordinaziorako; makiltxoaren oreka-proba - oreka eta koordinazioa aztertzeko; buztan eskegiko proba - depresio-motako portaeratarako; argi-iluntsauneko kutxa - kondizionatu gabeko antsietatea neurtzeko. Nerabazaroko alkohol kontsumo-ereduaren eta helduetan aberastutako ingurune baten ondorioak aztertzeko egin zen bezala (Rico-Barrio et al., 2019).

6.4- TRPV1-KOek konbultsio arinagoak dituzte.

Azkenik, TRPV1 jarduera epileptiformean inplikaturik dagoela egiaztatu denez (Bhaskaran eta Smith, 2010; Sun et al., 2012; Iannotti et al., 2014; Naderi et al., 2015; Cho et al., 2018), loki lobuluko epilepsia eragiteko erabiltzen den hipokanpo barneko KA injekzioak (20 mm-ko 50 nl) WT eta TRPV1-KOetan duen eragina ikertu dugu. Azpimarratzekoa da, konbultsio epileptiformeak arinagoak izan zirela TRPV1-KOetan WT kumaldi-kideetan baino, KAK eragindako egoera epileptikoan Racineren eskala eraldatuan puntuazio baxuagoa lortu baitzuten. Gainera, KAK, 30 egunen ondoren, TRPV1-KOen hiponakoan pikor-zelulen sakabanaketa ezaguna eragiteaz gain, CB₁R-ren, DAGLaren eta NAPE-PLDren immunomarkaketa murriztu zituen, baita CB₁R-rako bukaera sinaptiko immunopositiboen proportzioa ere (Grandes et al., 2014; Egaña et al. 2017, argitaratu gabea).

Frogatu da ECSk funtzio babeslea duela konbultsio epileptiformeetan, gainkitzikatutako garun-zirkuituak modulatzuz (Fezza et al., 2014; Katona, 2015; Marsicano et al., 2003; Monory et al., 2006; Naidoo et al., 2011; Soltesz et al., 2015; Cristino et al., 2020). Hala, ECSk; KAK eta glutamatoak eragindako neurotoxikotasunaren aurkako neuronen biziraupena sustatzen du (Marsicano et al., 2003; Marsicano eta Lutz, 2006; Zani et al., 2007; Wolf et al., 2010); CB₁Rk, bukaera sinaptiko inhibitzaileetan areagotzen da, baina ez kitzikatzaileetan, sukar-konbultsioen sagu-eredu batean (Chen et al., 2003; 2007); pentylenetetrazolak (PTZ) eragindako konbultsio akutuen aurreko babeska eskaintzen du (Naderi et al., 2015), eta 2-AG mailen igoerak bat-bateko konbultsioak deuseztatzen ditu (Sugaya et al., 2016). Bestalde, TRPV1 ez egoteak, berez, KAK eragindako kalte eszitotoxiko akutuaren aurkako babeska ere bultzatuko luke; izan ere; TRPV1 jarduera epileptiformean zehar areagotzen da (Sun et al., 2012); kapsaizina, pilokarpina administrazio bakarraren ondoren, bihurtune horzduneko zeluletan eragindako akzio-potentzial independente eta dependienteen jardueraren areagotzea kapsazepinak inhibitzen du (Bhaskaran eta Smith, 2010). PTZak eragindako konbultsioen aurka babesten du (Naderi et al., 2015) eta konbultsioen larritasuna murrizten du saguen epilepsia eredu genetiko batean (Cho et al. 2018).

Pikor-zeluletan seinale integrazioa hiluseko goroldio-zelulen kontrolpean dago, eta horiek modu kritikoan parte hartzen dute informazio-sekuentzien ikaskuntzan (Lisman et al., 2005) eta jarduera epileptiformean ere (Ratzliff et al., 2002). Goroldio-zelulek pikor-zelulen goroldio-zelulen albo-

zuntz glutamatergikoak jasotzen dituzte, eta, aldi berean, interneurona gabaergikoak eta pikorzelula ugari inerbatzen dituzten komisura- eta asoziazio-zuntzak bidaltzen dituzte, MCFLn goroldiozelulen eta pikorzelulen arteko sinapsiak osatuz (Amaral eta Witter, 1989; Ratzliff et al. 2002; Johnston eta Amaral, 2004; Scharfman eta Myers, 2013). Geruza horrek CA3 neurona piramidalen proiektzio glutamatergikoak ere jasotzen ditu (Li et al., 1994). Bihurgune horzduneko pikorzeluletara zuzentzen diren hiru bide kitzikakorren (MPP, LPP, MCFL) sinapsi glutamatergikoek CB₁R dute (Marsicano eta Lutz, 1999; Katona et al., 2006; Kawamura et al., 2006; Monory et al., 2006; Uchigashima et al., 2011; Katona eta Freund, 2012; Wang et al., 2016; Gutiérrez-Rodríguez et al., 2017). Beraz, argudiatu genezake hipokanpoko terminal sinaptiko glutamatergikoetan CB₁R-ek KAK eragindako eraso akutuen aurka babesten dutenez (Monory et al., 2006) eta TRPV1k jarduera epileptiformea errazten duenez, TRPV1-KO MCFLko eta MLko kanpoko 2/3tako konpartimentu azpizelular espezifikoetan gertatzen diren CB₁R-en banaketaren aldaketek (CB₁R-en beherapena bukaera inhibitzaileetan eta handipena kitzikatzileetan eta astrozitoetan), bai eta hipokanpoko aldaketa globalak ere (MAGL gutxitzea, DAGL α n eta FAAHn aldaketarik izan gabe, G α i1, G α i2, G α i3 eta CRIP1a handitzea, CB₁R-ren oinarritzko aktibazio txikia izatea, CB₁R-ren G proteinekiko akoplamenduaren eraginkortasunaren areagotzea) TRPV1-KO saguei babes handiagoa emango liekela KA akutuak hipokanpoan eragindako konbultsio epileptiformeen aurrean (Egaña et al., 2017).

Oro har, aurkikuntza horiek iradokitzen dute TRPV1 ez izateak zenbait egokitzapen-aldaketa eragiten dituela bihurgune horzduneko ECSn, eta horiek onuragarriak izan daitezkeela konbultsioak kontrolatzeko.

7- Ondorioak

Ondoriak

Doktorego-tesi honetan endokannabinoiden sistemaren egitura eta funtzioa TRPV1-KO saguen hipokanpoan karakterizatzetik ateratako ondorioak honako hauek dira:

1. Endokannabinoiden sistemako osagaien adierazpenean aldaketak daude saguaren bihurgune horzdunean.
2. Proteinen adierazpenean gertatutako aldaketak, proteinak kokatzen diren frakzioaren arabera dira: CB₁ hartzailea eta MAGL enzimaren handitu egiten dira homogenezatzen osoetan eta sinaptosometan gutxitu.
3. CRIP1a proteinaren adierazpena aldatzen da.
4. Hipokanpoan, CB₁ hartzailearen G proteinetara akoplatzeko eraginkortasun maximoa areagotzen da.
5. CB₁ hartzailearen bukaera sinaptiko glutamatergiko positibo gehiago daude, baina bukaera glutamatergikoen kopurua, mitokondria kopurua eta CB₁ hartzailearen dentsitatea bukaera sinaptiko gabaergiko eta astrozitoetan gutxituta daude, eta ez dago aldaketarik bukaera sinaptiko gabaergikoen kopuruan, ez eta prozesu astrozitikoaren azalera ere, bihurgune horzduneko molekula-geruzako kanpoko 2/3etan.
6. Bihurgune horzduneko goroldio-zelula axoien amaiera-eremuko plastikotasun sinaptikoari eragiten dio.
7. Plastikotasun sinaptikoa eCB-LTD izatetik eCB-LTP izatera aldatu da erdiko bide zulatzaileko sinapsietan, eta ez da inolako aldaketarik gertatu alboko bide zulatzaileko sinapsietan.
8. 2-AG eta aktina-filamentuen fosforilazioak parte hartzen du erdiko bide zulatzaileko sinapsietan dagoen eCB-LTPan.
9. Sagu heldu gazteetan errekonozimendu- eta espazio-oroiak ez dago kaltetuta.
10. Kainatoak eragindako konbulsio epileptiformeak arinagoak dira.

8- Bibliografia

Bibliografia

- 1- Adermark L. and Bowers M.S. (2016): Disentangling the role of astrocytes in alcohol use disorder. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 40: 1802-1816.
- 2- Ahn K., McKinney M.K., Cravatt B.F. (2008): Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signalling in the nervous system. *Chem. Rev.* 108: 1687-1707.
- 3- Akopian A.N., Ruparel N.B., Patwardhan A., Hargreaves K.M. (2008): Cannabinoids desensitize capsaicin and mustard oil responses in sensory neurons via TRPA1 activation. *J Neuroscience.* 28: 1064-1075.
- 4- Akopian A.N., Ruparel N.B., Jeske N.A., Patwardhan A., Hargreaves K.M. (2009): Role of ionotropic cannabinoid receptors in peripheral antipain and antihyperalgesia. *Trends. Pharmacol. Sci.* 30: 79-84.
- 5- Alger B.E. (2006): Not too excited? Thank your endocannabinoids. *Neuron.* 51(4): 393-5.
- 6- Al-Hayani A., Wease K.N., Ross R.A., Pertwee R.G., Davies S.N. (2001): The endogenous cannabinoid anandamide activates vanilloid receptors in the rat hippocampal slice. *Neuropharmacology.* 41: 1000-1005.
- 7- Amaral D.G. and Witter M.P. (1989): The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience.* 31: 571-591.
- 8- Amaral D.G., Scharfman H.E., Lavenex P. (2007): The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog. Brain Res.* 163: 3-22.
- 9- Andersen P., Morris R., Amaral D.G., Bliss T., O'Keefe J. (2006): *The hippocampus book.* Oxford, UK: Oxford University Press.
- 10- Araque A., Castillo P.E., Manzoni O.J., Tonini R. (2017): Synaptic functions of endocannabinoid signalling in health and disease. *Neuropharmacology.* 124: 13-24.
- 11- Athanasiou A., Smith P.A., Vakilpour S., Kumaran N.M., Turner A.E., Bagiokou D., Layfield R., Ray D.E., Westwell A.D., Alexander S.P., et al. (2007): Vanilloid receptor agonists and antagonists are mitochondrial inhibitors: How vanilloids cause non-vanilloid receptor mediated cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354: 50-55.
- 12- Atwood B.K., Mackie K. (2010): CB2: A cannabinoid receptor with an identity crisis. *Br. J. Pharmacol.* 160: 467-479.
- 13- 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 Itp in the range of the θ frequency. *Cell.* 81: 905-915.

Bibliografía

- 14- Badawy R.A., Harvey A.S., Macdonell R.A. (2009a): Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy—part 1. *J. Clin. Neurosci.* 16.
- 15- Badawy R.A., Harvey A.S., Macdonell R.A. (2009b): Cortical hyperexcitability and epileptogenesis: understanding the mechanisms of epilepsy—part 2. *J. Clin. Neurosci.* 16.
- 16- Barabasi A.L., Oltvai Z.N. (2004): Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat. Rev. Genet.* 5(2): 101-13.
- 17- Barrondo S., Sallés J. (2009): Allosteric modulation of 5-HT_{1A} receptors by zinc: binding studies. *Neuropharmacology.* 56: 455-462.
- 18- Basavarajappa B.S., Cooper T.B., Hungund B.L. (1998): Chronic ethanol administration down-regulates cannabinoid receptors in mouse brain synaptic plasma membrane. *Brain Research.* 793: 212-218.
- 19- Basavarajappa B.S. and Hungund B.L. (1999): Down-regulation of cannabinoid receptor agonist-stimulated [³⁵S] GTP_γS binding in synaptic plasma membrane from chronic ethanol exposed mouse. *Brain Research.* 815: 89-97.
- 20- Basu J., Srinivas K.V., Cheung S.K., Taniguchi H., Huang Z.J., Siegelbaum S.A. (2013): A cortico-hippocampal learning rule shapes inhibitory microcircuit activity to enhance hippocampal information flow. *Neuron* 79, 1208-1221.
- 21- Baude A., Nusser Z., Roberts J.D.B., Mulvihill E., McIlhinney R.A.J., Somogyi P. (1993): The metabotropic glutamate receptor (mGluR_{1α}) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron.* 11: 771-787
- 22- 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., Mulle C., Ortega-Gutiérrez S., Martín-Fontecha M., Klugmann M., Guggenhuber S., Lutz B., Gertsch J., Chaouloff F., López-Rodríguez M.L., Grandes P., Rossignol R., Marsicano G. (2012): Mitochondrial CB₁ receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nat. Neurosci.* 15: 558-564.
- 23- Bender V.A., Bender K.J., Brasier D.J., Feldman D.E. (2006): Two coincidence detectors for spike timing-dependent plasticity in somatosensory cortex. *J. Neurosci.* 26: 4166-4177.
- 24- Benito C., Tolón R.M., Castillo A.I., Ruiz-Valdepeñas L., Martínez-Orgado J.A., Fernández-Sánchez F.J., Vázquez C., Cravatt B.F., Romero J. (2012): β -Amyloid exacerbates inflammation in astrocytes lacking fatty acid amide hydrolase through a mechanism involving PPAR- α , PPAR- γ and TRPV1, but not CB₁ or CB₂ receptors. *British Journal of Pharmacology.* 166: 1474-1489.

- 25- Bhaskaran M.D. and Smith B.N. (2010): Effects of TRPV1 activation on synaptic excitation in the dentate gyrus of a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp. Neurol.* 223: 529-536.
- 26- Bialecki J., Werner A., Weilinger N.L., Tucker C.M., Vecchiarelli H.A., Egaña J., Mendizabal-Zubiaga J., Grandes P., Hill M.N., Thompson R.J. (2020): Suppression of Presynaptic Glutamate Release by Postsynaptic Metabotropic NMDA Receptor Signalling to Pannexin-1. *Journal of Neuroscience.* 257-19.
- 27- Birder L.A., Nakamura Y., Kiss S., Nealen M.L., Barrick S., Kanai A.J., et al. (2002): Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nature Neuroscience.* 5(9): 856-860.
- 28- Blair R.E., Deshpande L.S., Delorenzo R.J. (2015): Endocannabinoids and epilepsy. *Cannabinoids in neurologic and mental disease.* 1st. Waltham, MA, USA: Academic Press: 125-172.
- 29- Blankman J.L., Simon G.M., Cravatt B.F. (2007): A comprehensive profile of brain enzymes that hydrolyze the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Biol.* 14: 1347-1356.
- 30- Bliss T.V. and Lomo T. (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* 232: 331-356.
- 31- Bliss T.V., Collingridge G.L., Morris R.G. (2007): Synaptic plasticity in the hippocampus. *The Hippocampus Book.* Oxford University Press: 343-474.
- 32- Blume L.C., Eldeeb K., Bass C.E., Selley D.E., Howlett A.C. (2015): Cannabinoid receptor interacting protein (CRIP1a) attenuates CB1R signalling in neuronal cells. *Cell Signal.* 27 (3): 716-26.
- 33- Blume L.C., Leone-Kabler S., Luessen D.J., Marrs G.S., Lyons E., Bass C.E., Chen R., Selley D.E., Howlett A.C. (2016): Cannabinoid receptor interacting protein suppresses agonist-driven CB1 receptor internalization and regulates receptor replenishment in an agonist-biased manner. *J. Neurochem.* 139: 396-407.
- 34- Bonilla-Del Rio I., Puente N., Penasco S., Rico I., Gutierrez-Rodrioteaguez A., Elezgarai I., Ramos A., Reguero L., Gerrickagoitia I., Christie B.R., Nahirney P., Grandes P. (2019): Adolescent ethanol intake alters cannabinoid type-1 receptor localization in astrocytes of the adult mouse hippocampus. *Addict Biol.* November 23.
- 35- Booth W.T., Walker N.B., Lowther W.T., Howlett A.C. (2019): Cannabinoid receptor interacting protein 1a (CRIP1a): Function and structure. *Molecules.* 24 (20): 1-9.

Bibliografia

- 36- Bosier B., Bellocchio L., Metna-Laurent M., Soria-Gómez E., Matias I., Hebert-Chatelain E., Cannich A., Maitre M., Leste-Lasserre T., Cardinal P., Mendizabal-Zubiaga J., Canduela M.J., Reguero L., Hermans E., Grandes P., Cota D., Marsicano G. (2013): Astroglial CB1 cannabinoid receptors regulate leptin signaling in mouse brain astrocytes. *Mol. Metab.* 2: 393-404.
- 37- Brailoiu G.C., Oprea T.I., Zhao P., Abood M.E., Brailoiu E. (2011): Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *J. Biol. Chem.* 286: 29166-29174.
- 38- Buckmaster P.S., Wenzel H.J., Kunkel D.D., Schwartzkroin P. A. (1996): Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo. *J. Comp. Neurol.* 366: 271-292.
- 39- Burwell RD. (2000): The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann N Y Acad Sci.* 911: 25-42.
- 40- Busquets-Garcia A., Gomis-Gonzalez M., Srivastava R.K., Cutando L., Ortega-Alvaro A., Rühle S., Remmers F., Bindila L., Bellocchio L., Marsicano G., Lutz B., Maldonado R., Ozaita A. (2016): Peripheral and central CB1 cannabinoid receptors control stress-induced impairment of memory consolidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113: 9904-9909.
- 41- Cadigan K.M., Grossniklaus U., Gehring W.J. (2004): Functional redundancy: the respective roles of the two sloppy paired genes in *Drosophila* segmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91 (14): 6324-8.
- 42- Cajal S.R.Y. (1955): *Histologie du système nerveux de l'homme & des vertèbres.* Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto Ramon y Cajal.
- 43- Calabrese E.J., Rubio-Casillas A. (2018): Biphasic effects of THC in memory and cognition. *Eur. J. Clin. Investig.* 48: 12920.
- 44- Caporale N. and Dan Y., (2008): Spike timing-dependent plasticity: a Hebbian learning rule. *Annu. Rev. Neurosci.* 31: 25-46.
- 45- Canduela M.J., Mendizabal-Zubiaga J., Puente N., Reguero L., Elezgarai I., Ramos-Uriarte A., Gerrikagoitia I., Grandes P. (2015): Visualization by high resolution immunoelectron microscopy of the transient receptor potential vanilloid-1 at inhibitory synapses of the mouse dentate gyrus. *PLoS One.*10 (3).
- 46- Carlson G., Wang Y., Alger B.E. (2002): Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat. Neurosci.* 5: 723-724.

- 47- Casado V., Barrondo S., Spasic M., Callado L.F., Mallol J., Canela E., et al. (2010): Gi protein coupling to adenosine A₁-A_{2A} receptor heteromers in human brain caudate nucleus. *J. Neurochem.* 114 (4): 972-80.
- 48- Castillo P.E., Younts T.J., Chávez A.E., Hashimotodani Y. (2012): Endocannabinoid signaling and synaptic function. *Neuron.* 76: 70-81.
- 49- Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 389 (6653): 816-824.
- 50- Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B., Martin W.J., Trafton J., Petersen-Zeit K.R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 288: 306-313.
- 51- Caterina M. J. (2014): TRP channel cannabinoid receptors in skin sensation, homeostasis, and inflammation. *ACS Chem. Neurosci.* 5: 1107-1116.
- 52- Cavanaugh D.J., Chesler A.T., Bráz J.M., Shah N.M., Julius D., Basbaum A.I. (2011): Restriction of transient receptor potential vanilloid-1 to the peptidergic subset of primary afferent neurons follows its developmental downregulation in nonpeptidergic neurons. *J Neurosci.* 31 (28): 10119-27.
- 53- Chanda P.K., Gao Y., Mark L., Btesh J., Strassle B. W., Lu P., et al. (2010): Monoacylglycerol lipase activity is a critical modulator of the tone and integrity of the endocannabinoid system. *Mol. Pharmacol.* 78: 996-1003.
- 54- Chávez A.E., Chiu C.Q., Castillo P.E. (2010): TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 13: 1511-1518.
- 55- Chávez A.E., Hernández V.M., Rodenas-Ruano A., Savio-Chan C., Castillo P.E. (2014): Compartment-specific modulation of GABAergic synaptic transmission by TRPV1 channels in the dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience.* 34 (50): 16621-16629.
- 56- Chen, K., Ratzliff, A., Hilgenberg, L., Gulyas, A., Freund, T.F., Smith, M., Dinh, T.P., Piomelli, D., Mackie, K., Soltesz, I. (2003): Long-term plasticity of endocannabinoid signaling induced by developmental febrile seizures. *Neuron.* 39: 599-611.
- 57- Chen K., Neu A., Howard A.L., Foldy C., Echevoyen J., Hilgenberg L., et al. (2007): Prevention of plasticity of endocannabinoid signaling inhibits persistent limbic hyperexcitability caused by developmental seizures. *J. Neurosci.* 27: 46-58.

Bibliografia

- 58- Chen Y., Willcockson H.H., Valtschanoff J.G. (2008): Increased expression of CGRP in sensory afferents of arthritic mice—effect of genetic deletion of the vanilloid receptor TRPV1. *Neuropeptides*. 42: 551-6.
- 59- Chen Y., Willcockson H.H., Valtschanoff J.G. (2009): Influence of the vanilloid receptor TRPV1 on the activation of spinal cord glia in mouse models of pain. *Exp. Neurol*. 220: 383-390.
- 60- Chen R., Zhang J., Wu Y., Wang D., Feng G., Tang Y.P., Teng Z., Chen C. (2012): Monoacylglycerol lipase is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Cell Rep*. 2: 1329.
- 61- Chevaleyre V. and Castillo P.E. (2003): Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. *Neuron*. 38: 461-472.
- 62- Chevaleyre V. and Castillo P.E. (2004): Endocannabinoid-mediated metaplasticity in the hippocampus. *Neuron*. 43: 871-881.
- 63- Chiarlone A., Bellocchio L., Blazquez C., Resel E., Soria-Gómez, E., Cannich A., Ferrero J.J., Sagredo O., Benito C., Romero J. et al. (2014): A restricted population of CB1 cannabinoid receptors with neuroprotective activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111: 8257-8262.
- 64- Chiu C.Q. and Castillo P.E. (2008): Input-specific plasticity at excitatory synapses mediated by endocannabinoids in the dentate gyrus. *Neuropharmacology*. 54: 68-78.
- 65- Cho S.J., Vaca M.A., Miranda C.J., N'Gouemo P. (2018): Inhibition of transient potential receptor vanilloid type 1 suppresses seizure susceptibility in the genetically epilepsy-prone rat. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 24 (1): 18-28.
- 66- Clement A.B., Hawkins E.G., Lichtman A.H., Cravatt B.F. (2003): Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *J. Neurosci*. 23: 3916-3923.
- 67- Cohen R., Yokoi T., Holland J.P., Pepper A.E., Holland M.J. (1987): Transcription of the constitutively expressed yeast enolase gene ENO1 is mediated by positive and negative cis-acting regulatory sequences. *Molecular and cellular biology*. 7 (8): 2753-61.
- 68- Conn P.J. and Pin J.P. (1997): Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 37: 205-237.
- 69- Cortright D.N., Crandall M., Sanchez J.F., Zou T., Krause J.E., White G. (2001): The tissue distribution and functional characterization of human VR1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 281: 1183–1189.

- 70- Cristino L., De Petrocellis L., Pryce G., Baker D., Guglielmotti V., Di Marzo V. (2006): Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*. 139: 1405-1415.
- 71- Cristino L., Starowicz K., De Petrocellis L., Morishita J., Ueda N., Guglielmotti V. et al. (2008): Immunohistochemical localization of anabolic and catabolic enzymes for anandamide and other putative endovanilloids in the hippocampus and cerebellar cortex of the mouse brain. *Neuroscience*. 151: 955-968.
- 72- Cristino L., Bisogno T., Di Marzo V. (2020): Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 16 (1): 9-29.
- 73- Cui Y., Perez S., Venance L. (2018): Endocannabinoid-LTP mediated by CB1 and TRPV1 receptors encodes for limited occurrences of coincident activity in neocortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 12: 182.
- 74- Daude N., Wohlgemuth S., Brown R., Pitstick R., Gapesina H., Yang J., et al. (2012): Knockout of the prion protein (PrP)-like Sprn gene does not produce embryonic lethality in combination with PrP(C)-deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (23): 9035-40.
- 75- Davidson E. and Levin M. (2005): Gene regulatory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(14): 4935.
- 76- De Lago E., De Miguel R., Lastres-Becker I., Ramos J.A., Fernandez-Ruiz J. (2004): Involvement of vanilloid-like receptors in the effects of anandamide on motor behavior and nigrostriatal dopaminergic activity: in vivo and in vitro evidence. *Brain Res*. 1007: 152-159.
- 77- De May C.L. and Ali A.B. (2013): Cell type-specific regulation of inhibition via cannabinoid type 1 receptors in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 109: 216-224.
- 78- De Petrocellis L., Starowicz K., Moriello A.S., Vivese M., Orlando P., Di Marzo V. (2007): Regulation of transient receptor potential channels of melastatin type 8 (TRPM8): effect of cAMP, cannabinoid CB1 receptors and endovanilloids. *Exp. Cell Res.* 313: 1911-1920.
- 79- De Petrocellis L., Ligresti A., Moriello A.S., Allarà M., Bisogno T., Petrosino S., et al. (2011): Effects of cannabinoids and cannabinoid-enriched Cannabis extracts on TRP channels and endocannabinoid metabolic enzymes. *Br. J. Pharmacol.* 163: 1479-1494.
- 80- De Petrocellis L., Nabissi M., Santoni G., Ligresti A. (2017): Actions and regulation of ionotropic cannabinoid receptors. *Adv. Pharmacol.* 80: 249-289.

Bibliografia

- 81- De Souza A.T., Dai X., Spencer A.G., Reppen T., Menzie A., Roesch P.L., et al. (2006): Transcriptional and phenotypic comparisons of Ppara knockout and siRNA knockdown mice. *Nucleic acids research*. 34 (16): 4486-94.
- 82- Demuth D.G. and Molleman A. (2006): Cannabinoid signalling. *Life Sci*. 78 (6): 549-563.
- 83- Den Boon F.S., Chameau P., Schaafsma-Zhao Q., van Aken W., Bar, M., Oddi S., Kruse C.G., Maccarrone M., Wadman W.J., Werkman T.R. (2012): Excitability of prefrontal cortical pyramidal neurons is modulated by activation of intracellular type-2 cannabinoid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109: 3534-3539.
- 84- Devane W.A., Dysarz F.A. 3rd, Johnson M.R., Melvin L.S., Howlett A.C. (1988): Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol. Pharmacol*. 34: 605-613.
- 85- 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.
- 86- Dhopeswarkar A. and Mackie K. (2014): CB2 cannabinoid receptors as a therapeutic target- what does the future hold? *Mol. Pharmacol*. 86: 430-437.
- 87- Di Marzo V., Melck D., Bisogno T., De Petrocellis L. (1998): Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci*. 21 (12).
- 88- Di Marzo V., De Petrocellis L., Bisogno T. (2001): Endocannabinoids Part I: molecular basis of endocannabinoid formation, action and inactivation and development of selective inhibitors. *Expert Opin. Ther. Targets*. 5 (2): 241-265.
- 89- Di Marzo V., Lastres-Becker I., Bisogno T., De Petrocellis L., Milone A., Davis J.B., Fernandez-Ruiz J.J. (2001): Hypolocomotor effects in rats of capsaicin and two long chain capsaicin homologues. *Eur. J. Pharmacol*. 420: 123-131.
- 90- Di Marzo V., Blumberg P.M., Szallasi A. (2002): Endovanilloid signalling in pain. *Curr. Opin. Neurobiol*. 12: 372-379.
- 91- Di Marzo V., Gobbi G., Szallasi A. (2008): Brain TRPV1: a depressing TRP down memory lane? *Trends Pharmacol Sci*. 29 (12): 594-600.
- 92- Di Marzo V. (2009): The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol. Res. Official J. Italian Pharmacol. Soc*. 60: 77-84.
- 93- Di Marzo V. and De Petrocellis L. (2012): Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos. Trans. R. Soc. B*. 367: 3216-3228.

- 94- Di Marzo V., Stella N., Zimmer A. (2015): Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 16: 30-42.
- 95- Dinh T.P., Carpenter D., Leslie F.M., Freund T.F., Katona I., Sensi S.L., Kathuria S., Piomelli D. (2002): Brain monoglyceride lipase participating in endocannabinoid inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 10819-10824.
- 96- Dodd P.R., Hardy J.A., Oakley A.E., Edwardson J.A., Perry E.K., Delaunoy J.-P. (1981): A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Res.* 226: 107-118.
- 97- Doly S., Fischer J., Salio C., Conrath M. (2004): The vanilloid receptor-1 is expressed in rat spinal dorsal horn astrocytes. *Neurosci Lett.* 357: 123-126.
- 98- Drebot I.I., Storozhuk M.V., Kostyuk P. G. (2006): An unexpected effect of capsaicin on spontaneous GABAergic IPSCs in hippocampal cell cultures. *Neurophysiology.* 38 (4): 308-311.
- 99- Dudman J.T., Tsay D., Siegelbaum S.A. (2007): A role for synaptic inputs at distal dendrites: instructive signals for hippocampal long-term plasticity. *Neuron.* 56: 866-879.
- 100- Egaña-Huguet J., Rico-Barrio I., Terradillos I., Mendizabal-Zubiaga J.L., Puente N., Gerrickagoitia I., Elezgarai I., Grandes P. (2017): TRPV1-KO saguek epilepsia krisi arinagoak jasatearen zergatiak bilatzen. II. IkerGazte nazioarte kongresua. *Osasun zientziak (I)*: 80-87
- 101- Egertova M. and Elphick M.R. (2000): Localization of cannabinoid receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB. *J. Comp. Neurol.* 422: 159-171.
- 102- Egertova M., Simon G.M., Cravatt B.F., Elphick M.R. (2008): Localization of N-acyl phosphatidylethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) expression in mouse brain: A new perspective on N-acylethanolamines as neural signaling molecules. *J. Comp. Neurol.* 506: 604-615.
- 103- El-Brolosy M.A. and Stainier D.Y.R. (2017): Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.* 13 (7): 1006780.
- 104- Elezgarai I., Diez J., Puente N., Azkue J.J., Benitez R., Bilbao A., Knöpfel T., Doñate-Oliver F., Grandes P. (2003): Subcellular localization of the voltage-dependent potassium channel $K_v3.1b$ in postnatal and adult rat medial nucleus of the trapezoid body. *Neuroscience.* 118: 889-898.
- 105- Errington M.L., Lynch M.A., Bliss T.V. (1987): Long-term potentiation in the dentate gyrus: Induction and increased glutamate release are blocked by D (-) aminophosphonovalerate. *Neuroscience.* 20: 279-284.

Bibliografia

- 106- Evers B., Jastrzebski K., Heijmans J.P., Grertrum W., Beijersbergen R.L., Bernards R. (2016): CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nature biotechnology*. 34 (6): 631-3.
- 107- Farina C., Aloisi F., Meinl E. (2007): Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28: 138-145.
- 108- Fegley D., Kathuria S., Mercier R., Li C., Goutopoulos A., Makriyannis A., et al. (2004): Anandamide transport is independent of fatty-acid amide hydrolase activity and is blocked by the hydrolysis-resistant inhibitor AM1172. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 8756-8761.
- 109- Fezza F., Marrone M.C., Avvisati R., Di Tommaso M., Lanuti M., Rapino C., et al. (2014): Distinct modulation of the endocannabinoid system upon kainic acid-induced in vivo seizures and in vitro epileptiform bursting. *Mol. Cell Neurosci.* 62: 1-9.
- 110- Fimiani C., Mattocks D., Cavani F., Salzet M., Deutsch D.G., Pryor S., et al. (1999): Morphine and anandamide stimulate intracellular calcium transients in human arterial endothelial cells: coupling to nitric oxide release. *Cell. Signal.* 11 (3): 189-193.
- 111- Flores Á., Maldonado R. and Berrendero F. (2013): Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far. *Frontiers Neuroscience.* 7
- 112- Fredens K. (1981): Genetic variation in the histoarchitecture of the hippocampal region in mice. *Anat. Embryol.* 161: 265-281.
- 113- Freund T.F., Katona I., Piomelli D. (2003): Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol. Rev.* 83: 1017-1066.
- 114- Fu M., Xie Z., Zuo H. (2009): TRPV1: a potential target for antiepileptogenesis. *Med. Hypotheses.* 73: 100-102.
- 115- Funada M. and Takebayashi-Ohsawa M. (2018): Synthetic cannabinoid AM2201 induces seizures: involvement of cannabinoid CB1 receptors and glutamatergic transmission *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 338: 1-8.
- 116- Fyhn M., Molden S., Witter M.P., Moser E.I., Moser M.-B. (2004): Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science.* 305: 1258-1264.
- 117- Gaoni Y. and Mechoulam R. (1964): Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am.Chem. Soc.* 86. 1646-1647.
- 118- Gardner-Medwin A.R. (1976): The recall of events through the learning of associations between their parts. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 194: 375-402.

- 119- Garro M.A., Lopez de Jesus M., Ruiz de Azua I., et al. (2001): Regulation of phospholipase C β activity by muscarinic acetylcholine and 5-HT₂ receptors in crude and synaptosomal membranes from human cerebral cortex. *Neuropharmacology*. 40 (5): 686-695.
- 120- Gerdeman G., Lovinger D.M. (2001): CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *J. Neurophysiol.* 85: 468-471.
- 121- Gerdeman G.L., Ronesi J., Lovinger D.M. (2002): Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nature Neuroscience*. 5: 446-451.
- 122- Gibson H.E., Edwards J.G., Page R.S., Van Hook M.J., Kauer J.A. (2008): TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal inter-neurons. *Neuron*. 57: 746-759.
- 123- Glaser S.T. and Kaczocha M. (2009): Temporal changes in mouse brain fatty acid amide hydrolase activity. *Neuroscience*. 163: 594-600.
- 124- Gomez-Gonzalo M., Navarrete M., Perea G., Covelo A., Martin-Fernandez M., Shigemoto R., Lujan R., Araque A. (2015): Endocannabinoids induce lateral long term potentiation of transmitter release by stimulation of gliotransmission. *Cereb. Cortex*. 25: 3699-3712.
- 125- Gong J.P., Onaivi E.S., Ishiguro H., Liu Q.R., Tagliaferro P.A., Brusco A., Uhl G.R. (2006): Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. *Brain Res.* 1071: 10-23.
- 126- González-Gaitán M., Rothe M., Wimmer E.A., Taubert H., Jäckle H. (1994): Redundant functions of the genes *knirps* and *knirps-related* for the establishment of anterior *Drosophila* head structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (18): 8567-71.
- 127- Gonzalez-Reyes L.E., Ladas T.P., Chiang C.-C., Durand D.M. (2013): TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced epileptiform activity *in vitro* and electrographic seizures *in vivo*. *Exp. Neurol.* 250: 321-332.
- 128- Goswami C., Schmidt H., Hucho F. (2007): TRPV1 at nerve endings regulates growth cone morphology and movement through cytoskeleton reorganization. *FEBS J.* 274 (3): 760-772.
- 129- Grandes P. and Streit P. (1991): Effect of perforant path lesion on pattern of glutamate-like immunoreactivity in rat dentate gyrus. *Neuroscience*. 41 (2-3): 391-400.
- 130- Grandes, P. (2014): Anatomy and functional role of the transient receptor potential vanilloid type 1 in the dentate gyrus of a kainate-induced seizures mouse model. 24th Annual

Bibliografia

- ICRS Symposium. NIDA Symposium "TRP Channels: The only TR(i)P you can have on cannabinoids?" Chair: Vincenzo di Marzo. Baveno.
- 131- Grimsey N.L., Graham E.S., Dragunow M., Glass M. (2010): Cannabinoid receptor 1 trafficking and the role of the intracellular pool: Implications for therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* 80: 1050-1062.
- 132- Grueter B.A., Brasnjo G., Malenka R.C. (2010): Postsynaptic TRPV1 triggers cell type-specific long-term depression in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 13: 1519-1525.
- 133- Guggenhuber S., Monory K., Lutz B., Klugmann M. (2010): AAV vector-mediated overexpression of CB1 cannabinoid receptor in pyramidal neurons of the hippocampus protects against seizure-induced excitotoxicity. *PLoS One.* 5: 15707.
- 134- Gulyas A.I., Cravatt B.F., Bracey M.H., Dinh T.P., Piomelli D., Boscia F., Freund T.F. (2004): Segregation of two endocannabinoid-hydrolyzing enzymes into pre and postsynaptic compartments in the rat hippocampus, cerebellum and amygdala. *Eur. J. Neurosci.* 20: 441-458.
- 135- Guo A., Vulchanova L., Wang J., Li X., Elde R. (1999): Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci.* 11: 946-958.
- 136- Gutiérrez-Rodríguez A., Puente N., Elezgarai I., Ruehle S., Lutz B., Reguero L., Gerrikagoitia I., Marsicano G., Grandes P., (2017): Anatomical characterization of the cannabinoid CB1 receptor in cell-type-specific mutant mouse rescue models. *J. Comp. Neurol.* 525: 302-318.
- 137- 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.
- 138- Hajos N., Katona I., Naiem S.S., MacKie K., Ledent C., Mody I., et al. (2000): Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. *Eur. J. Neurosci.* 12: 3239-3249.
- 139- Hamada N., Negishi Y., Mizuno M., Miya F., Hattori A., Okamoto N. et al. (2017): Role of a heterotrimeric G-protein, Gi2, in the corticogenesis: possible involvement in periventricular nodular heterotopia and intellectual disability. *J Neurochem.* 140: 82-95.

- 140- Han J., Kesner P., Metna-Laurent M., Duan T., Xu L., Georges F., et al. (2012): Acute cannabinoids impair working memory through astroglial CB1 receptor modulation of hippocampal LTD. *Cell*. 148 (5): 1039-50.
- 141- Han P., McDonald H.A., Bianchi B.R., Kouhen R.E., Vos M.H., Jarvis M.F., Faltynek C.R., Moreland R.B. (2007): Capsaicin causes protein synthesis inhibition and microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochem. Pharmacol.* 73 (10): 1635-1645.
- 142- Hargreaves E.L., Rao G., Lee I., Knierim J.J. (2005): Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science*. 308: 1792-1794.
- 143- Hartley T., Lever C., Burgess N., O'Keefe J. (2014): Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 369: 20120510.
- 144- Hashimoto-dani Y., Nasrallah K., Jensen K.R., Chávez A.E., Carrera D., Castillo P.E. (2017): LTP at hilar mossy cell-dentate granule cell synapses modulates dentate gyrus output by increasing excitation/inhibition balance. *Neuron*. 95: 928-943.
- 145- Hauser A., Hesdorffer D. (1990): Prognosis. In W.A. Hauser, D.C. Hesdorffer (Eds) *Epilepsy: frequency, causes and consequences*. Demos. NY. 197-243.
- 146- 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.
- 147- Hebert-Chatelain E., Reguero L., Puente N., Lutz B., Chaouloff F., Rossignol R., Piazza P.V., Benard G., Grandes P., Marsicano G. (2014b): Studying mitochondrial CB1 receptors: yes we can. *Mol. Metab.* 3: 339.
- 148- Hebert-Chatelain E., Desprez T., Serrat R., Bellocchio L., Soria-Gomez E., Busquets-Garcia A., Pagano Zottola A.C., Delamarre A., Cannich A., Vincent P., Varilh M., Robin L.M., Terral G., García-Fernández M.D., Colavita M., Mazier W., Drago F., Puente N., Reguero L., Elezgarai I., Dupuy J.W., Cota D., Lopez-Rodriguez M.L., Barreda-Gómez G., Massa F., Grandes P., Bénard G., Marsicano G. (2016): A cannabinoid link between mitochondria and memory. *Nature*. 539: 555-559.
- 149- Heifets B.D. and Castillo P.E. (2009): Endocannabinoid signaling and long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 71: 283-306.

Bibliografia

- 150- Helliwell R.J., McLatchie L.M., Clarke M., Winter J., Bevan S., McIntyre P. (1998): Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci. Lett.* 250 (3): 177-180.
- 151- Herkenham M., Lynn A.B., Little M.D., Johnson M.R., Melvin L.S., De Costa B.R., Rice K.C. (1990): Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 1932-1936.
- 152- Herkenham M., Lynn A.B., Johnson M.R., Melvin L.S., De Costa B.R., Rice K.C. (1991): Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11.
- 153- Hjorth-Simonsen A. (1972): Projection of the lateral part of the entorhinal area to the hippocampus and fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 146: 219-232.
- 154- Hillard C.J., Weinlander K.M., Stuhr K.L. (2012): Contributions of endocannabinoid signaling to psychiatric disorders in humans: genetic and biochemical evidence. *Neuroscience.* 204: 207-229.
- 155- Hironaka K., Ozaki N., Hattori H., Nagamine K., Nakashima H., Ueda M., Sugiura Y. (2014): Involvement of glial activation in trigeminal ganglion in a rat model of lower gingival cancer pain. *Nagoya J. Med. Sci.* 76: 323-332.
- 156- Ho K.W., Ward N.J., Calkins D.J. (2012): TRPV1: A stress response protein in the central nervous system. *Am. J. Neurodegener. Dis.* 1: 1-14.
- 157- Ho K.W., Lambert W.S., Calkins D.J. (2014): Activation of the TRPV1 cation channel contributes to stress-induced astrocyte migration. *Glia.* 62 (9): 1435-51.
- 158- Hoffmann F.M. (1991): *Drosophila* abl and genetic redundancy in signal transduction. *Trends in genetics: TIG.* 7 (11-12): 351-5.
- 159- Hofmann M.E., Nahir B., Frazier C.J. (2006): Endocannabinoid-mediated depolarization-induced suppression of inhibition in hilar mossy cells of the rat dentate gyrus. *J. Neurophysiol.* 96: 2501-2512.
- 160- Howlett A.C. and Mukhopadhyay S. (2000): Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol. *Chem. Phys. Lipids.* 108: 53-70.
- 161- 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.

- 162- 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.
- 163- Huang C., Hu Z.L., Wu W.N., Yu D.F., Xiong Q.J., Song J.R., Shu Q., Fu H., Wang F., Chen J.G. (2010): Existence and distinction of acid-evoked currents in rat astrocytes. *Glia* 58: 1415-1424.
- 164- Huang H., McIntosh A.L., Martin G.G., Landrock D., Chung S., Landrock K.K., Dangott L.J., Li S.R., Kier A.B., Schroeder F. (2016): Fcbp1: A novel hepatic endocannabinoid and cannabinoid binding protein. *Biochemistry*. 55: 5243-5255.
- 165- Huang W.X., Min J.W., Liu Y.Q., He X.H., Peng B.W. (2014): Expression of TRPV1 in the C57BL/6 mice brain hippocampus and cortex during development *NeuroReport*. 25: 379-385.
- 166- Huang W.X., Yu F., Sanchez R.M., Liu Y.Q., Min J.W., Hu J.J., Bsoul N.B., Han S., Yin J., Liu W.H., He X.H., Peng B.W. (2015): TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain *Brain Behav. Immun*. 48: 68-77.
- 167- Hurtado-Zavala J.I., Ramachandran B., Ahmed S. et al. (2017): "TRPV1 regulates excitatory innervation of OLM neurons in the hippocampus" *Nature Communications*. 8: 15878.
- 168- Iannotti F. A., Hill C. L., Leo A., Alhusaini A., Soubrane C., Mazzarella E. et al. (2014): Nonpsychotropic plant cannabinoids, cannabidivarin (CBDV) and cannabidiol (CBD), activate and desensitize transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channels in vitro: potential for the treatment of neuronal hyperexcitability. *ACS Chem. Neurosci*. 5: 1131-1141.
- 169- Iida T., Shimizu I., Nealen M.L., Campbell A., Caterina M. (2005): Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. *Neurosci. Lett*. 378: 28-33.
- 170- Iversen L. (2003): Cannabis and the brain. *Brain*. 126: 1252-1270.
- 171- Isokawa M. and Alger B.E. (2005): Retrograde endocannabinoid regulation of GABAergic inhibition in the rat dentate gyrus granule cell. *J. Physiol*. 567: 1001-1010.
- 172- Jancso-Gabor A., Szolcsanyi J., Jancso N. (1970): Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats. *J. Physiol*. 208 (2): 449-459.
- 173- Jimenez-Blasco et al., Nature submitted.
- 174- Johnston D. and Amaral D.G. (2004): Hippocampus. In: Shepherd GM, editor. The synaptic organization of the brain. ed. Oxford: Oxford University Press. 455-498.
- 175- Jung M., Calassi R., Rinaldi-Carmona M., Chardenot P., Le Fur G., Soubrie P., Oury-Donat F. (1997): Characterization of CB1 receptors on rat neuronal cell cultures: binding and functional studies using the selective receptor antagonist SR 141716A. *J. Neurochem*. 68 (1): 402-409.

Bibliografia

- 176- Kano M., Ohno-Shosaku T., Hashimotodani Y., Uchigashima M., Watanabe M. (2009): Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol. Rev.* 89: 309-380.
- 177- Karakas B., Weeraratna A.T., Abukhdeir A.M., Konishi H., Gustin J.P., Vitolo M.I. et al. (2007): P21 gene knock down does not identify genetic effectors seen with gene knock out. *Cancer biology & therapy.* 6 (7): 1025-30.
- 178- Katona I., Sperlagh B., Sik A., Kafalvi A., Vizi E.S., Mackie K., Freund T.F. (1999): Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J. Neurosci.* 19: 4544-4558.
- 179- Katona I., Urban G.M., Wallace M., Ledent C., Jung K.M., Piomelli D., Mackie K., Freund T.F. (2006): Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* 26: 5628-5637.
- 180- Katona I., Freund T.F. (2008): Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat. Med.* 14: 923-930.
- 181- Katona I., Freund T.F. (2012): Multiple functions of endocannabinoid signaling in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 35: 529-558.
- 182- Katona I. (2015): Cannabis and endocannabinoid signaling in epilepsy. 231: 285-316.
- 183- Kauer J.A. and Gibson H.E. (2009): Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends Neurosci.* 32: 215-224.
- 184- Kawahara H., Drew G.M., Christie M.J., Vaughan C.W. (2011): Inhibition of fatty acid amide hydrolase unmasks CB₁ receptor and TRPV1 channel-mediated modulation of glutamatergic synaptic transmission in midbrain periaqueductal grey. *Br. J. Pharmacol.* 163: 1214-1222.
- 185- Kawamura Y., Fukaya M., Maejima T., Yoshida T., Miura E., Watanabe M., Ohno-Shosaku T., Kano M. (2006): The CB1 cannabinoid receptor is the major cannabinoid receptor at excitatory presynaptic sites in the hippocampus and cerebellum. *J. Neurosci.* 26: 2991-3001.
- 186- Kofalvi A., Oliveira C.R., Cunha R.A. (2006): Lack of evidence for functional TRPV1 vanilloid receptors in rat hippocampal nerve terminals. *Neurosci. Lett.* 403: 151-156.
- 187- Kong W.-L., Min J.-W., Liu Y.-L., Li J.-X., He X.-H., Peng B.-W. (2014): Role of TRPV1 in susceptibility to PTZ-induced seizure following repeated hyperthermia challenges in neonatal mice. *Epilepsy Behav.* 31: 276-280.
- 188- Kovacs G.G., Robinson J.L., Xie S.X., Lee E.B., Grossman M., Wolk D.A., Irwin D.J., Weintraub D., Kim C.F., Schuck T., Yousef A., Wagner S.T., Suh E., Van Deerlin V.M., Lee V.M., Trojanowski J.Q. (2017): Evaluating the patterns of aging-related tau astroglial pathology unravels

- novel insights into brain aging and neurodegenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 76: 270-288.
- 189- Kunos G., Osei-Hyiaman D., Bátkai S., Gao B. (2006): Cannabinoids hurt, heal in cirrhosis. *Nat. Med.* 12: 608-610.
- 190- Law S.H. and Sargent T.D. (2014): The serine-threonine protein kinase PAK4 is dispensable in zebrafish: identification of a morpholino-generated pseudophenotype. *PLoS ONE.* 9 (6): 100268.
- 191- Lafourcade M., Elezgarai I., Mato S., Bakiri Y., Grandes P., Manzoni O.J. (2007): Molecular components and functions of the endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. *PLoS One.* 2: 1-11.
- 192- Lauckner J.E., Hille B., Mackie K. (2005): The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102 (52): 19144-19149.
- 193- Lee L. Y., Ni D., Hayes D., Lin R. L. (2011): TRPV1 as a cough sensor and its temperature-sensitive properties. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 24 (3): 280-285.
- 194- Lee S.H., Ledri M., Tóth B., Marchionni I., Henstridge C.M., Dudok B., et al. (2015): Multiple Forms of Endocannabinoid and Endovanilloid Signaling Regulate the Tonic Control of GABA Release. *J. Neurosci.* 35 (27): 10039-57.
- 195- Leterrier C., Bonnard D., Carrel D., Rossier J., Lenkei Z. (2004): Constitutive endocytic cycle of the CB1 cannabinoid receptor. *J. Biol. Chem.* 279: 36013-36021.
- 196- Letzkus J.J., Wolff S.B., Luthi A. (2015): Disinhibition, a circuit mechanism for associative learning and memory. *Neuron.* 88: 264-276.
- 197- Lévesque M. and Avoli M. (2013): The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37: 2887-99.
- 198- Li X.G., Somogyi P., Ylien A., Buszáki G. (1994): The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J. Comp. Neurol.* 339: 181-208.
- 199- Li H.-B., Mao R.-R., Zhang J.-C., Yang Y., Cao J., Xu L. (2008): Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. *Biol. Psychiatry.* 64 (4): 286-292.
- 200- Lisman J.E., Talamini L.M., Raffone A. (2005): Recall of memory sequences by interaction of the dentate and CA3: a revised model of the phase precession. *Neural networks: the official journal of the International Neural Network Society.* 18: 1191-1201.

Bibliografia

- 201- Long J.Z., Li W., Booker L., Burston J.J., Kinsey S.G., Schlosburg J.E., Pavón F.J., Serrano A.M., Selley D.E., Parsons L.H., Lichtman A.H., Cravatt B.F. (2009): Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. *Nat Chem Biol* 5: 37-44.
- 202- Lopez De Jesus M., Stope M.B., Oude Weernink P.A., Mahlke Y., Borgermann C., Ananaba V.N., Rimmbach C., Rosskopf D., Michel M.C., Jakobs K.H., Schmidt M. (2006): Cyclic AMP-dependent and Epac-mediated activation of R-Ras by G protein-coupled receptors leads to phospholipase D stimulation. *J. Biol. Chem.* 281: 21837-21847.
- 203- Lothman E.W., Bertram E.H., Stringer J.L. (1991): Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog. Neurobiol.* 37 (1).
- 204- Lu H.C. and Mackie K. (2016): An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biol. Psychiatry.* 79: 516-525.
- 205- Ludanyi A., Eross L., Czirjak S., Vajda J., Halasz P., Watanabe M., Palkovits M., Magloczky Z., Freund T.F., Katona I. (2008): Downregulation of the CB1 cannabinoid receptor and related molecular elements of the endocannabinoid system in epileptic human hippocampus. *J. Neurosci.* 28: 2976-2990.
- 206- Ludanyi A., Hu S.S., Yamazaki M., Tanimura A., Piomelli D., Watanabe M., Kano M., Sakimura K., Magloczky Z., Mackie K., Freund T.F., Katona I (2011): Complementary synaptic distribution of enzymes responsible for synthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the human hippocampus. *Neuroscience.* 174: 50-63.
- 207- Luján R., Roberts J.D., Shigemoto R., Ohishi H., Somogyi P. (1997): Differential plasma membrane distribution of metabotropic glutamate receptors mGluR1 alpha, mGluR2 and mGluR5, relative to neurotransmitter release sites. *J. Chem. Neuroanat.* 13: 219-241.
- 208- Luo Z., Ma L., Zhao Z., He H., Yang D., Feng X., Ma S., Chen X., Zhu T., Cao T., Liu D., Nilius B., Huang Y., Yan Z., Zhu Z. (2012): TRPV1 activation improves exercise endurance and energy metabolism through PGC-1 alpha upregulation in mice. *Cell. Res.* 22: 551-564.
- 209- Lüttjohann A., Fabene P.F., van Luijckelaar G. (2009): A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiology & Behavior.* 98 (5): 579-586.
- 210- Lutz B., Marsicano G., Maldonado R., Hillard C.J. (2015): The endocannabinoid system in guarding against fear, anxiety and stress. *Nature Reviews Neuroscience.* 16: 705-718.
- 211- Lutz S. and Castillo P.E. (2020): Modulation of NMDA Receptors by G-protein-coupled receptors: Role in Synaptic Transmission, Plasticity and Beyond. *Neuroscience.*

- 212- Maccarrone M., Bab R., Biro T., Cabral G.A., Dey S.K., di Marzo V., Konje J.C., Kunos G., Mechoulam R., Pacher P., et al. (2015): Endocannabinoid signaling at the periphery: 50 years after thc. *Trends Pharmacol. Sci.* 36: 277-296.
- 213- Mackie K. (2005): Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Handb. Exp. Pharmacol.* 299-325.
- 214- Mackie K. and Stella N. (2006): Cannabinoid receptors and endocannabinoids: evidence for new players. *AAPS J.* 8.
- 215- Mailleux P. and Vanderhaeghen J-J. (1992): Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience.* 48: 655-668.
- 216- Maione S., Cristino L., Migliozi A.L., Georgiou A.L., Starowicz K., Salt T.E., et al. (2009): TRPV1 channels control synaptic plasticity in the developing superior colliculus. *J. Physiol.* 587: 2521-2535.
- 217- Manna S.S.S. and Umathe S.N. (2012): Involvement of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the pro-convulsant effect of anandamide in pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy Res.* 100: 113-124.
- 218- Mannari T., Morita S., Furube E., Tominaga M., Miyata S. (2013): Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains. *Glia.* 61: 957-971.
- 219- Marinelli S., Vaughan C.W., Christie M.J., and Connor M. (2002): Capsaicin activation of glutamatergic synaptic transmission in the rat locus coeruleus in vitro. *The Journal of Physiology.* 543 (2): 531-540.
- 220- Marinelli S., Di Marzo V., Berretta N., Matias I., Maccarrone M., Bernardi G., Mercuri N.B. (2003): Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *J Neurosci.* 23: 3136-3144.
- 221- Marinelli S., Pacioni S., Bisogno T., di Marzo V., Prince D.A., Huguenard J.R., Bacci, A. (2008): The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is responsible for the slow self-inhibition in neocortical linterneurons. *J. Neurosci.* 28: 13532-13541.
- 222- Marinelli S., Pacioni S., Cannich A., Marsicano G., Bacci A. (2009): Self-modulation of neocortical pyramidal neurons by endocannabinoids. *Nat. Neurosci.* 12: 1488-1490.
- 223- Marr D. (1971): Simple memory: a theory for archicortex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 262, 23-81.

Bibliografia

- 224- Marrone M.C., Morabito A., Giustizieri M., Chiurchiu V., Leuti A., Mattioli M., et al. . (2017): TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. *Nat. Commun.* 8: 15292.
- 225- Marrs W.R., Blankman J.L., Horne E.A., Thomazeau A., Lin Y.H., Coy J., Bodor A.L., Muccioli G.G., Hu S.S., Woodruff G., Fung S., Lafourcade M., Alexander J.P., Long J.Z., Li W., Xu C., Moller T., Mackie K., Manzoni O.J., Cravatt B.F., Stella N. (2010): The serine hydrolase ABHD6 controls the accumulation and efficacy of 2-AG at cannabinoid receptors. *Nat. Neurosci.* 13: 951-957.
- 226- Marsch R., Foeller E., Rammes G., Bunck M., Kössl M., Holsboer F., et al. (2007): Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J. Neurosci.* 27 (4): 832-9.
- 227- Marsicano G. and Lutz B. (1999): Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur. J. Neurosci.* 11: 4213-4225.
- 228- Marsicano G., Goodenough S., Monory K., Hermann H., Eder M., Cannich A., Azad S.C., Cascio M.G., Gutierrez S.O., van der Stelt M., et al. (2003): CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science.* 302: 84-88.
- 229- Marsicano G. and Lutz B. (2006): Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J. Endocrinol. Invest.* 29: 27-46.
- 230- Marsicano G. and Kuner R. (2008): Anatomical distribution of receptors, ligands and enzymes in the brain and in the spinal cord: circuitries and neurochemistry. *Cannabinoids and the brain.* New York: Springer. 161-201.
- 231- Martin E., Dahan D., Cardouat G., Gillibert-Duplantier J., Marthan R., Savineau J.P., Ducret T. (2012): Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 464 (3): 261-272.
- 232- Martínez-Vargas M., Murillo-Rodríguez E., González-Rivera R., Landa A., Méndez-Díaz M., Prospero-García O., Navarro L. (2003): Sleep modulates cannabinoid receptor 1 expression in the pons of rats. *Neuroscience.* 117: 197-201.
- 233- Mateos J.M., Elezgarai I., Benitez R., Osorio A., Bilbao A., Azkue J.J., et al. (1999): Clustering of the group III metabotropic glutamate receptor 4a at parallel fiber synaptic terminals in the rat cerebellar molecular layer. *Neurosci. Res.* 35: 71-74.
- 234- Mather K. (1953): Genetical control of stability in development. *Heredity.* 7 (3): 297-336.

- 235- Matsuda L.A., Lolait S.J., Brownstein M.J., Young A.C., Bonner T.I. (1990): Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 346: 561-564.
- 236- Matsuda L.A., Bonner T.I., Lolait S.J. (1993): Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J. Comp. Neurol.* 327: 535-550.
- 237- Matsuda L.A. (1997): Molecular aspects of cannabinoid receptors. *Crit. Rev. Neurobiol* 11: 143-166.
- 238- McAllister S.D. and Glass M. (2002): CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*. 66 (2-3): 161-171.
- 239- McJunkin K., Mazurek A., Premisrut P.K., Zuber J., Dow L.E., Simon J., et al. (2011): Reversible suppression of an essential gene in adult mice using transgenic RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (17): 7113-8.
- 240- Mechoulam R. (1986): *The Pharmacology of Cannabis sativa*, in *Cannabis as Therapeutic Agent*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- 241- Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanus L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almog S., Martin B.R., Compton D.R. et al. (1995): Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 50: 83-90.
- 242- Mechoulam R. and Parker L.A. (2013): The endocannabinoid system and the brain. *Annu. Rev. Psychol.* 64: 21-47.
- 243- Metna-Laurent M. and Marsicano G. (2015): Rising stars: modulation of brain functions by astroglial type-1 cannabinoid receptors. *Glia*. 63: 353-364.
- 244- Mezey E., Toth Z.E., Cortright D.N., Arzubi M.K., Krause J.E., Elde R. et al. (2000): Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97 (7): 3655-3660.
- 245- Micale V., Cristino L., Tamburella A., Petrosino S., Leggio G.M., Drago F., et al. (2009): Anxiolytic effects in mice of a dual blocker of fatty acid amide hydrolase and transient receptor potential vanilloid type-1 channels. *Neuropsychopharmacology*. 34: 593-606.
- 246- Mitchell J.A., Williams F.M., Williams T.J., Larkin S.W. (1997): Role of nitric oxide in the dilator actions of capsaicin-sensitive nerves in the rabbit coronary circulation. *Neuropeptides*. 31(4): 333-338.

Bibliografia

- 247- Miyake T., Shirakawa H., Nakagawa T., Kaneko S. (2015): Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia*. 63: 1870-1882
- 248- Miyake T., Shirakawa H., Nakagawa T., Kaneko S. (2015): Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia*. 63: 1870-1882.
- 249- Monory K., Massa F., Egertova M., Eder M., Blaudzun H., Westenbroek R., et al. (2006): The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus. *Neuron*. 51: 455-466.
- 250- Montell C. (2005): The TRP superfamily of cation channels. *Science*. STKE (3): 272.
- 251- Morales P., Hurst D.P., Reggio P.H. (2017a): Molecular targets of the phytocannabinoids: a complex picture. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 103: 103-131.
- 252- Morales P. and Reggio P.H. (2017b): An update on non-CB1, non-CB2 cannabinoid related G-protein-coupled receptors. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2: 265-273.
- 253- Morales P., Isawi I., Reggio P.H. (2018): Towards a better understanding of the cannabinoid-related orphan receptors GPR3, GPR6, and GPR12. *Drug Metab. Rev.* 50: 74-93.
- 254- Morales-Lázaro S.L., Simon S.A., Rosenbaum T. (2013): The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J. Physiol.* 591: 3109-3121.
- 255- Morgens D.W., Deans R.M., Li A., Bassik M.C. (2016): Systematic comparison of CRISPR/Cas9 and RNAi screens for essential genes. *Nature biotechnology*. 34 (6): 634-6.
- 256- Mori F., Ribolsi M., Kusayanagi H., Monteleone F., Mantovani V., Buttari F., Marasco E., Bernardi G., Maccarrone M., Centonze D. (2012): TRPV1 channels regulate cortical excitability in humans. *J. Neurosci.* 32: 873-879.
- 257- Muller C., Morales P., Reggio P.H. (2019): Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front. Mol. Neurosci.* 11: 487.
- 258- Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. (1993): Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 365: 61-65.
- 259- Murataeva N., Straiker A., Mackie K. (2014): Parsing the players: 2-arachidonoylglycerol synthesis and degradation in the CNS. *Br. J. Pharmacol.* 171: 1379-1391.

- 260- Murillo-Rodriguez E., Désarnaud F., Prospéro-Garcia O. (2006): Diurnal variation of arachidonylethanolamine, palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide in the brain of the rat. *Life Sci.* 79: 30-37.
- 261- Musella A., De Chiara V., Rossi S. et al. (2009): "TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum. *Molecular and Cellular Neuroscience.* 40 (1): 89-97.
- 262- Naderi N., Shafieirad E., Lakpoor D., Rahimi A., Mousavi Z. (2015): Interaction between Cannabinoid Compounds and Capsazepine in Protection against Acute Pentylene-tetrazole-induced Seizure in Mice. *Iran. J. Pharm. Res.* 14: 115-20.
- 263- Naidoo V., Nikas S., Karanian D., Hwang J., Zhao J., Wood J., Alapafuja S., Vadivel S., Butler D., Makriyannis A., Bahr B. (2011): A New Generation Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibitor Protects Against Kainate-Induced Excitotoxicity. *Journal of Molecular Neuroscience.* 43: 493-502.
- 264- Navarrete M. and Araque A. (2008): Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron.* 57: 883-893.
- 265- Navarrete M. and Araque A. (2010). Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron.* 68: 113-126.
- 266- Navarrete M., Diez A., Araque A. (2014): Astrocytes in endocannabinoid signaling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369: 20130599.
- 267- Nedvetzki S., Gonen E., Assayag N., Reich R., Williams R.O., Thurmond R.L., et al. (2004): RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101 (52):18081-6
- 268- Nicolussi S., Gertsch J. (2015): Endocannabinoid transport revisited. *Vitam. Horm.* 98: 441-485.
- 269- Nie J. and Lewis D.L. (2001a): The proximal and distal C-terminal tail domains of the CB1 cannabinoid receptor mediate G protein coupling. *Neuroscience.* 107: 161-167.
- 270- Nie J. and Lewis D.L. (2001b): Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration. *J. Neurosci.* 21: 8758-8764.
- 271- Niehaus J.L., Liu Y., Wallis K.T., Egertova M., Bhartur S.G., Mukhopadhyay S., et al. (2007): CB₁ Cannabinoid Receptor Activity Is Modulated by the Cannabinoid Receptor Interacting Protein CRIP1a. *Mol. Pharmacol.* 72 (6): 1557-66.

Bibliografia

- 272- Nilius B. and Szallasi A. (2014): Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol. Rev.* 66: 676-814.
- 273- Nyiri G., Cserep C., Szabadits E., Mackie K., Freund T.F. (2005): CB1 cannabinoid receptors are enriched in the perisynaptic annulus and on preterminal segments of hippocampal GABAergic axons. *Neuroscience.* 136: 811-822.
- 274- Oliveira da Cruz J.F., Robin L.M., Drago F., Marsicano G., Metna-Laurent M. (2016): Astroglial type-1 cannabinoid receptor (CB1): a new player in the tripartite synapse. *Neuroscience.* 323: 35-42.
- 275- Pacher P., Batkai S., Kunos, G. (2006): The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacol. Rev.* 58: 389-462.
- 276- Parsons L.H. and Hurd Y.L. (2015): Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 16: 579-594.
- 277- Patel S., Hill M.N., Cheer J.F., Wotjak C.T., Holmes A. (2017): The endocannabinoid system as a target for novel anxiolytic drugs. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76: 56-66.
- 278- Pegorini S., Zani A., Braida D., Guerini-Rocco C., Sala M. (2006): Vanilloid VR1 receptor is involved in rimonabant-induced neuroprotection. *British Journal of Pharmacology.* 147 (5): 552-559.
- 279- Peñasco S., Rico-Barrio I., Puente N., Gómez-Urquijo S.M, Fontaine C.J., Egaña-Huguet J., Achicallende S., Ramos A., Reguero L., Elezgarai I., Nahirney P.C., Christie B.R., Grandes P. (2019): Endocannabinoid long-term depression revealed at medial perforant path excitatory synapses in the dentate gyrus. *Neuropharmacology.* 153: 32-40.
- 280- Peñasco S., Rico-Barrio I., Puente N., Fontaine C.J., Ramos A., Reguero L., Gerrikagoitia I., Rodríguez de Fonseca F., Suarez J., Barrondo S., Aretxabala X., García del Caño G., Sallés J., Elezgarai I., Nahirney P.C., Christie B.R., 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
- 281- Pertwee R.G. (2006): Cannabinoid pharmacology: The first 66 years. *Br. J. Pharmacol.* 147: 163-171.
- 282- 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.

- 283- Pinar C., Fontaine C.J., Triviño-Paredes J., Lottenberg C.P., Gil-Mohapel J., Christie B.R. (2017): Revisiting the flip side: long-term depression of synaptic efficacy in the hippocampus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 80: 394-413.
- 284- Pitts M.W. (2018): Barnes maze procedure for spatial learning and memory in mice. *Bio Protocols.* 8
- 285- Puente N., Elezgarai I., Lafourcade M., Reguero L., Marsicano G., Georges F., et al. (2010a): Localization and function of the cannabinoid CB1 receptor in the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *PLoS One.* 5: 8869.
- 286- Puente N., Mendizabal-Zubiaga J., Elezgarai I., Reguero L., Buceta I., Grandes P. (2010b): Precise localization of the voltage-gated potassium channel subunits Kv3.1b and Kv3.3 revealed in the molecular layer of the rat cerebellar cortex by a preembedding immunogold method. *Histochem. Cell Biol.* 403-409.
- 287- Puente N., Cui Y., Lassalle O., Lafourcade M., Georges F., Venance L., Grandes P., Manzoni O.J. (2011): Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat. Neurosci.* 14: 1542-1547.
- 288- Puente N., Reguero L., Elezgarai I., Canduela M.J., Mendizabal-Zubiaga J., Ramos-Urriarte A., Fernández-Espejo E., Grandes P. (2015): The transient receptor potential vanilloid-1 is localized at excitatory synapses in the mouse dentate gyrus. *Brain Struct. Funct.* 220: 1187-1194.
- 289- Puente N., Bonilla-Del Río I., Achicallende S., Nahirney P.C. and Grandes, P. (2019): High resolution immunoelectron microscopy techniques for revealing distinct subcellular type 1 cannabinoid receptor domains in brain. *Bio-protocol.* 9 (2): e3145.
- 290- 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.
- 291- Racine R. (1972): Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology.* 32 (3): 281-294.
- 292- Ratzliff A.D., Santhakumar V., Howard A., Soltesz I. (2002): Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis? *Trends Neurosci.* 25: 140-144.
- 293- Renau-Piqueras J., Zaragoza R., De Paz P., Baguena-Cervellera R., Megias L., Guerri C. (1989): Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing

Bibliografia

- intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 229-240.
- 294- Reguero L., Puente N., Elezgarai I., Mendizabal-Zubiaga J., Canduela M.J., Buceta I., et al. (2011): GABAergic and cortical and subcortical glutamatergic axon terminals contain CB1 cannabinoid receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *PLoS One.* 6: e26167.
- 295- Reguero L., Puente N., Elezgarai I., Ramos-Uriarte A., Gerrikagoitia I., Bueno-López J.L., et al. (2014): Subcellular localization of NAPE-PLD and DAGL- α in the ventromedial nucleus of the hypothalamus by a preembedding immunogold method. *Histochemistry and Cell Biology.* 141 (5): 543-550.
- 296- Ribak C.E., Seress L., Amaral D.G. (1985): The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J. Neurocytol.* 14: 835-857.
- 297- Rico-Barrio I., Peñasco S., Puente N., Ramos A., Fontaine C.J., Reguero L., Giordano M.E., Buceta I., Terradillos I., Lekunberri L., Mendizabal-Zubiaga J., Rodríguez de Fonseca F., Gerrikagoitia I., Elezgarai I., Grandes P. (2018): Cognitive and neurobehavioral benefits of an enriched environment on young adult mice after chronic ethanol consumption during adolescence. *Addict. Biol.* 24(5):969-980.
- 298- Robbe D., Kopf M., Remaury A., Bockaert J., Manzoni O.J. (2002): Endogenous cannabinoids mediate long-term synaptic depression in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 8384-8388.
- 299- Roberts J.C., Davis J.B., Benham C.D. (2004): [H3]Resiniferatoxin auto-radiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res.* 995: 176-183.
- 300- Rodriguez M., Abdala P., Barroso-Chinea P., Gonzalez-Hernandez T. (2001): The deep mesencephalic nucleus as an output center of basal ganglia: morphological and electrophysiological similarities with the substantia nigra. *J. Comp. Neurol.* 438: 12-31.
- 301- Rosenberg E.C., Tsien R.W., Whalley B.J., et al. (2015): Cannabinoids and epilepsy. *Neurotherapeutics.* 12: 747-68.
- 302- Ross R.A. (2003). Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 140: 790-801.
- 303- Rouzer C.A. and Marnett L.J. (2011): Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes p450: Cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem. Rev.* 111: 5899-5921.

- 304- Rozenfeld R. and Devi L.A. (2008): Regulation of CB1 cannabinoid receptor trafficking by the adaptor protein ap-3. *FASEB J.* 22: 2311-2322.
- 305- Rozenfeld R. (2011): Type I cannabinoid receptor trafficking: All roads lead to lysosome. *Traffic.* 12: 12-18.
- 306- 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.
- 307- Ruparel N.B., Patwardhan A.M., Akopian A.N., Hargreaves K.M. (2011): Desensitization of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) by the TRP vanilloid 1-selective cannabinoid arachidonoyl-2 chloroethanolamine. *Mol. Pharmacol.* 80: 117-123.
- 308- Ryberg E., Larsson N., Sjogren S., Hjorth S., Hermansson N.O., Leonova J., Elebring T., Nilsson K., Drmota T., Greasley P.J. (2007): The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br. J. Pharm.* 152: 1092-1101.
- 309- Sanchez J.F., Krause J.E., Cortright D.N. (2001): The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5 = splice variant RNA expression in rat. *Neuroscience.* 107: 373-381.
- 310- Santamaria D., Barriere C., Cerqueira A., Hunt S., Tardy C., Newton K., et al. (2007): Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.* 448 (7155): 811-5.
- 311- Schaible H.G., Ebersberger A., Von Banchet G.S. (2002): Mechanisms of pain in arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966: 343-354.
- 312- Scharfman H.E. (2007): The neurobiology of epilepsy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 7.
- 313- Scharfman H.E. and Myers C.E. (2013): Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Front. Neural Circuits.* 6: 106.
- 314- Scharfman H.E. (2016): The enigmatic mossy cell of the dentate gyrus. *Nat. Rev. Neurosci.* 17: 562-575.
- 315- Schlosburg J.E., Blankman J.L., Long J.Z. (2010): Chronic monoacylglycerol lipase blockade causes functional antagonism of the endocannabinoid system. *Nat Neurosci.* 13 (9): 1113-1119.
- 316- Schmidt D. and Sillanpaa M. (2012): Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. *Curr. Opin. Neurol.* 25.
- 317- Sharkey K.A., Cristino L., Oland L.D., Van Sickle M.D., Starowicz K., Pittman Q.J., Guglielmotti V., Davison J.S., Di Marzo V. (2007): Arvanil, anandamide and N-arachidonoyl-

Bibliografia

- dopamine (NADA) inhibit emesis through cannabinoid CB1 and vanilloid TRPV1 receptors in the ferret. *Eur. J. Neurosci.* 25: 2773-2782.
- 318- Sierra A., Martin-Suarez S., Valcarcel-Martin R., Pascual-Brazo J., Aelvoet S.A., Abiega O., et al. (2015): Neuronal hyperactivity accelerates depletion of neural stem cells and impairs hippocampal neurogenesis. *Cell Stem Cell.* 16: 488-503.
- 319- Silvin A. and Ginhoux F. (2018): Microglia heterogeneity along a spatio-temporal axis: more questions than answers. *Glia.* 66: 2045-2057.
- 320- Singla S., Kreitzer A.C., Malenka R.C. (2007): Mechanisms for synapse specificity during striatal long-term depression. *J. Neurosci.* 27: 5260-5264.
- 321- Sjöström P.J., Turrigiano G.G., Nelson S.B. (2003): Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron.* 39: 641-654.
- 322- Smith T.H., Sim-Selley L.J., Selley D.E. (2010): Cannabinoid CB1 receptor-interacting proteins: novel targets for central nervous system drug discovery? *Br. J. Pharmacol.* 160 (3): 454-466.
- 323- Soltesz I., Alger B.E., Kano M., Lee S.-H., Lovinger D.M., Ohno-Shosaku T., Watanabe M. (2015): Weeding out bad waves: Towards selective cannabinoid circuit control in epilepsy. *Nat. Rev. Neurosci.* 16: 264.
- 324- Steindel F., Lerner R., Haring M., Ruehle S., Marsicano G., Lutz B., Monory K. (2013): Neuron-type specific cannabinoid mediated G protein signalling in mouse hippocampus. *J. Neurochem.* 124: 1-13.
- 325- Stella N. (2009): Endocannabinoid signalling in microglial cells. *Neuropharmacology.* 56: 244-253.
- 326- Stella N. (2010): Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia.* 58: 1017-1030
- 327- Steward O. and Scoville S. A. (1976): Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169: 347-370.
- 328- Stueber T., Eberhardt M.J., Caspi Y., Lev S., Binshtok A., Leffler A. (2017): Differential cytotoxicity and intracellular calcium-signalling following activation of the calcium-permeable ion channels TRPV1 and TRPA1. *Cell Calcium.* 68: 34-44.
- 329- Subbanna S., Psychoyos D., Xie S., Basavarajappa B.S. (2015): Postnatal ethanol exposure alters levels of 2-arachidonylglycerol-metabolizing enzymes and pharmacological inhibition of

- monoacylglycerol lipase does not cause neurodegeneration in neonatal mice. *J. Neurochem.* 134: 276-287.
- 330- Sugaya Y., Yamazaki M., Uchigashima M., Kobayashi K., Watanabe M., Sakimura K., Kano M. (2016): Crucial roles of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in the suppression of epileptic seizures. *Cell Rep.* 16: 1405-1415.
- 331- 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.
- 332- Sun Y. and Bennett A. (2007): Cannabinoids: a new group of agonists of PPARs. *PPAR Res.* 23513.
- 333- Sun F.J., Guo W., Zheng D.H., Zhang C.Q., Li S., Liu S.Y., et al. (2013): Increased expression of TRPV1 in the cortex and hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Mol. Neurosci.* 49: 182-193.
- 334- Sun Z., Han J., Zhao W., Zhang Y., Wang S., Ye L., Liu T. (2014): TRPV1 activation exacerbates hypoxia /reoxygenation-induced apoptosis in H9C2 cells via calcium overload and mitochondrial dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 18362-18380.
- 335- Sun F.J., Guo W., Zheng D.H., Zhang C.Q., Li S., Liu S.Y., et al. (2013): Increased expression of TRPV1 in the cortex and hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J. Mol. Neurosci.* 49: 182-193.
- 336- Szabo T., Biro T., Gonzalez A.F., Palkovits M., Blumberg P.M. (2002): Pharmacological characterization of vanilloid receptor located in the brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 98: 51-57.
- 337- Szallasi A. and Blumberg P.M. (1999): Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51 (2): 159-212.
- 338- Szallasi A. and Di Marzo V. (2000): New prospective on enigmatic vanilloid receptors. *Trends Neurosci.* 23: 491-497.
- 339- Szolcsanyi J., Joo F., Jancso-Gabor A. (1971): Mitochondrial changes in preoptic neurons after capsaicin desensitization of the hypothalamic thermo detectors in rats. *Nature.* 229 (5280): 116-117.
- 340- Szymaszkiwicz A., Włodarczyk J., Wasilewski A., Di Marzo V., Storr M., Fichna J., Zielińska M. (2020): Desensitization of transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) channel as promising therapy of irritable bowel syndrome: characterization of the action of palvanil in the mouse gastrointestinal tract. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*

Bibliografia

- 341- Tahmasebi L., Komaki A., Karamian R., Shahidi S., Sarihi A., Salehi I., Nikkhah A. (2015): The interactive role of cannabinoid and vanilloid systems in hippocampal synaptic plasticity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 757: 68-73.
- 342- Takács V.T., Szőnyi A., Freund T.F., Nyiri G., Gulyás A.I. (2015): Quantitative ultrastructural analysis of basket and axo-axonic cell terminals in the mouse hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 220: 919-940.
- 343- Tanimizu T., Kono K., Kida S. (2018): Brain networks activated to form object recognition memory. *Brain Res. Bull.* 141: 27-34.
- 344- Tautz D. (1992): Redundancies, development and the flow of information. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology.* 14 (4): 263-6.
- 345- Terral G., Busquets-Garcia A., Varilh M., Achicallende S., Cannich A., Bellocchio L., Bonilla-Del Río I., Massa F., Puente N., Soria-Gomez E., Grandes P., Ferreira G., Marsicano G. (2019): CB1 Receptors in the Anterior Piriform Cortex Control Odor Preference Memory. *Current Biology.* 29 (15): 2455-2464.
- 346- Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K. et al. (1998): The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron.* 21 (3): 531-543.
- 347- Tóth A., Boczan J., Kedei N., Lizanecz E., Bagi Z., Papp Z., Edes I., Csiba L., Blumberg P.M. (2005): Expression and distribution of vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res* 135:162-168.
- 348- Touretzky D.S. (2015): Anatomy of the Hippocampus. *Compu. Mod. Of Neu. Syst.* 3 (2).
- 349- Tsou K., Brown S., Sanudo-Pena M.C., Mackie K., Walker J.M. (1998): Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 83: 393-411.
- 350- Valenti M., Vigano D., Cascico M.G., Rubino T., Steardo L., Parolaro D., di Marzo V. (2004): Differential diurnal variations of anandamide and 2-arachidonoyl-glycerol levels in rat brain. *Cell Mol. Life Sci.* 61: 945-950.
- 351- Vay L., Gu C., McNaughton P. A. (2012): The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* 165: 787-801.
- 352- Viader A., Blankman J.L., Zhong P., Liu X., Schlosburg J.E., Joslyn C.M., et al. (2015): Metabolic interplay between astrocytes and neurons regulates endocannabinoid action. *Cell Rep.* 12: 798-808.

- 353- Vinod K.Y., Yalamanchili R., Xie S., Cooper T.B., Hungund B.L. (2006): Effect of chronic ethanol exposure and its withdrawal on the endocannabinoid system. *Neurochemistry International*. 49 (6): 619-625.
- 354- Vinogradova L.V. and van Rijn C.M. (2008): Anticonvulsive and antiepileptogenic effects of levetiracetam in the audiogenic-kindling model. *Epilepsia*. 49: 1160-8.
- 355- Volkow N.D., Hampson A.J., Baler R.D. (2017): Don't worry, Be happy: endocannabinoids and cannabis at the intersection of stress and reward. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 57: 285-308.
- 356- Von Koch C.S., Zheng H., Chen H., Trumbauer M., Thinakaran G., van der Ploeg L.H. et al. (1997): Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiology of aging*. 18 (6): 661-9.
- 357- Waddington C.H. (1959): Canalization of Development and Genetic Assimilation of Acquired Characters. *Nature*. 183 (4676): 1654-5.
- 358- Wang Y., Schnegelsberg P.N., Dausman J., Jaenisch R. (1996): Functional redundancy of the muscle specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature*. 379 (6568): 823-5.
- 359- Wang W., Trieu B.H., Palmer L.C., Jia Y., Pham D.T., Jung K.-M., Karsten C.A., Merrill C.B., Mackie K., Gall C.M., Piomelli D., Lynch G. (2016): A primary cortical input to Hippocampus expresses a pathway-specific and endocannabinoid-dependent form of long-term potentiation. *eNeuro* 3.
- 360- Wang W., Jia Y., Pham D.T., Palmer L.C., Jung K.M., Cox C.D., et al. (2018): Atypical endocannabinoid signalling initiates a new form of memory-related plasticity at a cortical input to hippocampus. *Cereb. Cortex*. 28: 2253-66.
- 361- West M.J. and Andersen A.H. (1980): An allometric study of the area dentata in the rat and mouse. *Brain Res. Rev.* 2: 317-348.
- 362- Wilcox K.S., Dixon-Salazar T., Sills G.J., Ben-Menachem E., White H.S., Porter R.J., et al. (2013): Issues related to development of new antiseizure treatments. *Epilepsia*. 54.
- 363- Wilson R.I. and Nicoll R.A. (2001): Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses. *Nature*. 410: 588-592.
- 364- Winter Z., Buhala A., Ötvös F., Jósavay K., Vizler C., Dombi G., et al. (2013): Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel - an overview of the current mutational data. *Mol. Pain*. 9: 30.

Bibliografia

- 365- Witter M.P., Groenewegen H.J., Lopes da Silva F.H., Lohman A.H.M. (1989): Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog Neurobiol.* 33: 161-253.
- 366- Witter M.P. (2007): The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.* 163: 43-61.
- 367- Wolf E., Seppi K., Katzenschlager R., Hochschorner G., Ransmayr G., Schwingenschuh P., Ott E., Kloiber I., Haubenberger D., Auff E., et al. (2010): Long-Term Antidyskinetic Efficacy of Amantadine in Parkinson's Disease. *Mov. Disord.* 25: 1357-1363.
- 368- Wortley M.A., Birrell M.A., Belvisi M.G. (2016): Drugs affecting TRP channels. *Handbook of Experimental Pharmacology.* 237: 213-241.
- 369- Wu Z.Z., Chen S.R., Pan H.L. (2005): Transient receptor potential vanilloid type 1 activation down-regulates voltage-gated calcium channels through calcium-dependent calcineurin in sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 280: 18142-18151.
- 370- Wu Z.Z., Chen S.R., Pan H.L. (2006): Signalling mechanisms of down- regulation of voltage-activated Ca²⁺ channels by transient receptor potential vanilloid type 1 stimulation with olvanil in primary sensory neurons. *Neuroscience.* 141: 407-419.
- 371- Xu J.Y., Zhang J., Chen C. (2012): Long-lasting potentiation of hippocampal synaptic transmission by direct cortical input is mediated via endocannabinoids. *J. Physiol.* 590 (10): 2305-2315.
- 372- Yamamoto S., Jaiswal M., Charng W.L., Gambin T., Karaca E., Mirzaa G., et al. (2014): A drosophila genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell.* 159 (1): 200-14.
- 373- Young R., Passet B., Vilotte M., Cribeu E.P., Beringue V., Le Provost F., et al. (2009): The prion or the related Shadoo protein is required for early mouse embryogenesis. *FEBS letters.* 583 (19): 3296-300.
- 374- Zador F. and Wollemann M. (2015): Receptome: Interactions between three pain-related receptors or the "triumvirate" of cannabinoid, opioid and TRPV1 receptors. *Pharmacological Research.* 102: 254-263.
- 375- Zani A., Braida D., Capurro V., Sala M. (2007): Delta9-tetrahydrocannabinol (THC) and AM 404 protect against cerebral ischaemia in gerbils through a mechanism involving cannabinoid and opioid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 152 (8): 1301-1311.

- 376- Zimmer A., Zimmer A.M., Hohmann A.G., Herkenham M., Bonner T.I. (1999): Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 5780-5785.
- 377- Zou S. and Kumar U. (2018): Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 833.
- 378- Zygmunt P. M., Petersson J., Andersson D. A., Chuang H., Sjørgård M., Di Marzo V., et al. (1999): Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature.* 400: 452-457.